

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1  
SCIENCES ET GEOGRAPHIE**

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

**Discipline : Biologie**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Véronique SENDRA**

*le 28 septembre 2007*

---

**Homéostasie et résistance au cuivre chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 :  
la protéine CopH et les transporteurs membranaires CusA et CzcA**

---

**Composition du jury**

Marc Fontecave  
Peter Faller  
Ruddy Wattiez  
Patrice Catty  
Marius Réglie  
Jacques Covès

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

Thèse préparée à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel  
UMR 5075 CEA/CNRS/UJF









# Sommaire

<b>Abréviations</b>	<b>p. 27</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>p. 31</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	<b>p. 35</b>
<b>I – Les métaux lourds en biologie</b>	<b>p. 35</b>
1.1 Les métaux lourds : définition et propriétés	p. 37
1.1.1 Définition	
1.1.2 Propriétés chimiques	
1.2 Effets des métaux sur le vivant	p. 38
1.2.1 Les métaux non physiologiques : exemple du cadmium et du mercure	
1.2.2 Les métaux physiologiques : exemple du fer et du cuivre	
1.3 Homéostasie des métaux lourds	p. 41
1.3.1 Entrée, devenir et efflux des métaux	
1.3.2 Des systèmes intégrés	
<b>II – Le cuivre</b>	<b>p. 47</b>
2.1 Le métal	p. 47
2.1.1 Caractéristiques	
2.1.2 Production	
2.1.3 Utilisations	
2.2 Le cuivre en biologie : un métal essentiel dont l'homéostasie est finement orchestrée	p. 48
2.2.3 Un métal essentiel à la vie à très faible dose	
2.2.4 Toxicité du cuivre	
a - Toxique à hautes concentrations	
b – Le stress oxydant et la formation de radicaux libres	
2.3 Les metalloprotéines à cuivre	p. 54
2.3.1 Le motif ATCUN	
2.3.2 Les metalloprotéines à cuivre : structure du site cuivre	
2.3.3 Le cas de la protéine Prion	
2.4 Métabolisme du cuivre chez l'être humain et ses dérèglements	p. 63
2.4.1 L'homéostasie du cuivre : absorption, distribution aux protéines cibles et détoxification	
2.4.2 Les maladies neurodégénératives	

<b>III – L’homéostasie du cuivre chez les bactéries</b>	<b>p. 69</b>
3.1 Le cuivre cytoplasmique	p. 69
3.2 L’homéostasie du cuivre chez <i>Escherichia. Coli</i>	p. 69
3.3 La résistance au cuivre gouvernée par les gènes plasmidiques	p. 77
3.4 L’homéostasie du cuivre chez <i>Enterococcus. Hirae</i>	p. 79
3.5 Les chalkophores	p. 81
<b>IV – Le cas de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34</b>	<b>p. 81</b>
4.1 Les gènes de résistance aux métaux	p. 84
4.1.1 Les gènes de régulation : le système dipartite RS	
4.1.2 Le cluster de gènes HME-RND	
4.1.3 Les autres clusters et opérons	
4.2 La famille RND (Resistance Nodulation cell Division)	p. 86
4.3 Les autres protéines impliquées dans la résistance aux métaux lourds	p. 89
4.3.1 Les protéines CDF (Cations Diffusion Facilitators)	
4.3.2 Les ATPases de type P	
4.3.3 Les autres systèmes d’export de métaux lourds	
4.4 Le cluster <i>cop</i>	p. 90
4.4.1 Le plasmide pMOL30 et le phénotype de résistance au cuivre	
4.4.2 Le cluster de gènes impliqué dans la résistance au cuivre	
<b>V – Sujet de thèse</b>	<b>p. 101</b>
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	<b>p. 105</b>
<b>I – Matériel biologique et milieux de culture</b>	<b>p. 105</b>
1.1 Souches bactériennes	p. 105
1.2 Vecteurs plasmidiques	p. 106
1.3 Milieux de culture	p. 108

<b>II – Biologie moléculaire</b>	<b>p. 108</b>
2.1 Transformation dans BL21(DE 3), BL21(DE3)pLysS et XL1-Blue	p. 108
2.1.1 Préparation de cellules compétentes	
2.1.2 Transformation par de l'ADN plasmidique	
2.2 Clonage de CopH	p. 109
2.2.1 Amplification du gène par PCR	
2.2.2 Digestion d'ADN par les enzymes de restriction	
2.2.3 Ligation et transformation	
2.3 Mutagenèse dirigée : obtention des mutants CopH26A, CopH24A et CopH24-26A	p. 112
2.3.1 Conception des oligonucléotides	
2.3.2 Mutagenèse dirigée	
<b>III – Expression des protéines d'intérêt dans <i>E. coli</i> et purification</b>	<b>p.114</b>
3.1 CusA et CzcA	p. 114
3.1.1 Surexpression induite par l'anhydrotétracycline (AHT)	
3.1.2 Préparation des extraits membranaires	
3.1.3 Purification en détergent	
3.2 CopH et ses mutants	p. 116
3.2.1 Surexpression et induction par l'IPTG	
3.2.2 Purification	
<b>IV – Biochimie</b>	<b>p. 118</b>
4.1 Solubilisation ménagée de CusA et CzcA dans différents détergents	p. 118
4.2 Les gradients de sucrose	p. 119
4.3 Les dosages	p. 120
4.3.1 Dosage du DDM	
4.3.2 Dosage protéique par la technique Bradford	
4.3.3 Dosage protéique au BCA	
4.4 Immunoprécipitation	p. 121
4.4.1 Principe	
4.4.2 Protocole expérimental	

<b>V – Techniques physico-chimiques</b>	<b>p. 122</b>
<b>A – Techniques relatives à CopH</b>	<b>p. 122</b>
A.1 Spectrométrie de masse	p. 122
A.1.1 Principe	
A.1.2 Protocole expérimental	
A.2 Spectroscopie UV-visible	p. 125
A.2.1 Principe	
A.2.2 Protocole expérimental	
A.3 La microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC)	p. 127
A.3.1 Principe	
A.3.2 Protocole expérimental	
A.4 Résonance plasmonique de surface (Biacore)	p. 131
A.4.1 Principe	
A.4.2 Protocole expérimental	
A.5 Chromatographie d'affinité	p. 133
A.6 Résonance magnétique nucléaire (RMN)	p. 134
A.6.1 Principe	
A.6.2 Protocole expérimental	
A.7 Résonance paramagnétique électronique (RPE)	p. 139
A.7.1 Principe	
A.7.2 Protocole expérimental	
A.8 Dichroïsme circulaire	p. 143
A.8.1 Principe	
A.8.2 Protocole expérimental	
A.9 Thermal shift assay	p. 145
A.9.1 Principe	
A.9.2 Protocole expérimental	
A.10 Cristallogenèse et cristallographie	p. 147
A.10.1 Principe	
A.10.2 Protocole expérimental	

**B – Techniques relatives à CusA et CzcA** **p. 149**

- B.1 Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF) p. 149
  - B.1.1 Principe
  - B.1.2 Protocole expérimental
- B.2 Ultracentrifugation analytique p. 152
  - B.2.1 Principe
  - B.2.2 Protocole expérimental
- B.3 Microscopie électronique à transmission (MET) p. 156
  - B.3.1 Principe
  - B.3.2 Essais de reconstitution de CusA et CzcA en cristaux 2 D
- B.4 Reconstitution en protéoliposomes et mesure d'activité p. 160
  - B.4.1 Principe
  - B.4.2 Protocole expérimental
- B.5 Cristallogénèse p. 162

**Chapitre 3 : La protéine CopH** **p. 165**

**Résultats** **p. 165**

**I – La protéine CopH : étude préliminaire** **p. 166**

- 1.1 Surexpression et purification de CopH p. 166
- 1.2 Capacité de CopH à lier les métaux p. 168
  - 1.2.1 Discrimination des différents métaux par chromatographie
  - 1.2.2 Analyse par spectrométrie de masse
- 1.3 Propriétés de la liaison CopH-Cu : approches physicochimiques et structurales p. 174
  - 1.3.1 La spectroscopie UV-visible p. 174
  - 1.3.2 Caractérisation du site de liaison des ions Cu(II) par RPE p. 175
  - 1.3.3 La résonance plasmonique de surface p. 177
  - 1.3.4 Caractérisation structurale par dichroïsme circulaire p. 180
  - 1.3.5 La spectroscopie RMN p. 181
  - 1.3.6 La cristallogénèse p. 188

<b>II – CopH à la lumière de ses mutants</b>	p. 189
2.1 Mutagenèse dirigée, surexpression et purification des mutants	p. 189
2.2 Stabilité en fonction de la température	p. 189
2.3 Comparaison d'affinité	p. 192
2.3.1 Affinités comparées par chromatographie d'affinité	
2.3.2 Etude par spectrométrie de masse	
2.3.3 Analyse par résonance plasmonique de surface	
2.4 Caractérisation thermodynamique de la liaison CopH-Cu	p. 199
2.4.1 Le choix des concentrations en protéine et CuCl <sub>2</sub>	
2.4.2 Le choix du tampon	
2.4.3 Les titrages protéiques par CuCl <sub>2</sub>	
2.5 Caractérisation spectroscopique et structurale	p. 207
2.5.1 Caractérisation structurale du site cuivre par RPE	p. 207
2.5.2 Titrages par spectroscopie UV-visible et RPE	p. 215
2.5.3 Le dichroïsme circulaire dans le visible	p. 225
2.5.4 La résonance magnétique nucléaire (RMN)	p. 227
<b>Discussion</b>	<b>p. 233</b>
<b>Chapitre 4 : Les transporteurs HME-RND, CusA et CzcA</b>	<b>p. 245</b>
<b>Résultats</b>	<b>p. 245</b>
<b>I – La protéine CusA : homogénéité et approche structurale</b>	<b>p. 246</b>
1.1 Surexpression et purification de CusA en DDM	p. 246
1.2 Solubilisation ménagée de CusA par d'autres détergents	p. 249
1.2.1 Détermination de détergents adéquats à la solubilisation de CusA	p. 249
1.2.2 Purification en fos-choline 12	p. 252



1.2.3	Purification en fos-choline 14	p. 253
1.2.4	Purification en DDM/SDS	p. 256
1.3	Dosage de détergents et de lipides par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	p. 259
1.3.1	Dosage de détergents	p. 259
1.3.2	Estimation de la quantité de lipides	p. 262
1.4	Etude de l'homogénéité des différentes préparations de CzcA	p. 263
1.4.1	Les gradients de sucrose	p. 263
1.4.2	La microscopie électronique (MET)	p. 264
1.4.3	L'ultracentrifugation analytique (UCA)	p. 266
1.5	Approche structurale	p. 272
1.5.1	Essais de cristallogénèse	p. 272
1.5.2	Essais de reconstitution en cristaux 2D : analyse par microscopie électronique	p. 273
	★ Elimination du détergent par Biobeads	
	★ Elimination du détergent par dialyse	
<b>II – La protéine CzcA</b>		<b>p. 279</b>
2.1	Surexpression et purification de CzcA en détergent	p. 279
2.2	Solubilisation de CzcA par d'autres détergents	p. 281
2.2.1	Détermination de détergents adéquats à la solubilisation de CzcA	
2.2.2	Purification en fos-choline 14	
2.3	Etudes par microscopie électronique	p. 284
2.4	Approche fonctionnelle : reconstitution en protéoliposomes et mesure d'activité	p. 284
<b>Discussion</b>		<b>p. 291</b>

**Conclusion générale et perspectives** p. 297

**Bibliographie** p. 301

**Annexes** p. 325

# Table des figures

## Introduction

<b>Figure 1</b> : Tableau périodique des éléments	p. 37
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique d'une métallothionéine eucaryote	p. 44
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de l'opéron <i>mer</i>	p. 46
<b>Figure 4</b> : Modèle structural d'un site cuivre de type 1	p. 55
<b>Figure 5</b> : Représentation des sites métalliques dans une superoxyde dismutase à cuivre et à zinc	p. 56
<b>Figure 6</b> : Spectres d'absorption UV-visible et spectres RPE de complexes cuivre de type 2 et de type 1	p. 57
<b>Figure 7</b> : Structure tridimensionnelle de la protéine prion bovine bPrP(23-230)	p. 59
<b>Figure 8</b> : Vue schématique de la conversion structurale de PrP <sup>c</sup> en protéine pathogène PrP <sup>Sc</sup>	p. 59
<b>Figure 9</b> : Modèle de liaison entre le cuivre et les segments octapeptidiques (PHGGGWGQ) proposé d'après les premières études RPE	p. 61
<b>Figure 10</b> : Représentation moléculaire de la liaison du cuivre au motif HGGGW de la protéine Prion d'après la structure cristallographique de la région HGGGW	p. 61
<b>Figure 11</b> : Modèle moléculaire des sites de liaison métalliques au niveau du domaine de répétition octapeptique obtenu en présence de cuivre ou de nickel	p. 62
<b>Figure 12</b> : Modèles des trois modes de coordination équatoriaux	p. 62
<b>Figure 13</b> : Homéostasie du cuivre dans une cellule intestinale	p. 64
<b>Figure 14</b> : Modèle du transport du cuivre dans un hépatocyte	p. 65
<b>Figure 15</b> : Etapes déficientes du métabolisme du cuivre dans les maladies de Wilson et de Menkes	p. 65
<b>Figure 16</b> : Le déterminant <i>cus</i> composé de la paire régulatrice <i>cusRS</i> et des gènes <i>cusCFBA</i> , transcrits suivant des directions opposées	p. 70
<b>Figure 17</b> : Homéostasie de cuivre chez <i>E. coli</i>	p. 71
<b>Figure 18</b> : Structure de CueO	p. 73
<b>Figure 19</b> : Modèle fonctionnel du complexe d'efflux Cus	p. 74

<b>Figure 20</b> : Modèle du complexe AcrB-AcrA-TolC	p. 74
<b>Figure 21</b> : Modèle topologique de CusA	p. 75
<b>Figure 22</b> : Les systèmes Pco/Cop d' <i>E. coli</i> et <i>P. syringae</i>	p. 79
<b>Figure 23</b> : L'homéostasie du cuivre chez <i>E. hirae</i>	p. 79
<b>Figure 24</b> : Toxicité des métaux lourds en fonction de l'affinité des cations pour les sulfures	p. 82
<b>Figure 25</b> : Génome de <i>C. metallidurans</i> CH34	p. 83
<b>Figure 26</b> : Mécanisme modèle de fonctionnement des protéines RND	p. 87
<b>Figure 27</b> : Phénotypes de résistance aux métaux chez <i>C. metallidurans</i>	p. 91
<b>Figure 28</b> : Organisation du cluster <i>cop</i> chez <i>C. metallidurans</i>	p. 92
<b>Figure 29</b> : Taux d'expression des gènes <i>cop</i> contrôlé par fluorescence, en fonction du temps, à la suite d'un stress cuivre	p. 98
<b>Figure 30</b> : Taux d'expression de certains <i>cop</i> en fonction du temps après induction avec 0,4 mM Cu(II)	p. 99

## Matériel et Méthodes

<b>Figure 31</b> : Représentation du plasmide pET28	p. 106
<b>Figure 32</b> : Représentation du plasmide pASK-IBA3	p. 107
<b>Figure 33</b> : Amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse du gène <i>copH</i> (production des simples mutants His24Ala et His26Ala)	p. 112
<b>Figure 34</b> : Amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse du gène <i>copH</i> (production du double mutant His24-26Ala)	p. 113
<b>Figure 35</b> : Amorces de PCR pour la mutagenèse du gène <i>copH</i> (production des simples mutants Gln19Ser et Gln23Ser)	p. 113
<b>Figure 36</b> : Représentation du système d'ionisation electrospray	p. 123
<b>Figure 37</b> : Schéma du système ESI-Q-TOF	p. 124
<b>Figure 38</b> : Diagramme schématique représentant différents profils thermodynamiques d'interactions moléculaires souvent rencontrées en biologie	p. 128
<b>Figure 39</b> : Microcalorimètre ITC	p. 129
<b>Figure 40</b> : Données microcalorimétriques. (A) Données brutes. (B) Données intégrées	p. 129
<b>Figure 41</b> : Variations de la forme des courbes de titrage ITC en fonction de <i>c</i>	p. 130

<b>Figure 42</b> : Mouvement de précession du moment magnétique de spin $\mu$ autour de $\mathbf{B}_0$	p. 134
<b>Figure 43</b> : Eclatement des niveaux d'énergie d'un spin $\frac{1}{2}$ par application du champ magnétique statique $\mathbf{B}_0$	p. 134
<b>Figure 44</b> : Relaxation de l'aimantation $M$ après envoi, par impulsions brèves, d'une onde électromagnétique générant un champ $\mathbf{B}_1$ tels que $\mathbf{B}_0 \perp \mathbf{B}_1$	p. 135
<b>Figure 45</b> : Signal détecté : FID	p. 135
<b>Figure 46</b> : Récapitulatif du fonctionnement d'un appareil RMN	p. 136
<b>Figure 47</b> : Gammes de déplacements chimiques pour les différents types de protons d'une protéine	p. 138
<b>Figure 48</b> : Diagramme des niveaux d'énergie représentant la transition électronique donnant lieu au phénomène de résonance paramagnétique électronique	p. 140
<b>Figure 49</b> : Spectre RPE représentant les deux raies, résultat de l'interaction entre un électron et un noyau de spin $\frac{1}{2}$	p. 141
<b>Figure 50</b> : Diagramme énergétique représentant les transitions RPE possibles	p. 141
<b>Figure 51</b> : Détection de la fluorescence lors de transitions de phases thermiques chez les protéines	p. 146
<b>Figure 52</b> : Représentation schématique d'une maille cristalline en deux dimensions	p. 147
<b>Figure 53</b> : Diagramme de solubilité d'une protéine	p. 148
<b>Figure 54</b> : Principe de la méthode par diffusion de vapeur, en goutte suspendue	p. 148
<b>Figure 55</b> : Montage optique d'un appareil à transformée de Fourier	p. 150
<b>Figure 56</b> : Représentation de la liaison peptidique	p. 151
<b>Figure 57</b> : Spectre IR représentant la forme classique des bandes d'absorbance amide I et amide II	p. 151
<b>Figure 58</b> : Description d'une cellule d'ultracentrifugation analytique et mécanisme de fonctionnement	p. 154
<b>Figure 59</b> : Exemple d'expérience de vitesse de sédimentation	p. 155
<b>Figure 60</b> : Microscope électronique à transmission	p. 157
<b>Figure 61</b> : Schéma de fonctionnement du microscope électronique à transmission	p. 157
<b>Figure 62</b> : Cristallisation en deux dimensions de l'O-aquaporine	p. 158
<b>Figure 63</b> : Orientation « up and down » dans les cristaux 2 D	p. 158
<b>Figure 64</b> : Méthode de cristallisation sur film de carbone	p. 158
<b>Figure 65</b> : Croissance de différents cristaux 2D à partir de micelles ternaires	p. 159

## *La protéine CopH*

<b>Figure 66</b> : Séquence de la protéine CopH dans sa totalité	p. 166
<b>Figure 67</b> : Gel SDS-PAGE de surexpression de CopH	p. 167
<b>Figure 68</b> : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel du précipité de sulfate d'ammonium	p. 167
<b>Figure 69</b> : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de la protéine CopH après purification	p. 167
<b>Figure 70</b> : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) du chymotrypsinogène A et de la ribonucléase A	p. 167
<b>Figure 71</b> : Séquence de la protéine CopH après maturation	p. 168
<b>Figure 72</b> : Pic caractéristique de la forme monomérique de CopH pour un état de charge $z = 10$ (spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes)	p. 169
<b>Figure 73</b> : Pic caractéristique de la forme dimérique de CopH pour un état de charge $z = 10$ (spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes)	p. 169
<b>Figure 74</b> : Titrages de CopH par $\text{CuCl}_2$ et $\text{ZnCl}_2$ contrôlés par ES-MS en conditions non dénaturantes	p. 170
<b>Figure 75</b> : Compétition entre les ions $\text{Ni}^{2+}$ et $\text{Cu}^{2+}$ pour la protéine CopH, contrôlée par ES-MS en conditions non dénaturantes	p. 172
<b>Figure 76</b> : Compétition de CopH et de la glycine pour les ions $\text{Cu(II)}$ , contrôlée par ES-MS en conditions non dénaturantes	p. 173
<b>Figure 77</b> : Spectres UV-visible obtenus par titrage de CopH par des quantités croissantes de $\text{CuCl}_2$	p. 174
<b>Figure 78</b> : Représentation d'un ion cuivre de type II	p. 174
<b>Figure 79</b> : Analyse RPE de la liaison CopH-Cu	p. 175
<b>Figure 80</b> : Double intégration de la résonance à bas champ (1750 G) en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajoutés à la protéine CopH	p. 176
<b>Figure 81</b> : Structure hyperfine de la bande à haut champ	p. 176
<b>Figure 82</b> : Schéma représentant les raies de l'azote par couplage isotrope de 16 G et couplage anisotrope de 8 G avec le cuivre	p. 176
<b>Figure 83</b> : Influence du pH sur la fixation de CopH à la surface Ni-NTA	p. 177
<b>Figure 84</b> : Evolution du signal de résonance (Biacore) en fonction du temps pour différentes quantités de protéine CopH injectées sur la surface Ni-NTA	p. 179
<b>Figure 85</b> : Graphes de Scatchard	p. 179

<b>Figure 86</b> : Spectre de dichroïsme circulaire de la protéine CopH à pH = 7,5	p. 181
<b>Figure 87</b> : Prédiction de structures secondaires au sein des protéines CopH et CzcE	p. 181
<b>Figure 88</b> : Spectres RMN de la protéine sauvage CopH à pH = 7,5 et pH = 6,5	p. 183
<b>Figure 89</b> : Illustration de la diffusion des spins $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (méthode HET-SOFAST-HMQC)	p. 185
<b>Figure 90</b> : $\lambda_{\text{noe}}$ tracés pour chaque résidu au sein de CopH apo et CopH métallée	p. 186
<b>Figure 91</b> : Superposition des spectres HSQC $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ de CopH en absence et en présence de 1,8 équivalents de Cu(II)	p. 187
<b>Figure 92</b> : Représentation du site de coupure entre l'arginine 29 et l'alanine 30	p. 189
<b>Figure 93</b> : Etude de la stabilité de CopH et ses mutants en fonction de la température : détermination de leurs températures de dénaturation $T_m$	p. 190
<b>Figure 94</b> : Chromatogramme d'éluion de CopH et ses mutants sur colonne HiTrap <sup>TM</sup> Chelating HP (1 mL) suivant un gradient d'imidazole	p. 192
<b>Figure 95</b> : Spectres de masse en conditions non dénaturantes de CopH et du mutant His24Ala additionnés de 2,5 équivalents de Cu(II)	p. 195
<b>Figure 96</b> : Evolution du signal de résonance en fonction du temps pour différentes quantités de protéine His26Ala, His24Ala, His24-26Ala, injectées sur la surface Ni-NTA. Graphes de Scatchard correspondants	p. 196
<b>Figure 97</b> : Influence du pH sur la fixation de CopH puis de His24-26Ala à la surface Ni-NTA	p. 198
<b>Figure 98</b> : Titrage calorimétrique de CopH par les ions Cu(II)	p. 202
<b>Figure 99</b> : Titrage calorimétrique des mutants par les ions Cu(II)	p. 203
<b>Figure 100</b> : Diagramme schématique représentant différents profils thermodynamiques d'interactions moléculaires souvent rencontrées en biologie	p. 206
<b>Figure 101</b> : Spectres RPE en onde continue de la protéine CopH et CopH marquée $^{15}\text{N}$	p. 207
<b>Figure 102</b> : Comparaison des spectres de CopH et de l'ubiquitine	p. 208
<b>Figure 103</b> : Représentation des domaines donnés par (g// ; a//) et correspondant au type et au nombre de ligands du cuivre	p. 210
<b>Figure 104</b> : Agrandissement de la région g des spectres relatifs à CopH et ses mutants, marqués $^{15}\text{N}$	p. 210
<b>Figure 105</b> : Spectres RPE de CopH et du double mutant marqués $^{15}\text{N}$ en Hepes-D <sub>2</sub> O	p. 211
<b>Figure 106</b> : Spectres RPE de CopH $^{15}\text{N}$ et His24-26Ala $^{15}\text{N}$ en Hepes-D <sub>2</sub> O, observés en dérivée seconde	p. 211

<b>Figure 107</b> : Spectres RPE de CopH et de ses mutants, comparés à ceux de la protéine CopH tronquée	p. 212
<b>Figure 108</b> : Spectres ENDOR de la protéine CopH et du mutant His26Ala	p. 213
<b>Figure 109</b> : Spectre ENDOR de la protéine Prion en présence de cuivre Cu(II) à pH = 7,4	p. 213
<b>Figure 110</b> : Formule développée d'une histidine. Interactions Cu/N vues par ENDOR ou HYSCORE	p. 213
<b>Figure 111</b> : Spectre HYSCORE du mutant His26Ala	p. 213
<b>Figure 112</b> : Spectre HYSCORE de la protéine CopH <sup>15</sup> N en Hepes- D <sub>2</sub> O	p. 215
<b>Figure 113</b> : Spectre HYSCORE du double mutant His24-26Ala <sup>15</sup> N	p. 215
<b>Figure 114</b> : Interaction potentielle Glutamine-Cu via une délocalisation de liaison $\pi$	p. 215
<b>Figure 115</b> : Séquence de la protéine CopH après maturation	p. 215
<b>Figure 116</b> : Titrage UV-visible des trois mutants His26Ala, His24Ala et His24-26Ala par des quantités croissantes de CuCl <sub>2</sub>	p. 216
<b>Figure 117</b> : Représentation de l'augmentation de l'absorbance maximale et la longueur d'onde à l'absorbance maximale, en fonction du nombre d'équivalents de Cu(II) ajoutés	p. 218
<b>Figure 118</b> : Représentation de la déconvolution des spectres UV-visible obtenus par titrage de CopH avec les ions Cu(II)	p. 220
<b>Figure 119</b> : Représentation de l'évolution des pentes des tangentes aux spectres obtenus par titrage UV-visible de la protéine CopH par les ions Cu(II)	p. 221
<b>Figure 120</b> : Titrages par RPE de la protéine CopH et des mutants par différents équivalents de CuCl <sub>2</sub>	p. 223
<b>Figure 121</b> : Représentation de l'évolution du spectre de la protéine CopH en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajouté	p. 224
<b>Figure 122</b> : Spectres CD de CopH en présence de différents équivalents de cuivre, enregistrés dans le visible	p. 225
<b>Figure 123</b> : Spectres HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N de la protéine CopH et des mutants His26Ala et His24Ala	p. 228
<b>Figure 124</b> : Spectres HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N de la protéine CopH et du mutant His24Ala	p. 229
<b>Figure 125</b> : Site cuivre de type 2	p. 235
<b>Figure 126</b> : Représentation schématique de la protéine CopH suivant l'hypothèse d'un dimère symétrique possédant quatre sites cuivre	p. 238



<b>Figure 127</b> : Représentation schématique du simple mutant His26Ala suivant l'hypothèse d'un dimère symétrique ne possédant plus qu'un site de haute affinité	p. 238
<b>Figure 128</b> : Représentation schématique du simple mutant His24Ala suivant l'hypothèse d'un dimère symétrique ne possédant plus qu'un site d'assez faible affinité	p. 238
<b>Figure 129</b> : Représentation schématique du double mutant His24-26Ala suivant l'hypothèse d'un dimère symétrique ne possédant plus que des sites de faible affinité	p. 238
<b>Figure 130</b> : Western-blot des extraits totaux de cultures de <i>C. metallidurans</i> CH34 avec ou sans cuivre	p. 241
<b>Figure 131</b> : Analyse et identification par spectrométrie de masse des différentes protéines présentes dans l'élution après immunoprécipitation de la protéine CopH	p. 241
<b>Figure 132</b> : Représentation schématique de l'ensemble des protéines du cluster <i>cop</i> dans leur espace périplasmique, cytoplasmique ou membranaire	p. 242

### *Les transporteurs membranaires CusA et CzcA*

<b>Figure 133</b> : Gel SDS-PAGE représentant les différentes étapes de purification de CusA	p. 247
<b>Figure 134</b> : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel de la protéine CusA	p. 247
<b>Figure 135</b> : Gel SDS-PAGE représentant le contenu des différentes fractions de 800 $\mu$ L collectées à partir d'un gradient de sucrose contenant 0,05 % DDM	p. 248
<b>Figure 136</b> : Gel SDS-PAGE représentant la protéine CusA après 3 semaines à 4°C et après congélation à -80°C	p. 249
<b>Figure 137</b> : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel de la protéine CusA après une semaine à 4°C	p. 249
<b>Figure 138</b> : Solubilisation ménagée des extraits membranaires de la protéine CusA par différents détergents	p. 251
<b>Figure 139</b> : Gel SDS-PAGE représentant les différentes étapes de la purification de CusA en fos-choline 12 0,18 %	p. 252
<b>Figure 140</b> : Gel SDS-PAGE représentant le contenu des différentes fractions de 800 $\mu$ L collectées à partir d'un gradient de sucrose contenant 0,08 % de FC12	p. 252
<b>Figure 141</b> : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel de la protéine CusA	p. 252

<b>Figure 142</b> : Gel SDS-PAGE représentant les différentes étapes de la purification de CusA en fos-choline 14 0,025 %	p. 253
<b>Figure 143</b> : Gel SDS-PAGE représentant le contenu des différentes fractions de 800 µL collectées à partir du haut du gradient de sucrose contenant 0,025 % de FC14	p. 253
<b>Figure 144</b> : gel SDS-PAGE représentant l'élution de la protéine CusA par des quantités croissantes de NaCl	p. 254
<b>Figure 145</b> : Gel SDS-PAGE représentant les différentes étapes de la purification de CusA optimisée, en fos-choline 14 0,025 %	p. 255
<b>Figure 146</b> : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel de la protéine CusA après purification en fos-choline 14 0,025 %	p. 255
<b>Figure 147</b> : Gels SDS-PAGE représentant la protéine CusA purifiée en fos-choline 14 après incubation à 4°C pendant 24 heures et après congélation à -80°C	p. 256
<b>Figure 148</b> : Gel natif représentant la solubilisation de la protéine CusA purifiée en DDM 0,05 % par différentes quantités de SDS	p. 257
<b>Figure 149</b> : Purification de CusA en DDM 0,05 % et SDS 0,02 %	p. 258
<b>Figure 150</b> : Gel SDS-PAGE représentant le comportement d'un même échantillon protéique issu d'une purification en DDM 0,05 % et déposé sur gradient de sucrose contenant DDM 0,05 % ou le mélange DDM 0,05 % et SDS 0,02 %	p. 259
<b>Figure 151</b> : Gels SDS-PAGE représentant la protéine CusA purifiée en DDM/SDS après incubation pendant 24 heures et après congélation à -80°C	p. 259
<b>Figure 152</b> : Spectres infra-rouge enregistrés par IRTF	p. 260
<b>Figure 153</b> : Mise en évidence des liaisons donnant un signal d'absorbance infrarouge au sein des molécules présentes dans la préparation protéique	p. 260
<b>Figure 154</b> : Agrandissement du spectre de la protéine CusA purifiée en DDM 0,05 % enregistré en IRTF	p. 262
<b>Figure 155</b> : Agrandissement du spectre de la protéine CusA purifiée en DDM 0,05 % et SDS 0,02 %, enregistré en IRTF	p. 262
<b>Figure 156</b> : CusA purifiée en DDM 0,05 % vue par microscopie électronique	p. 265
<b>Figure 157</b> : CusA purifiée en FC 14 0,025 % vue par microscopie électronique	p. 265
<b>Figure 158</b> : Profils des vitesses de sédimentation des préparations de CusA en DDM ou FC 14	p. 267
<b>Figure 159</b> : Analyse de la distribution des coefficients de sédimentation apparents $c(s)$ pour CusA-FC14 et CusA-DDM	p. 267
<b>Figure 160</b> : Analyse de la distribution des coefficients de sédimentation	

apparents $c(s)$ pour AcrB-DDM	p. 269
<b>Figure 161</b> : Agrandissement des spectres enregistrés en IRTF des protéines CusA et AcrB purifiées en DDM	p. 270
<b>Figure 162</b> : Distribution des états oligomériques de AcrB et CusA déduits des expériences d'ultracentrifugation analytique	p. 271
<b>Figure 163</b> : Essais de reconstitution de la protéine CusA en cristaux 2D à l'aide de lipides d' <i>E. coli</i> – élimination du détergent par Biobeads	p. 274
<b>Figure 164</b> : Essais de reconstitution de la protéine CusA en cristaux 2D à l'aide de lipides d' <i>E. coli</i> – élimination du détergent par dialyse	p. 277
<b>Figure 165</b> : Gels SDS-PAGE représentant les différentes étapes de la purification de CzcA en DDM 0,05 %	p. 280
<b>Figure 166</b> : Western-Blot correspondant au gel SDS-PAGE	p. 280
<b>Figure 167</b> : Gel SDS-PAGE représentant le contenu des différentes fractions d'un gradient de sucrose contenant 0,05 % de DDM	p. 281
<b>Figure 168</b> : Solubilisation ménagée des extraits membranaires de la protéine CzcA par différents détergents	p. 282
<b>Figure 169</b> : Gel SDS-PAGE représentant les différentes étapes de la purification de CzcA en FC14 0,025 %	p. 283
<b>Figure 170</b> : Gel SDS-PAGE représentant le contenu des fractions d'un gradient de sucrose contenant 0,025 % de FC14	p. 284
<b>Figure 171</b> : Mesure d'activité par fluorescence de la protéine CzcA	p. 285
<b>Figure 172</b> : Représentation des vitesses initiales de transport en fonction de la concentration en zinc	p. 286
<b>Figure 173</b> : Représentation schématique de l'équilibre oligomérique menant à la cristallisation des transporteurs de la famille RND	p. 294



# Table des tableaux

## Introduction

<b>Tableau 1</b> : Exemples d'ions acides durs et acides mous	p. 38
<b>Tableau 2</b> : Certaines protéines et enzymes à cuivre : localisation et fonction	p. 50
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques, géométries, physicochimiques et fonctionnelles des protéines de type 1, 2 et 3	p. 58
<b>Tableau 4</b> : Eléments essentiels de l'homéostasie du cuivre chez <i>E. coli</i>	p. 77
<b>Tableau 5</b> : Comparaison génomique	p. 87
<b>Tableau 6</b> : Comparaison des CMI en cuivre pour la souche <i>C. metallidurans</i> CH34 sauvage et pour la souche ne possédant plus le gène <i>copH</i>	p. 95
<b>Tableau 7</b> : Analyse transcriptomique de cultures de <i>C. metallidurans</i> 30 minutes après un stress cuivre correspondant à 0,1 mM Cu(II)	p. 96
<b>Tableau 8</b> : Analyse transcriptomique des gènes <i>cop</i> de pMOL30 par PCR quantitative effectuée 30 minutes après différents stress cuivre	p. 97

## Matériel et méthodes

<b>Tableau 9</b> : PCR pour le clonage du gène <i>copH</i>	p. 110
<b>Tableau 10</b> : Digestion de l'insert <i>copH</i>	p. 111
<b>Tableau 11</b> : Digestion du plasmide pET-28a	p. 111
<b>Tableau 12</b> : Mutagenèse dirigée : mélange réactionnel de PCR et cycle de PCR	p. 114
<b>Tableau 13</b> : Tests de solubilisation ménagée de CusA	p. 118
<b>Tableau 14</b> : Test de solubilisation managée de CzcA	p. 119

## La protéine CopH

<b>Tableau 15</b> : Signification des différents paramètres utilisés	p. 142
<b>Tableau 16</b> : Températures de dénaturation $T_m$ de CopH et ses mutants en présence de différents équivalents de cuivre	p. 1191

<b>Tableau 17</b> : Tableau récapitulatif de la proportion approximative de chaque espèce protéique liant 0, 1, ou 2 ions Cu(II)	p. 195
<b>Tableau 18</b> : Paramètres obtenus pour les titrages calorimétriques de CopH et ses mutants	p. 204
<b>Tableau 19</b> : Coefficients $g_{//}$ , $A_{//}$ , $A_{\perp}$ correspondant aux spectres des protéines CopH et simples mutants, protéine CopH tronquée, et protéine Prion, liées aux ions Cu(II), ainsi qu'à l'ubiquitine en présence d'ions Cu(II)	p. 209

### *Les transporteurs membranaires CusA et CzcA*

<b>Tableau 20</b> : Conditions testées pour la solubilisation ménagée des extraits membranaires de la protéine CusA	p. 250
<b>Tableau 21</b> : Caractéristiques des différentes préparations de CusA observées par microscopie électronique	p. 265
<b>Tableau 22</b> : Formations des « vésicules » en fonction de la nature des lipides ajoutés	p. 275
<b>Tableau 23</b> : Observation du processus de reconstitution en fonction du temps, à température ambiante et à 4°C	p. 276
<b>Tableau 24</b> : Conditions testées pour la solubilisation ménagée des extraits membranaires de la protéine CzcA	p. 283

# *Abréviations*





## *Abréviations*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BET : Bromure d'éthydium

$\beta$ -OG :  $\beta$ -octylglucoside

CD : Dichroïsme circulaire

DDM : Dodécylmaltoside

DMPC : Dimyristoylphosphatidylcholine

DMPE : Dimyristoylphosphatidyléthanolamine

DMPG : Dimyristoylphosphatidylglycérol

DOPC : Dioléoylphosphatidylcholine

DOPG : Dioléoylphosphatidylglycérol

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EPC : Phosphatidylcholine d'oeuf

EPE : Phosphatidyléthanolamine d'oeuf

ES-MS : Spectrométrie de masse electrospray

FC12 : Fos-choline 12

FC14 : Fos-choline 14

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique

HET-SOFAST HMQC : Heterogeneity band-selective optimized-flip-angle short-transient heteronuclear multiple-quantum correlation

HSQC : Heteronuclear Single-Quantum Coherence

IPTG : Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

kDa : kilo Dalton

LB : Luria-Bertani

MES : Acide 4-morpholineéthanesulfonique

MOPS : Acide 4-morpholinepropanesulfonique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ORF : Open Reading Frame

pb : Paire de bases

PCR : Polymérisation chain reaction

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

rpm : Round per minute

RPS : Résonance Plamonique de Surface

SDS-PAGE : Sodium dodécylsulfate Polyacrilamide gel electrophoresis

TB : Terrific Broth

Tris : 2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol

# *Avant-propos*



# Avant-propos

## Présentation du manuscrit

Le premier chapitre de ce manuscrit, appelé Introduction, présente le contexte de l'étude de la résistance aux métaux, au cuivre en particulier, chez les bactéries. Je présente successivement, du plus général au plus spécifique, les métaux lourds en biologie, le cas du cuivre, l'homéostasie du cuivre chez les bactéries pour finir par l'analyse du cas de la souche *Cupriavidus metallidurans* CH34. Une dernière partie décrit plus précisément mon sujet de thèse, en insistant sur les protéines ayant fait l'objet de mon travail : les transporteurs membranaires CusA et CzcA chez *E. coli* et *C. metallidurans* CH34 (premier projet de thèse), et la protéine CopH chez *C. metallidurans* CH34 (second projet de thèse, chronologiquement).

Les explications du chapitre « Matériel et méthodes » se veulent assez détaillées afin de pouvoir d'une part étudier, reproduire et s'inspirer des expériences effectuées et d'autre part comprendre au mieux les différentes techniques de caractérisation physicochimique, leur intérêt, les principes physiques sur lesquels elles reposent, les appareils utilisés, et le type de résultats obtenus.

Les résultats sont présentés en deux grands chapitres.

Le premier traite de l'étude de la protéine CopH. Après présentation des premiers résultats (publiés en Mars 2006 – Sendra, V. *et al.* 2006), l'accent est porté sur l'analyse de l'interaction Cop-Cu en termes d'affinité, de stoechiométrie, de géométrie, de nombre de sites accueillant le cuivre, en s'interrogeant également sur le nombre et la nature des ligands du cuivre.

Le second s'intéresse à l'obtention et à la purification des transporteurs membranaires CusA et CzcA en insistant sur la démarche choisie, visant à obtenir une préparation protéique homogène. Il présente les diverses méthodes utilisées pour obtenir des préparations moins polydisperses ainsi que la réorientation de l'étude vers l'analyse du comportement de CusA en solution de détergent, par comparaison avec le transporteur AcrB, et ce à l'aide de l'ultracentrifugation analytique.

Enfin, les conclusions et perspectives de l'ensemble de ces travaux trouvent leur place dans un dernier chapitre.

## *Participation aux travaux*

La majeure partie des travaux rapportés ici a été réalisée au laboratoire des Protéines Membranaires, à l'Institut de Biologie Structurale (IBS).

Les expériences de IRTF ont été réalisées d'abord dans le laboratoire de James Sturgis à Marseille où j'ai été formée puis au LEDSS (Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité), sur le campus de Grenoble, avec un spectromètre placé sous la responsabilité de Didier Gaude. Les reconstitutions en cristaux 2D et les analyses par microscopie électronique ont été possibles grâce à l'aide de Jean-Louis Rigaud à l'Institut Curie à Paris. Les essais de reconstitution en protéoliposomes et les analyses d'activité du transporteur CzcA par fluorescence ont été effectués dans le laboratoire de Dietrich H. Nies à Halle en Allemagne où j'ai été accueillie pendant deux semaines. Les expériences d'ultracentrifugation analytique ont été mises en œuvre et analysées avec, puis par David Stroebel, avec une centrifugeuse gérée par Christine Ebel, à l'IBS.

Les expériences de spectrométrie de masse ont été effectuées par David Lascoux (Laboratoire de Spectrométrie de Masse à l'IBS), les expériences de RPE par Serge Gambarelli (Laboratoire de Résonance Magnétique au CEA-Grenoble), et les expériences de RMN par Beate Bersch (Laboratoire de RMN à l'IBS). Les essais d'immunoprécipitation ont été réalisés dans le laboratoire de Ruddy Wattiez à Mons en Belgique, où j'ai été accueillie pendant deux semaines. Les expériences de microcalorimétrie ont été effectuées au CERMAV, sur le campus de Grenoble, dans le laboratoire d'Anne Imberty. Les expériences de dichroïsme circulaire ont été menées à l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) à Grenoble.

# *Introduction*





## *Introduction*

### **I - Les métaux lourds en biologie**

Les ions métalliques sont des éléments essentiels à la vie en participant à de nombreuses réactions métaboliques dans toutes les cellules vivantes, chez les organismes procaryotes ou eucaryotes (Williams, R. J. P. et Frausto da Silva, J. J. R. 2006).

Il existe différentes catégories de métaux. Les métaux électrolytes comme le sodium, le potassium, ou le calcium jouent un rôle central dans notre métabolisme cellulaire en contribuant à maintenir une force ionique adaptée ou en intervenant dans les phénomènes de transmission du signal. Les métaux lourds, dénommés ainsi en raison de leur densité élevée (supérieure à 5 g/cm<sup>3</sup>), peuvent également jouer un rôle très important au sein de la cellule. Par exemple, le fer, comme le cuivre (métal qui fait l'objet de cette thèse), éléments centraux du site catalytique de nombreuses enzymes, interviennent dans le transport de l'oxygène. Le zinc participe à la stabilité structurale des protéines ainsi qu'à la régulation de la pression osmotique. Le calcium, le magnésium et le zinc aident à stabiliser l'ADN en participant à des interactions électrostatiques.

En revanche, d'autres métaux lourds tels que le cadmium, le mercure, le palladium, l'or, ou le plomb n'ont pas de fonctions physiologiques connues (Nies, D. H. 1999) et sont purement toxiques pour la cellule. Ils sont capables d'entrer en compétition avec les métaux essentiels, en particulier au niveau de groupements thiols ou dans les sites de liaison à l'oxygène, ce qui peut provoquer l'inhibition de l'activité de certaines enzymes, la déstructuration de protéines et/ou de l'ADN, la perturbation de l'équilibre osmotique, la génération d'un taux élevé d'espèces activées de l'oxygène (ROS) comme les radicaux hydroxyles OH<sup>•</sup> responsables de nombreuses lésions cellulaires...

L'action des ions métalliques essentiels peut également provoquer des dommages au sein de la cellule. La régulation de ces ions (ou contrôle de l'homéostasie) est donc vitale. L'homéostasie résulte de l'action coordonnée, strictement régulée, de leurs systèmes de prise en charge, de stockage, et de sécrétion. Les transporteurs de faible et de haute affinité agissent de conserve pour maintenir le bon équilibre des concentrations en métaux lourds. Un léger dérèglement de l'homéostasie d'un ion métallique peut entraîner une pénurie ou un excès d'un élément métabolique vital, et provoquer des maladies graves, voire des dommages menant à la mort cellulaire. Par exemple, une absorption anormale de fer peut être à l'origine de la maladie

héréditaire la plus commune, l'hémochromatose. Un défaut d'absorption du cuivre provoque les maladies de Menkes ou de Wilson. Certaines maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer ou les maladies relatives au prion sont liées à un dérèglement de l'homéostasie du cuivre. Ainsi, l'activité réduite d'un seul transporteur d'ion métallique peut causer l'arrêt de la croissance cellulaire alors que l'activité excessive du même transporteur peut être toxique et entraîne également la mort de la cellule (Nelson, N. 1999).

En revanche, un excès de métal peut induire un phénomène de résistance. Par exemple, l'utilisation d'antimicrobiens et fongicides dans l'agriculture a entraîné l'apparition d'une souche d'*E. coli* possédant le plasmide pRJ1004 permettant une résistance accrue au cuivre. De son côté, la souche *Cupriavidus metallidurans* CH34 possède des capacités élevées de résistance à de nombreux métaux grâce à une plasticité génomique importante et à la présence de nombreux déterminants génétiques plasmidiques : elle arrive à survivre dans des environnements riches en ions métalliques et constitue une souche modèle pour l'étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds.

## 1.1 Les métaux lourds : définition et propriétés

### 1.1.1 Définition

Parmi les éléments recensés dans la classification périodique de Mendeleïev, 53 sont considérés comme des métaux lourds (Fig. 1). Ce sont les métaux ayant une densité supérieure à 5 g/cm<sup>3</sup>.

Figure 1 : Tableau périodique des éléments. Les métaux alcalins sont encadrés en orange, les alcalino-terreux en rouge, les métaux de transition en bleu et les autres métaux en violet. Les actinides et lanthanides sont en jaune. Le cuivre, métal d'intérêt pour cette thèse, est entouré en rose.

**Figure 1** : Tableau périodique des éléments. Les métaux alcalins sont encadrés en orange, les alcalino-terreux en rouge, les métaux de transition en bleu et les autres métaux en violet. Les actinides et lanthanides sont en jaune. Le cuivre, métal d'intérêt pour cette thèse, est entouré en rose.

La composition de l'eau de mer peut constituer une référence en termes de concentration en métaux lourds. On distingue quatre types de métaux lourds au titre d'éléments traces. Une première classe regroupe les éléments les plus fréquents, comme le fer, le zinc ou le molybdène, et présents à des concentrations comprises entre 100 nM et 1 µM. La deuxième catégorie regroupe les éléments dont les concentrations sont comprises entre 10 nM et 100 nM (Ni, Cu, As, V, Mn, Sn, U). Les éléments plus rares comme le cobalt, le cérium, l'argent ou l'antimoine représentent un troisième groupe ; la dernière catégorie rassemble les éléments dont la concentration est juste inférieure à 1 nM (Cd, Cr, W, Ga, Zr, Th, Hg, Pb). La cellule est considérée comme indifférente aux éléments présents à une concentration plus faible que 1 nM. Ces éléments ne sont susceptibles d'être ni utiles ni toxiques pour la cellule (Nies, D. H. 1999).

### 1.1.2 Propriétés chimiques

La plupart des métaux lourds sont des éléments de transition. Ceux-ci possèdent par définition des orbitales d incomplètes qui constituent leur couche de valence. Ils peuvent donner des cations métalliques formant des complexes afin de compléter leurs orbitales. Ces complexes ont très souvent des propriétés redox. C'est pourquoi, lorsqu'ils sont à l'état de traces, les cations métalliques jouent un rôle important dans certaines réactions biochimiques. A haute concentration cependant, ils forment des complexes non spécifiques toxiques pour la cellule. Les éléments présents dans la cellule et essentiels à l'état de traces, comme  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$ , sont toxiques à plus hautes concentrations (Nies, D. H. 1999), ce qui rend indispensable le contrôle strict de l'homéostasie des ions métalliques.

Les métaux de transition comme le cuivre, l'argent, l'or, le cadmium, le platine ou le mercure ont des propriétés de polarisabilité élevée : le nuage électronique de l'atome se déforme facilement en présence d'un champ électrique. Ils appartiennent à la classe des « métaux ou acides mous » selon la terminologie de Lewis (Pearson, R. G. 1963) (Tab. 1). Ils sont généralement assez gros et leur charge est faible. Leur polarisabilité leur permet de former des liaisons de coordination avec des « bases molles », telles que les thiolates (réactifs par leur atome de soufre) ou les imidazoles (réactifs par leur atome d'azote). Par exemple, le Cu(I) se lie aux thiolates des cystéines.

A l'inverse, les « acides de Lewis durs », comme le cobalt (III), ont une faible polarisabilité : leur nuage électronique est plus ramassé autour du noyau. Ils échangent donc moins facilement leurs électrons et ne participent qu'à des liaisons électrostatiques.

Acides durs	$Li^+$ , $Na^+$ , $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Cr^{3+}$ , $Fe^{3+}$ , $Co^{3+}$
Acides à la frontière	$Fe^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Sn^{2+}$
Acides mous	$Cu^+$ , $Ag^+$ , $Cd^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , $Pd^{2+}$ , $Au^+$

**Tableau 1** : Exemples d'ions acides durs et acides mous (Williams, R. J. P. et Frausto da Silva, J. J. R. 2006)

## 1.2 Effets des métaux sur le vivant

Le rôle biologique des métaux dépend de la chimie du métal, notamment de sa solubilité dans les conditions physiologiques. Lorsque le métal est disponible (concentration supérieure à 1 nM), son importance biologique est déterminée par sa toxicité. Parmi les 22 métaux lourds disponibles, les cations tri- et tétravalents, comme l'étain, le cérium, le gallium,

le zirconium et le thorium n'ont pas d'influence biologique en raison de leur faible solubilité. A l'inverse, le fer, le molybdène et le manganèse sont des éléments traces importants, à faible toxicité. Le zinc, le nickel, le cuivre, le vanadium, le cobalt, le tungstène et le chrome sont des éléments toxiques avec une importance biologique modérée à haute. Enfin, l'arsenic, l'argent, l'antimoine, le cadmium, le mercure, le plomb et l'uranium ont des fonctions très limitées et sont considérés comme toxiques (Nies, D. H. 1999).

Ainsi, en raison de leur disponibilité et leurs propriétés chimiques, seuls quelques métaux sont utilisables par les êtres vivants. Leurs propriétés redox et leurs propriétés de liaison confèrent à ces métaux lourds un rôle important dans diverses réactions biochimiques ainsi que dans la structure des protéines. Par exemple, le manganèse est un accepteur d'électrons utilisé par les bactéries. Le cuivre, le nickel, le cobalt et le zinc sont des cofacteurs de centres catalytiques de nombreuses enzymes. Le fer et le cuivre constituent les centres d'oxydoréduction de transporteurs d'électrons indispensables aux activités bioénergétiques comme la respiration. Le zinc de son côté est un acide de Lewis fort qui joue un rôle clé dans la stabilité structurale de nombreuses protéines dont les protéines à doigts de zinc (Eide D. J. 2001). L'importance de ces ions métalliques est révélée par les nombreuses maladies connues chez l'homme et résultant soit d'un défaut dans l'entrée des ions, soit d'un défaut de mobilisation interne. Ainsi près de 30 % de la population mondiale souffre d'anémies dues à des déficiences en fer. De même, un défaut d'absorption du cuivre peut être à l'origine des maladies de Wilson ou de Menkes (Mercer, J.F.B. *et al.* 2001).

Les propriétés qui rendent ces métaux essentiels les transforment en éléments toxiques dès que leur concentration devient trop élevée. Des surcharges en fer, liées à un défaut dans l'exportation des ions, conduisent, par exemple, aux thalassémies, aux cataractes, ou à l'hémochromatose. Un dérèglement dans l'homéostasie du cuivre peut être à l'origine de troubles neurologiques graves (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, maladies dues au prion...). Ceci favorise la formation de complexes non spécifiques : les cations métalliques ont tendance à se lier aux groupements sulfures, provoquant l'inhibition de certaines enzymes. Certains cations métalliques peuvent entrer en compétition avec des ions physiologiques,  $\text{Cd}^{2+}$  avec  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  avec  $\text{Fe}^{2+}$ , et  $\text{Zn}^{2+}$  avec  $\text{Mg}^{2+}$ , ce qui inhibe ainsi la fonction propre de ces derniers (Nies, D. H. 1999). Un autre exemple est celui du nickel, qui a la faculté de se solubiliser dans les lipides et donc dans la graisse sous-cutanée. Ainsi, sous la forme  $\text{Ni}^{2+}$ , il peut interagir avec les acides aminés de la peau tels que les histidines ou les cystéines (Savolainen, H. 1996).

Enfin, leurs propriétés redox conduisent les métaux lourds à catalyser la formation de radicaux libres créant alors un stress important (Nelson, N. 1999 ; Nies D.H. 1999).

### **1.2.1 Les métaux lourds non physiologiques, une toxicité prononcée dans la cellule : exemples du cadmium et du mercure**

Des métaux lourds comme le cadmium, le plomb ou le mercure n'ont généralement pas de fonction physiologique connue. La seule exception concerne une anhydrase carbonique récemment découverte chez un organisme du phytoplancton, *Thalassiosira weissflogii* (Lane, T. W. *et al.* 2005 ; Park, M. *et al.* 2007). Cette anhydrase carbonique est impliquée dans la prise en charge de carbone inorganique au cours du processus de photosynthèse. Elle possède un site cadmium essentiel à sa fonction.

En raison de leurs propriétés chimiques similaires (taille, charge, polarisabilité...), ces métaux peuvent entrer en compétition avec les métaux essentiels sans pouvoir jouer leur fonction, ce qui, indirectement, induit leur toxicité. Par exemple, la grande affinité du mercure pour les groupements thiols provoque un déplacement des métaux essentiels de leurs sites de liaison (Rooney, J. P. 2007). Ceci peut provoquer un arrêt partiel ou complet du métabolisme cellulaire (arrêt de certaines activités enzymatiques, déstructuration des protéines ou de l'ADN, perturbation de l'équilibre osmotique ou création d'espèces activées de l'oxygène...).

Le cadmium est un métal de transition purement toxique pour la cellule. Sa solubilité élevée fait de lui l'un des métaux lourds les plus dangereux après le mercure (Nies, D. H. 1999). Dans les années 1950, une intoxication aiguë au cadmium s'est déclarée au Japon, provoquant une maladie des os, appelée « itai-itai », soit « aïe-aïe », en référence aux extrêmes douleurs éprouvées par les patients (Elinder, C. G. 1985). Le cadmium est aussi soupçonné de jouer un rôle dans les cancers (Pearson, C. A. et Prozialeck, W. C. 2001), en particulier le cancer de la prostate.

### **1.2.2 Les métaux physiologiques : exemple du fer et du cuivre**

Bien qu'ayant des propriétés très proches des métaux toxiques, les métaux physiologiques sont essentiels au fonctionnement de la cellule.

Le fer est un élément de transition essentiel à la fonction biochimique de nombreuses protéines. Dans les systèmes biologiques, ses états d'oxydation oscillent entre l'état ferreux Fe(II), ferrique Fe(III) et ferryl Fe(IV). Cette réactivité chimique utilisée par la cellule peut se

révéler bénéfique. Les ions fer peuvent ainsi être impliqués dans le transport (hémoglobine), le stockage et l'activation (myoglobine) de l'oxygène moléculaire. Ils interviennent également dans la réduction des ribonucléotides par les ribonucléotide réductases (Ollagnier, S. *et al.* 1997) et dans la réduction de l'azote, dans l'activation et la décomposition des peroxydes et dans le transport des électrons *via* divers systèmes de transport. Le stockage du fer est assuré par la ferritine et son transport par la transferrine. De leur côté, les cytochromes *c* sont des protéines à hèmes ferriques qui interviennent dans les processus d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire (Andrews, N. C. et Schmidt, P. J. 2007). Enfin, les protéines fer-soufre constituent un groupe très important de protéines intervenant dans les transferts d'électrons, la catalyse de réactions redox ou non redox, la régulation de processus biologiques dont l'expression de gènes, la structuration de la chaîne peptidique... Ces protéines sont constituées de différents types de centres métalliques : les centres [2Fe-2S] (comme chez la ferrédoxine (Ta, D. T. et Vickery, L. E. 1992)), les centres [4Fe-4S] généralement constitués de deux unités [2Fe-2S] (comme chez la biotine synthase (Ollagnier-De-Choudens, S. *et al.* 2002), et les centres [3Fe-4S], résultant de la dégradation oxydative des centres [4Fe-4S] (Johnson, D. C. *et al.* 2005).

Le cuivre est également impliqué dans de multiples activités nécessaires à la survie cellulaire (Rae, T. D. *et al.* 1999). Ses deux rôles les plus récurrents sont le transport d'oxygène et le transfert d'électrons. Le cuivre est le métal d'intérêt au centre de cette thèse : la section II lui est consacrée.

### 1.3 Homéostasie des métaux lourds

A l'origine, la vie est apparue dans des eaux enrichies en espèces métalliques variées. Les premières formes de vie ont dû s'adapter à des concentrations élevées en métaux, ce qui a donné naissance à des mécanismes de résistance. Ainsi, les cellules ont développé des systèmes très efficaces de contrôle de la concentration en métaux permettant un apport suffisant et une élimination efficace de l'excès pour maintenir l'intégrité cellulaire. L'homéostasie correspond à un subtil équilibre gouverné par cette dualité des métaux à la fois essentiels à l'état de traces et toxiques lorsqu'ils sont présents en quantités excessives.

### 1.3.1 Entrée, devenir et sortie des métaux

◆ **Entrée** Les procaryotes utilisent deux types de systèmes servant à l'entrée des métaux lourds à l'intérieur des cellules. Le premier est un système passif. Constitutif de la cellule, il est de faible affinité et rapide. Il est emprunté par une grande variété de substrats. Il est constitué principalement par des protéines de la famille MIT (Metal Inorganic Transport) et est emprunté par la plupart des cations pour entrer à l'intérieur des cellules ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ...). Il utilise généralement l'énergie du gradient osmotique à travers la membrane plasmique des bactéries. Ce système n'étant pas spécifique d'un ion particulier, n'importe quel ion peut entrer dans la cellule, en particulier dans le cas où il est présent en très grande concentration : c'est pourquoi les ions métalliques deviennent toxiques (Nies, D. H. 1999). Le second système de transport est un système actif, de haute affinité pour le substrat. Il est plus lent, et utilise souvent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Il est inductible et produit par les cellules dans des conditions limitantes en ions métalliques ou dans une situation métabolique particulière. Il regroupe les ATPases de type P (telles que CopA pour le transport du Cu(I) chez *E. hirae* (Odermatt, A. *et al.* 1993), les ATPases de type A pour le transport de l'arsenic, et les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) spécifiques du  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ... (Nies, D. H. 1999 ; Gatti, D. *et al.* 2000)

Afin de maintenir l'homéostasie des métaux, la plupart des organismes utilisent une combinaison des deux systèmes. L'import d'un ion peut être régulé soit par inhibition de la machinerie d'import, soit en rendant le métal indisponible à l'absorption. A ce jour, aucun de ces deux systèmes de régulation n'est connu chez les procaryotes. En revanche, chez les mammifères, le taux de fer est par exemple partiellement régulé, lors de la transcription, par le contrôle de la concentration en récepteurs membranaires de la transferrine, protéine de transport du fer. De son côté, le champignon *Neurospora crassa* semble pouvoir chélater les métaux dans le milieu extérieur grâce aux polysaccharides présents à la surface de la cellule (Dameron C. T. et Harrison M. D. 1998).



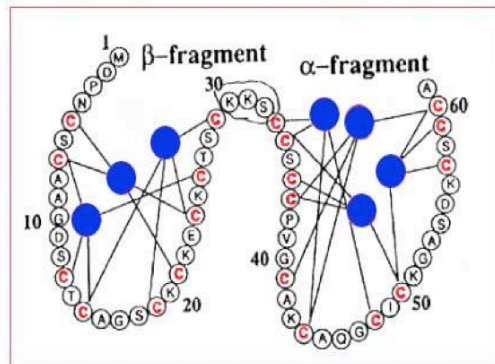
◆ **Devenir** Comme les ions métalliques ne peuvent pas être dégradés ou modifiés comme les composés organiques toxiques, les systèmes de résistance aux métaux lourds ne peuvent utiliser que trois mécanismes possibles : la complexation, la réduction et l'efflux (Nies, D. H. 1999).

### \* **La formation de complexes**

Dans une cellule, les ions métalliques semblent n'être pratiquement jamais à l'état d'ions libres (Rae, T. D. *et al.* 1999 ; Outten, F. W. *et al.* 2001). La complexation permet le stockage temporaire des cations appelés « sulfur lovers » par des composés soufrés, comme les groupements thiols de certaines enzymes. Chez les bactéries gram-négatives, la formation de complexes met en jeu le glutathion et les thiorédoxines (Eide, D. J. 2001), deux systèmes réducteurs des thiols dans les cellules. Le glutathion est un assemblage de trois acides aminés : un acide glutamique, une cystéine et une glycine. Sa concentration peut varier de 0,5 à 10 mM selon le type d'organisme. Le glutathion peut s'assembler en chaînes et constituer les phytochélatines, d'abord décrites chez les végétaux (Grill, E. *et al.* 1987) mais également présentes chez les animaux (Cobbett, C. S. 1999). Leur structure est  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  avec  $n$  variant de 2 à 11. Ces phytochélatines forment des complexes avec le cadmium, l'argent et le cuivre *in vivo* et avec le plomb, le mercure et l'argent *in vitro*.

Les métallothionéines (MT) jouent également un rôle essentiel dans la complexation des métaux comme Cd(II), Zn(II), Cu(I). Ce sont des petites protéines, de faible masse moléculaire (4 à 8 kDa). Elles sont généralement riches en cystéines (environ 30 %), sans histidine ni acide aminé aromatique, et sont constituées de deux domaines  $\alpha$  et  $\beta$ , chacun présentant un cluster métal-thiolate. Des motifs Cys – X – Cys, où X est un acide aminé autre que la cystéine, ou Cys – Cys sont impliqués dans la liaison d'ions métalliques divalents (Fig. 2). Les MT sont présentes chez l'homme, les bactéries et les plantes. Chez l'homme, elles sont codées par au moins 10 gènes. Elles joueraient plusieurs rôles tels que la détoxification des métaux non essentiels comme Cd ou Hg, la détoxification et le stockage des métaux essentiels, en excès, comme Cu ou Zn (Presta, A. et Stillman, M. J. 1997 ; Tapia, L. 2004), la séquestration des radicaux et des espèces réactives de l'oxygène, agents alkylants ou peroxy-nitrite, et le transfert ou le transport des métaux lourds essentiels. Tous ces rôles biologiques s'expliquent par l'existence de la liaison soufre-métal. Des métallothionéines régulent par exemple la concentration intracellulaire en zinc (Robinson, N. J. *et al.* 2001 ; Blindauer, C. A. *et al.* 2001). Le mécanisme de complexation des métaux lourds chez les plantes fait intervenir les métallothionéines et les phytochélatines (Cobbett, C. S. 2000). Enfin,

dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la métallothionéine codée par le gène *cup1* est induite quand le cuivre est présent en excès dans le milieu de culture (Jensen, L. T. *et al.* 1996).



**Figure 2** : Représentation schématique d'une métallothionéine eucaryote. Les deux domaines de la protéine (fragments  $\alpha$  et  $\beta$ ) lient respectivement 4 et 3 atomes de cadmium.

Cependant, le coût énergétique de la complexation étant très élevé, la formation de complexes n'est une voie efficace de détoxification que dans le cas de cellules procaryotes exposées à des métaux lourds en faible concentration. Par exemple, la détoxification d'un ion cadmium par la formation d'une molécule de CdS nécessite 16 molécules d'ATP (1 ATP pour la prise en charge du sulfate, 3 ATP pour la formation de PAPS (Phosphoadénosine-5'-phosphosulfate), 3 ATP pour sa réduction en sulfite et enfin 9 ATP pour la réduction du sulfite en sulfure CdS) ! Pour comparaison, l'efflux d'un ion  $\text{Cd}^{2+}$  ne coûte, en énergie, qu'une seule molécule d'ATP (Nies, D. H. 1999).

### \* *La réduction*

Un procédé, utilisé par divers micro-organismes pour éliminer les métaux, est la réduction du métal jusqu'à un état d'oxydation moins toxique. Pour être réduit, le métal doit posséder un potentiel redox compris entre celui des couples hydrogène/proton (-421 mV) et oxygène/hydrogène (+808 mV) ; ceci représente l'échelle physiologique redox pour la plupart des cellules aérobies. Ainsi, le mercure (II) (+430 mV), l'arsenate (+139 mV) et le cuivre (-268 mV) peuvent être réduits dans la cellule alors que ce n'est pas le cas pour le zinc (-1180 mV), le cadmium (-824 mV), le cobalt (-701 mV) et le nickel (-678 mV). Dans le cas idéal du mercure, Hg(II) est réduit en Hg(0) volatil. La plupart des produits de réduction sont soit insolubles ( $\text{Cr}^{3+}$ ), soit encore plus toxiques ( $\text{AsO}^{2-}$ ) que les espèces non réduites. Ainsi, la réduction est nécessairement couplée à la séquestration de l'ion réduit, qui l'empêche de nuire, ou à l'efflux qui élimine le composé réduit (Nies, D. H. 1999).

◆ *Sortie* Enfin, des systèmes d'efflux permettent de réduire l'accumulation intracellulaire de métaux lourds. Par exemple, il existe, chez la levure, une pompe à cadmium codée par le gène *ycf1* (Li, Z. S. *et al.* 1997). La surexpression de *ycf1* permet la croissance de la levure jusqu'à une concentration en cadmium de 500  $\mu\text{M}$ . Ce transporteur, situé dans la membrane de la vacuole, permet d'extraire le métal du milieu cytoplasmique. Ce mécanisme de détoxification est également largement utilisé chez les procaryotes. Il fait intervenir des ATPases de transport à zinc, cadmium, plomb, cuivre, argent ou arsenic...

### 1.3.2 Des systèmes intégrés

La capacité à résister aux métaux lourds est très variable d'un organisme à l'autre (Rouch, D. A. 1995). Par exemple, la bactérie *Cupriavidus metallidurans* présente une bonne résistance à de très nombreux métaux, comme par exemple au plomb (Diels, L. *et al.* 1995). *Pseudomonas putida* résiste à de fortes concentrations en cadmium (Horitsu, H. *et al.* 1986). Une résistance au cobalt a été révélée chez *Synechocystis PCC 6803* (Garcia-Dominguez, M. *et al.* 2000) et *Escherichia coli* résiste à de hautes concentrations en zinc (Rensing, C. *et al.* 1997). Ces phénomènes de résistance font le plus souvent appel à des opérons qui sont à l'origine d'une défense rapide et efficace de la cellule, comme dans le cas de

la résistance au cuivre chez *Pseudomonas syringae* (Bender C. L. et Cooksey, D. A. 1986), *Enterococcus hirae* (Odermatt A. *et al.* 1992) ou *C. metallidurans* CH34 (voir paragraphe IV). Un autre exemple est donné par la bactérie *Bacillus subtilis*, qui fait appel à l'ATPase CopA et la métallo-chaperonne CopZ au travers de l'opéron *copZA*, en présence de cuivre. La protéine régulatrice CueR induit alors la transcription de l'opéron *copZA* : l'efflux du métal est alors assuré par l'intervention de la pompe multi-drogues YfmO (Gaballa A. et Helmann, J. D. 2003). L'opéron *mer* a été étudié et révèle la présence d'un système de détoxification du mercure (Lund, P. A. *et al.* 1986). L'opéron *mer* est composé d'un régulateur transcriptionnel MerR, de protéines de transport comme MerT et MerP et d'une protéine appelée MerA impliquée dans la réduction de l'ion mercurique en mercure élémentaire (Fig. 3). Un modèle de résistance au mercure, proposé par Brown dès 1986, implique la prise en charge de Hg(II) par une métallo-chaperonne MerP dès le passage de l'ion à travers la membrane externe de la bactérie. MerP transmet alors le mercure sous la forme Hg(II) à MerT, transporteur localisé dans la membrane interne. Une dernière étape de ce processus de résistance est attribuée au passage de l'ion de MerT à la réductase MerA dans le cytosol. Ainsi ce mécanisme implique paradoxalement une internalisation du mercure avant sa réduction en mercure élémentaire Hg(0) et son évacuation de la cellule par diffusion passive (Brown, N. L. *et al.* 2002).

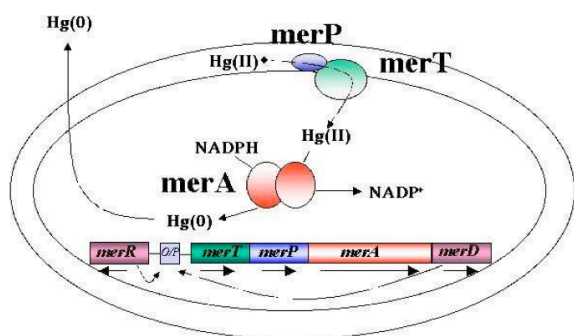


Figure 3 : Représentation schématique de l'opéron *mer*

## II - Le cuivre

### 2.1 Le métal

#### 2.1.1 Caractéristiques

Le cuivre est un des rares métaux qui existent à l'état natif, ce qui explique probablement pourquoi il a été le premier métal utilisé par l'homme dès la préhistoire. Il fut extrait dès 3500 av. J. C., au Moyen-Orient, par réduction du minerai avec du charbon de bois. 500 ans plus tard, l'âge de Bronze débuta avec l'ajout d'étain au cuivre afin d'obtenir un métal plus dur.

Le cuivre est un métal de transition, de numéro atomique  $Z = 29$ . Sa configuration électronique est :  $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$ . La croûte terrestre contient 68 ppm de cuivre. Sa température de fusion est de  $1083^\circ\text{C}$  et sa densité de 8,93. Il possède des conductivités thermique ( $401 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ ) et électrique ( $59,6 \times 10^6 \text{ S}/\text{m}$ ) très élevées, juste après celles de l'argent. C'est un métal malléable et ductile. Il possède trois états d'oxydation (Cu(I), Cu(II), Cu(III) (Zacharias, P. S. et Ramachandraiah, A. 1985)). Il forme essentiellement deux types de composés, les composés cuivreux (I) et cuivriques (II). Le cuivre métallique est assez résistant à la corrosion et n'est pas attaqué par l'air sec, l'eau, ou les acides non-oxydants. L'oxyde de cuivre I ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) se rencontre naturellement sous forme d'un minerai rougeâtre appelé cuprite. L'oxyde de cuivre II est noir et est obtenu en chauffant du cuivre sous forme métallique dans l'air. A l'air humide, le cuivre se couvre d'une couche de carbonate basique de cuivre, couche de passivation vert pâle appelée vert de gris, ou d'une couche d'oxyde noir.

#### 2.1.2 Production

Le cuivre peut se trouver à l'état naturel, mais on le trouve le plus fréquemment sous la forme de sulfites, d'oxydes ou de carbonates. Les principaux minerais rassemblent les pyrites, comme la chalcopryrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), la cuprite ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) et la malachite ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ). Après avoir été extrait, le cuivre subit une fusion et un affinage. En plus du cuivre produit dans les exploitations minières, une proportion importante de cuivre affiné provient de matériaux recyclés. On estime que le cuivre recyclé représente environ 13 % de la production totale et 30 % de la consommation mondiale de cuivre. Les principaux producteurs sont le Chili (37 %), les Etats-Unis (8 %), le Pérou (7 %) et l'Indonésie (6 %). Le premier consommateur de cuivre

est la Chine qui absorbe 22 % de la production mondiale. Le prix du cuivre (5500 euros/tonne) en fait un métal très prisé.

### 2.1.3 Utilisations

Le cuivre est un des premiers métaux à avoir été utilisés pour fabriquer des outils et des armes. Certains sels de cuivre ont également été employés comme agents thérapeutiques pendant plus de 2000 ans. Le sulfate de cuivre a médicalement servi d'émétique mais constituait aussi une arme populaire en tant que poison. Il jouait également le rôle d'abortif en France au 19<sup>e</sup> siècle.

Aujourd'hui, le cuivre pur est très employé dans l'industrie électrique (fils, câbles électriques et de télécommunication, bobines de moteurs électriques...) du fait de sa grande conductivité électrique. Les utilisations de ce métal ont considérablement augmenté avec la mise au point de nombreux alliages améliorant les propriétés mécaniques du cuivre,. Parmi les alliages les plus courants figurent le laiton (cuivre et zinc) - utilisé en particulier dans la marine pour ses propriétés anticorrosives - et le bronze (cuivre et étain). Le cuivre est également utilisé dans l'industrie du bâtiment pour la confection de lignes de distribution de gaz. Ses vertus bactéricides et antifongiques et sa ductilité ont aussi, comme dans le cas du plomb, justifié son utilisation dans les canalisations d'eau, les toitures et les gouttières. Les sulfures de cuivre sont employés pour la fabrication d'instruments de cuisine. Le cuivre sous forme d'oxyde est utilisé en céramique pour ses propriétés colorantes : bleu turquoise en milieu oxydant, il développe la couleur rouge vif en milieu réducteur. Le cuivre est également employé comme pesticide (graines et vignes) sous forme de sels, comme la bouillie bordelaise préparée à base de sulfate de cuivre. Le sulfate de cuivre est aussi utilisé dans le blanchiment et l'industrie du cuir... Enfin le cuivre est couramment utilisé en laboratoire comme cible dans les tubes à rayons X.

## 2.2 Le cuivre en biologie : un métal essentiel dont l'homéostasie est finement orchestrée

A l'origine, l'atmosphère de la Terre était hautement réductrice et anaérobie. Le cuivre se trouvait à l'état réduit Cu(I) sous la forme de sulfites hautement insolubles et n'était donc pas disponibles pour les processus biologiques. La production de dioxygène par les cyanobactéries aurait commencé il y a environ de  $3 \times 10^9$  années. L'oxygène produit a été initialement consommé dans l'oxydation des ions ferreux dans les océans et la concentration de

dioxygène n'a pu devenir significative dans l'atmosphère que 200 à 300 millions d'années plus tard. Cet évènement majeur bouleversa la vie sur Terre et la modifia de manière irréversible. La plupart des micro-organismes durent s'y adapter en se dotant d'un métabolisme oxydatif. Les propriétés d'oxydoréduction des enzymes à cuivre, fonctionnant auparavant à bas potentiels redox, évoluèrent pour atteindre de plus hauts potentiels redox, compris entre 200 et 800 mV, nécessaires en conditions aérobies. L'oxydation du cuivre (I) insoluble produit des ions Cu(II) solubles, plus facilement disponibles et capables d'oxyder le dioxygène. Enfin, avec l'apparition de l'oxygène sur Terre, des organismes multi-cellulaires purent se développer.

Aujourd'hui, plus de trente types de protéines à cuivre sont répertoriés. Ces protéines possèdent principalement deux fonctions : le transfert d'électrons ainsi que le transport et l'activation du dioxygène pour le fonctionnement des processus vitaux comme la respiration, la protection contre le stress oxydatif, la pigmentation ou la coagulation du sang (Puig, S. et Thiele, D. J. 2002). Les enzymes à cuivre utilisent le métal comme donneur/accepteur d'électrons grâce aux deux états redox Cu(I) et Cu(II).

Cependant, les propriétés d'oxydoréduction du cuivre peuvent également provoquer des dommages au sein de la cellule. C'est pourquoi l'homéostasie du cuivre est devenue une nécessité dans l'évolution du métabolisme aérobie. En conditions anaérobies, le cuivre passe de l'état Cu(II) à l'état Cu(I). Les systèmes de prise en charge du cuivre doivent d'abord être spécifique pour assurer la régulation de la concentration du cuivre en présence d'autres cations comme le nickel ou le zinc. D'autre part, comme chez la levure où tous les ions cuivre sont pris en charge par des chélateurs, couplés à des systèmes d'efflux (Rae, T. D. 1999), la bactérie doit posséder des protéines permettant la séquestration et le transport du cuivre. En effet, les ions libres deviennent toxiques dans la cellule en créant des radicaux libres (par exemple des radicaux hydroxyles au cours de réactions de type Fenton – voir paragraphe 2.2.4) :



### 2.2.3 Un métal essentiel à la vie à très faible dose

Dans la cellule, différents systèmes ont évolué pour canaliser le pouvoir d'oxydoréduction du cuivre et réguler son homéostasie. Ainsi, le cuivre n'existe pas à l'état d'ion libre dans la cellule mais il est intégré en tant que co-facteur à de nombreuses enzymes clés impliquées dans de multiples activités nécessaires à la survie cellulaire

(Rae, T. D. *et al.* 1999). Il est notamment indispensable au phénomène d'angiogenèse et à la respiration, en participant au transport d'O<sub>2</sub> dans l'hémocyanine. Il participe également à la formation de l'hémoglobine et remplace même le fer pour le transport de l'oxygène chez une espèce d'arthropode, la limule, dont le sang est bleu. Chez l'homme et les mammifères, la concentration en cuivre, régulée par le foie, intervient dans la fonction immunitaire et contre le stress oxydant (Linder, M. C. *et al.* 1998). Le cuivre peut aussi être un groupement prosthétique d'enzymes microbiennes impliquées dans la réduction du nitrite et des oxydes nitreux. Les protéines à cuivre les plus connues sont la tyrosinase (oxydase à cuivre permettant la synthèse de la mélanine), la cytochrome *c* oxydase (dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire), la lysyl oxydase (impliquée dans la formation du collagène), la céruloplasmine, la nitrite oxydase, les laccases...

Le rôle le plus récurrent du cuivre est certainement son implication dans le transfert d'électrons. Ces systèmes de transfert d'électrons sont gérés par des métalloprotéines à cuivre possédant des sites cuivre bien particuliers (voir paragraphe 2.3.2). Par exemple, l'azurine ou la plastocyanine sont impliquées dans le transfert d'un électron. La superoxyde dismutase est nécessaire dans la défense contre les dommages oxydants (Tab. 2) (Frausto da Silva, J. J. R et Williams, R. J. P. 1991).

<b>Protéine ou enzyme</b>	<b>Localisation</b>	<b>Fonction</b>
Cytochrome oxydase	Surface externe de la membrane mitochondriale	Réduction de O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O
Laccase, Tyrosinase, Phénol oxydase	Extracellulaire	Oxydation des phénols (réduction de O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O)
Céruloplasmine	Extracellulaire (plasma sanguin)	Réduction de O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O
Hémocyanine	Extracellulaire (plasma sanguin)	Transport de O <sub>2</sub>
Lysine oxydase	Extracellulaire	Liaison au collagène (réduction de O <sub>2</sub> )
Ascorbate oxydase	Extracellulaire	Oxydation de l'ascorbate (réduction de O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O)
Galactose oxydase	Extracellulaire	Oxydation des alcools primaires des sucres en aldéhydes (réduction de O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Amine oxydase	Extracellulaire	Élimination d'hormones comme l'adrénaline
« Blue proteins »	Membranes (hauts potentiels) ; vésicules thylakoïdes	Transfert d'électrons
Superoxyde dismutase	Cytosol	Dismutation des superoxydes (eucaryotes)

**Tableau 2** : Certaines protéines et enzymes à cuivre : localisation et fonction (Frausto da Silva, J. J. R et Williams, R. J. P. 1991)



## 2.2.4 Toxicité du cuivre

### a - Toxique à hautes concentrations

Lorsque la concentration en cuivre intracellulaire dépasse la concentration autorisée par les systèmes de régulation, le cuivre peut se lier de manière non spécifique et non appropriée à différentes protéines. Il peut également devenir toxique en déplaçant certains cofacteurs métalliques de leurs sites de liaison, induisant ainsi des changements conformationnels et/ou l'inactivation des protéines. L'ion  $\text{Cu}^{2+}$  peut ainsi déplacer  $\text{Zn}^{2+}$  de certains facteurs de transcription (protéines à doigt de zinc) et empêcher leur fixation sur la séquence d'ADN cible (Sarkar, B. 1995).

En cas de surcharge, les ions cuivre se retrouvent aussi en excès à l'état libre ( $10^{-18}$  M constituerait la limite supérieure de la concentration du Cu(II) libre dans des conditions inoffensives pour la cellule (Rae, T. D., *et al.* 1999 ; Lippard, S. J. 1999)). Ils peuvent alors catalyser la formation de radicaux libres et autres espèces activées de l'oxygène (ROS).

### b – Le stress oxydant et la formation de radicaux libres

#### ◆ *Le stress oxydant*

Le cerveau humain produit plus de  $10^{11}$  radicaux libres par jour, et l'équilibre entre l'homéostasie pro-oxydante et anti-oxydante est appelé le « stress oxydant » (création de plusieurs espèces oxygénées réactives potentiellement toxiques – ROS – lorsque l'oxygène moléculaire est réduit en eau ou lors des réactions de Fenton ou de Haber-Weiss). En raison de leur très forte réactivité, les ROS sont très dangereux pour l'intégrité structurale et fonctionnelle de la cellule si leur taux excède les besoins naturels de cette dernière. En effet, ils peuvent soit modifier directement l'ADN, les protéines, les lipides ou initier des réactions en chaîne, étendant encore les dommages provoqués à ces dernières molécules. Ce phénomène affecte de nombreuses fonctions physiologiques. Ils sont aussi à l'origine de l'athérosclérose, les diabètes, les maladies neurologiques, inflammatoires, oculaires, pulmonaires, les maladies du sang, les cancers, l'hypertension... Le cerveau est particulièrement vulnérable au stress oxydatif puisqu'il consomme  $1/5^{\text{e}}$  de l'oxygène total absorbé par l'organisme. De plus, il est riche en acides gras poly-insaturés, particulièrement sensibles aux ROS (voir paragraphe 2.4.2).

◆ *Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)*

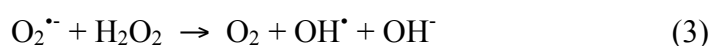
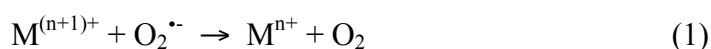
Un radical libre correspond à toute espèce possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Cette définition désigne l'atome d'hydrogène, la plupart des ions métalliques de transition, et la molécule de dioxygène. Cette dernière est en effet un radical par ses deux électrons non appariés situés chacun dans une orbitale non liante  $\pi^*$ . Ainsi,  $O_2$  parviendra à oxyder une autre espèce en acceptant une paire d'électrons de cette dernière, électrons devant posséder des spins parallèles pour s'apparier avec les électrons célibataires des orbitales  $\pi^*$  de l'oxygène. Cette condition, heureusement restrictive, est bénéfique pour la vie sur Terre, dans un environnement riche en oxygène. En outre, de nombreuses enzymes limitent et 'réparent' constamment les dommages oxydatifs tout de même réalisés. Cependant, les métaux de transition, présents au sein des sites actifs de la plupart des oxydases et oxygénases, représentent des candidats de choix capables de remplir la condition restrictive d'oxydation propre à l'oxygène en acceptant ou en cédant des électrons célibataires (Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. C. 1990).

Les espèces réactives de l'oxygène désignent donc toutes les molécules possédant au moins un atome d'oxygène avec un ou plusieurs électrons non appariés, comme par exemple le radical superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ .

En général, les dommages orchestrés par  $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$  sont dus à leur conversion en radicaux bien plus réactifs comme le radical hydroxyl  $HO^{\cdot}$  et le radical  $HO_2^{\cdot}$ .

◆ *Le rôle des ions métalliques*

Les ions métalliques sont présents dans tous les systèmes biochimiques non radiolytiques dans lesquels sont générés des radicaux  $HO^{\cdot}$ . La catalase ou la superoxyde dismutase permettent d'en limiter les effets.  $O_2^{\cdot-}$  réduit les ions métalliques oxydés qui peuvent alors initier la réaction  $M^{n+} + 2 H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + O_2^{\cdot-} + 2 H_2O$ . De là, un cycle de réactions se met en place :



La réaction (2) est appelée réaction de Fenton initiée par un superoxyde. La réaction (3) est appelée réaction de Haber-Weiss, catalysée par un métal.

D'autres agents biologiques réducteurs, comme l'acide ascorbique, peuvent remplacer  $O_2^{\cdot-}$ .

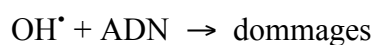
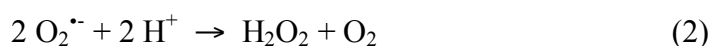
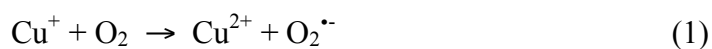
### ◆ *Les dommages oxydants à l'ADN in vivo*

Lorsqu'une cellule subit un stress oxydant, par exemple par augmentation de la concentration intracellulaire de  $O_2^{\cdot-}$  et de  $H_2O_2$ , ou à la suite d'un traitement au peroxyde d'hydrogène, ou encore après avoir été exposée à la fumée de cigarette, les brins d'ADN peuvent être sérieusement altérés. Certaines endonucléases, mais également le peroxyde d'hydrogène, peuvent en être responsables. Dans le cas où  $H_2O_2$  parvient à atteindre le noyau, il peut réagir avec les ions métalliques intracellulaires pour donner des radicaux  $OH^{\cdot}$  capables de fragmenter l'ADN au niveau de sites spécifiques.

### ◆ *Le métabolisme du cuivre*

Le cuivre contenu dans les protéines de la nourriture, probablement complexé à des acides aminés comme les histidines ou à de petits peptides, est absorbé dans l'estomac ou l'intestin grêle. Le transport jusqu'au foie est facilité par la liaison de  $Cu^{2+}$  aux acides aminés ainsi qu'à l'albumine qui possède un site de liaison au cuivre de haute affinité et plusieurs sites de plus basse affinité. Dans le foie, le cuivre est incorporé à la céruloplasmine qui représente alors la protéine principale contenant du cuivre dans le plasma humain. La céruloplasmine, de masse moléculaire 134 kDa, peut lier six ou sept ions cuivre par molécule. Elle est capable de fournir les ions cuivre à d'autres protéines telles que la superoxyde dismutase ou la cytochrome *c* oxydase. La céruloplasmine a une activité de type « ferroxidase » qui catalyse l'oxydation du Fe(II) en Fe(III), facilitant ainsi la liaison du fer à la transferrine. Mais, contrairement à la ferroxidase, l'oxydation du cuivre de la céruloplasmine ne produit pas de  $O_2^{\cdot-}$  ou de  $OH^{\cdot}$  : la céruloplasmine est un important anti-oxydant extracellulaire. En revanche, les ions cuivre liés à l'albumine ou aux acides aminés peuvent toujours interagir avec  $O_2^{\cdot-}$  et avec  $H_2O_2$  pour former  $OH^{\cdot}$  et/ou d'autres espèces réactives comme Cu(III) (Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. C. 1990).

Les macromolécules biologiques subissant les dommages dus au cuivre sont les acides nucléiques, les protéines et les lipides. La toxicité du cuivre a longtemps été attribuée à son rôle de catalyseur dans des cycles redox entre des états d'oxydation divalents et monovalents. En particulier, le cycle redox en présence de  $H_2O_2$  ou de  $O_2^{\cdot-}$  créerait les radicaux hydroxyls  $OH^{\cdot}$  hautement réactifs *via* le cycle de Haber-Weiss (Gunther M. R. *et al.* 1995 ; Arciello, M. *et al.* 2005) :



La réaction de Fenton illustre la formation de radicaux hydroxyl  $\text{OH}^{\bullet}$  en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces propriétés d'oxydoréduction mal orientées peuvent ainsi créer des espèces activées de l'oxygène et catalyser des oxydations néfastes pour la cellule. L'ADN, les lipides, les protéines se trouvent endommagées. C'est ce qui explique l'utilisation du cuivre dans l'agriculture (comme antimicrobiens et antifongiques) ou dans la marine pour la protection des coques de navires contre les micro-organismes marins.

Cependant, bien que tout ne soit pas entièrement compris encore aujourd'hui, il a été montré récemment que le cuivre ne catalyserait pas, de manière significative, l'oxydation de l'ADN. Un excès de cuivre permettrait au contraire une diminution des dommages dus à  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur l'ADN, sans pour autant inhiber la réaction de Fenton. D'autre part, les ions  $\text{Cu(I)}$  se trouvant majoritairement dans le périplasma, la formation des radicaux a également lieu dans ce compartiment, c'est-à-dire loin de l'ADN (Macomber, L. *et al.* 2007).

## 2.3 Les métalloprotéines à cuivre

### 2.3.1 Le motif ATCUN

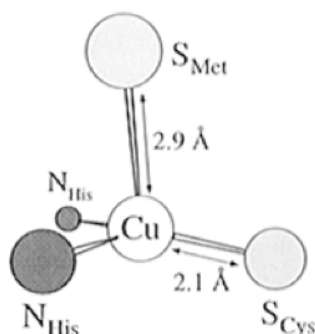
Le motif ATCUN (Amino Terminal Cu(II) and Ni(II)  $\equiv \text{H}_2\text{N-XX-His}$  où X est un acide aminé) a été très étudié ces 45 dernières années. Découvert chez les albumines (Peters T. Jr. et Blumenstock, F. A, 1967), ce motif se retrouve chez de nombreuses autres protéines liant  $\text{Cu(II)}$  (et  $\text{Ni(II)}$ ). Il est constitué de l'extrémité N-terminale, libre, de la protéine, d'une histidine en troisième position et de deux atomes d'azote peptidiques. Les propriétés du motif ATCUN ont été très bien décrites par Harford et Sarkar (Harford, C. et Sarkar, B, 1997). Ce motif permet de lier les ions  $\text{Cu(II)}$  de façon spécifique et réversible libérant le cuivre aux ligands voulus et suggérant son rôle de site transporteur du cuivre (Sankararamakrishnan, R. *et al.* 2005).

### 2.3.2 Les métalloprotéines à cuivre : structure du site cuivre

Le maintien de l'homéostasie du cuivre repose sur des transporteurs membranaires et une famille de protéines appelées « chaperonnes à cuivre » qui distribuent le cuivre à des cibles spécifiques dans la cellule. Toutes ces protéines existent aussi bien chez les eucaryotes inférieurs que chez les mammifères ce qui suggère la conservation des systèmes de régulation du cuivre au cours de l'évolution. Les métalloprotéines à cuivre jouent un rôle important dans le transfert d'électrons ainsi que dans la liaison, l'activation et la réduction du dioxygène. Selon l'environnement de coordination et la géométrie du site contenant le cuivre, ces protéines ont été classées en trois groupes : les protéines de type 1 ou « blue proteins », les protéines de type 2, et les protéines de type 3.

#### ◆ Les sites cuivre de type 1

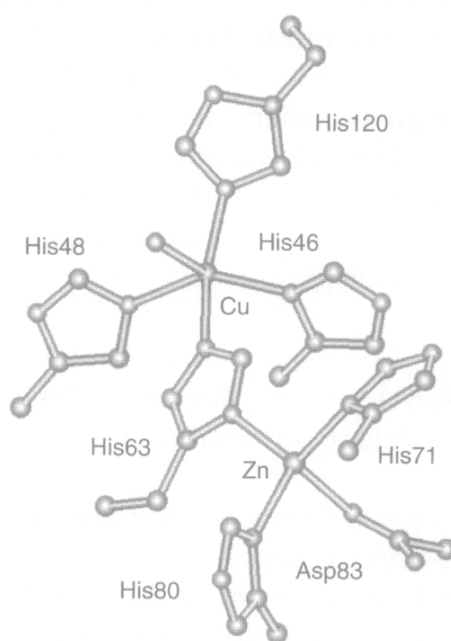
Le cuivre de type 1 se situe au niveau du site actif des « blue proteins » où il est impliqué dans le transfert d'un électron *via* un ligand thiolate d'une cystéine, d'où l'intense couleur bleue de ces protéines. Les BCP (Blue Copper Proteins) se caractérisent par une faible masse moléculaire et se présentent sous la forme d'un tonneau formé de feuilletts  $\beta$ . Elles sont stables sous la forme Cu(I) et Cu(II). La géométrie de coordination du métal correspond à une pyramide à base triangulaire légèrement déformée. L'ion cuivre est lié à l'atome de soufre S d'une cystéine et aux atomes d'azote N de deux histidines formant le plan de base. Généralement, le sommet de la pyramide est une méthionine (Banci, L. *et al.* 2002) (Fig. 4). Chez toutes les BCP, au moins l'un des ligands histidines est exposé au solvant et permettrait le transfert électronique intramoléculaire. Les BCP rassemblent les protéines telles que les azurines (premières protéines de type 1 bactériennes décrites), les amicyanines, les plastocyanines (présentes dans les plantes et les algues), la rusticyanine... ([www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/etp/etp6t11.html#10](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/etp/etp6t11.html#10))



**Figure 4** : Modèle structural d'un site cuivre classique de type 1 (exemple de la plastocyanine) (Holm, R. H. *et al.* 1996).

◆ *Les sites cuivre de type 2*

Les protéines cuivre de type 2 regroupent les superoxydes dismutases à cuivre et à zinc, les galactose oxydases, les dioxygénases et monoxygénases, les nitrite réductases... Au sein des sites cuivre de type 2, l'ion cuivre possède 4 ou 5 ligands azotés et/ou oxygénés formant un plan carré ou une pyramide à base carrée. Il ne confère pas de couleur bleue particulièrement intense comme dans le cas des sites de type 1 ([www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/etp/etp6t11.html#10](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/etp/etp6t11.html#10)). Les centres cuivre de type 2 possèdent ainsi un site de coordination vacant et peuvent intervenir dans des processus d'oxydation catalytiques, seuls ou de conserve avec un cuivre de type 3 par exemple (Cowan, J. A. 1993). Classiquement, les sites cuivre de type 2 sont plutôt tétragonaux, le cuivre étant lié à 3 atomes d'azote de résidus histidines et à un atome d'oxygène (appartenant à une molécule d'eau comme dans le cas de la nitrite réductase). Dans les superoxydes dismutases à cuivre et à zinc, l'ion Cu(II) est lié à quatre ligands histidine. L'une d'entre elles assure un pont entre le cuivre et le zinc, et une molécule d'eau. Le zinc est de son côté lié à trois histidines et un aspartate. Un réseau complexe de liaisons hydrogène maintient l'orientation des ligands métalliques (Fig. 5) (Banci, L. *et al.* 2002).



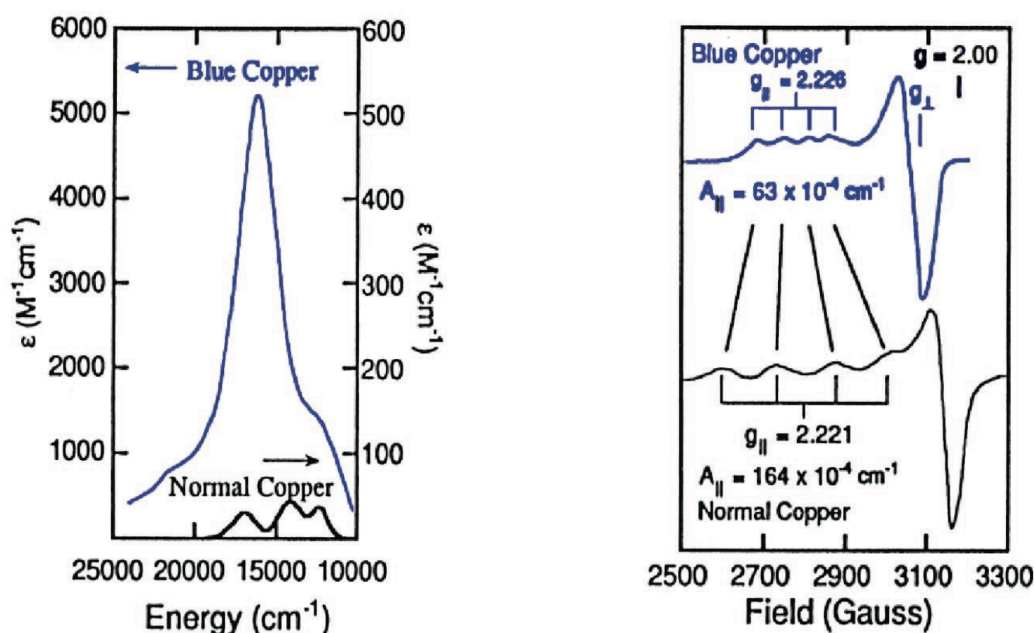
**Figure 5** : Représentation des sites métalliques dans une superoxyde dismutase à cuivre et à zinc (Banci L. *et al.* 2002)

◆ *Caractéristiques physicochimiques des sites de type 1 et 2*

Les spectres d'absorption des sites cuivre de type 1 sont caractérisés par une bande d'absorption intense à environ  $16000\text{ cm}^{-1}$ , c'est-à-dire vers  $600\text{ nm}$  ( $\epsilon \approx 5000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  au lieu de  $50\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  caractérisant les complexes cuivre tétraogonaux). La différence d'énergie entre les niveaux énergétiques des orbitales d du cuivre est plus grande dans le cas des complexes de type 1 vu la géométrie de coordination. Les transitions  $d \rightarrow d$  dues à l'absorption d'un photon sont donc plus importantes (transfert de charge d'un électron d'une cystéine sur l'ion  $\text{Cu(II)}$ ), ce qui explique la valeur du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$ , bien plus élevée que dans le cas des complexes de type 2.

En résonance paramagnétique électronique (RPE), quatre raies sont observées dans la zone  $g_{\parallel}$ , le spin I du cuivre étant égal à  $3/2$ . Les spectres RPE des BCP sont caractérisés par une constante de couplage spin électronique – spin nucléaire  $A_{\parallel}$  réduite d'un facteur supérieur à 2 par rapport aux complexes cuivre tétraogonaux ( $A_{\parallel} \approx 6 \times 10^{-3}\text{ cm}^{-1}$  pour les complexes de type 1 et  $A_{\parallel} \approx 17 \times 10^{-3}\text{ cm}^{-1}$  pour les complexes de type 2). Les 4 raies observées dans la zone  $g_{\parallel}$  sont donc beaucoup plus resserrées (Fig. 6).

Concernant leurs potentiels d'oxydoréduction, les sites cuivre de type 1 sont caractérisés par des potentiels inférieurs à ceux des sites de type 2 (Cowan, J. A. 1993). Enfin, dans le cas des complexes cuivre de type 1, la liaison Cu-Ligand est plutôt de type  $\pi$ , alors qu'elle est de type  $\sigma$  dans les complexes cuivre de type 2 (Solomon, E. I. *et al.* 2006).



**Figure 6 :** Spectres d'absorption UV-visible (à gauche) et spectres RPE (à droite) d'un complexe cuivre tétraogonaux (de type 2) (normal copper – exemple du complexe  $\text{CuCl}_4^{2-}$ ), et d'un complexe cuivre de type 1 (blue copper - exemple de la plastocyanine) (Solomon, E. I. *et al.* 2006).

◆ *Les sites de type 3*

Les sites cuivre de type 3 contiennent 2 ions cuivre, non détectables par RPE du fait du couplage antiferromagnétique des ions cuivre. Ces sites sont caractéristiques des transporteurs de dioxygène comme l'hémocyanine, et des oxydases comme la tyrosinase. Les deux ions cuivre sont coordonnés par 3 histidines. Différents ligands (oxygène, hydroxyde...) relient les deux ions métalliques Cu(II) - Cu(II) (Banci, L. *et al*, 2002). Les sites de type 3 se trouvent souvent dans les protéines possédant également un site cuivre de type 1 et/ou de type 2.

Certaines protéines, comme la laccase ou la céruloplasmine, peuvent contenir des sites cuivre de type 1, 2 et 3 avec différentes stoechiométries.

Enfin, deux sites uniques existent dans la cytochrome *c* oxydase. Cu<sub>A</sub> correspond à un site cuivre binucléaire ([Cu(II)Cu(I)] ou [Cu(I)Cu(I)] suivant l'état redox du site). Il joue le rôle de premier accepteur d'électrons chez les oxydases. Les électrons sont ensuite conduits vers un autre centre métallique. Cu<sub>B</sub> fait partie d'un centre binucléaire ([www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/etp/etp6t11.html#10](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/etp/etp6t11.html#10)).

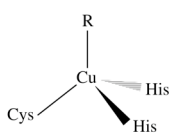
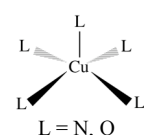
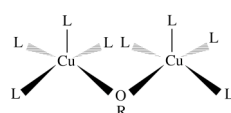
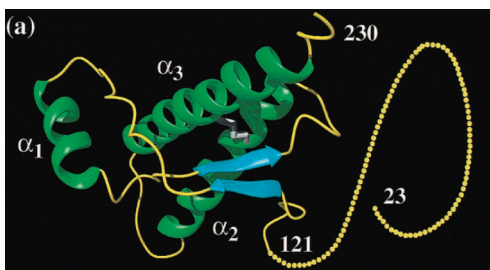
	Type 1	Type 2	Type 3
<b>Géométrie</b>			
<b>Potentiel redox E<sup>0</sup> à pH 7</b>	190 – 400 mV	400 – 800 mV	400 – 600 mV
<b>ε à 600 nm</b>	≈ 5000 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	≈ 50 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	ε non caractéristique
<b>Paramètres RPE</b>	$g_{//} \approx 2.22 - 2.29$ $g_{\perp} \approx 2.053$ $A_{//} \approx 6 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$	$g_{//} \approx 2.23 - 2.25$ $g_{\perp} \approx 2.053$ $A_{//} \approx 17 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$	Signal RPE non détectable
<b>Fonction</b>	Transfert d'électrons (sans rôle catalytique spécifique)	Transfert de cuivre, oxydation catalytique	Accepteurs d'électrons, réduction de O <sub>2</sub> en O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>
<b>Exemples</b>	Azurines, plastocyanines...	Superoxyde dismutase, nitrite réductase...	Hémocyanine, tyrosinase...
<b>Masse moléculaire</b>	≈ 15 kDa	≈ 30 – 80 kDa	≈ 30 – 80 kDa

Tableau 3 : Caractéristiques, géométriques, physicochimiques et fonctionnelles des protéines de type 1, 2 et 3

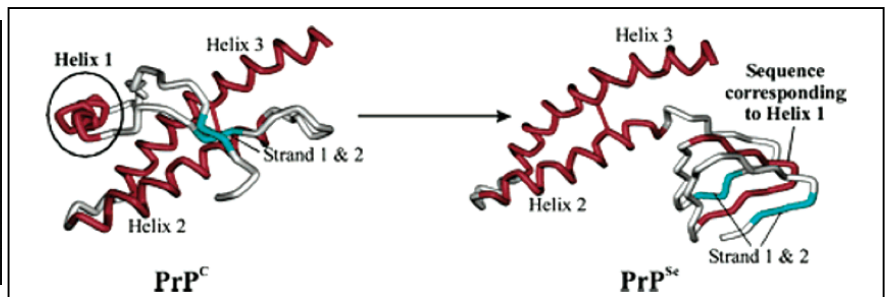


### 2.3.2 Le cas de la protéine Prion

La protéine Prion ( $\text{PrP}^c$ ) est présente chez les mammifères. Elle se trouve dans de nombreux types de cellules, en particulier dans les neurones où elle est exprimée à des concentrations plus élevées.  $\text{PrP}^c$  se caractérise par une structure en hélices  $\alpha$ , très sensible aux protéases. Dans le cas de maladies dues au prion, la protéine forme des agrégats ou des fibrilles et sa structure évolue en feuillets  $\beta$  (Fig. 8). Le mécanisme de cette conversion hélices  $\alpha \rightarrow$  feuillets  $\beta$  (Fig. 8) n'est pas encore élucidée, mais elle est à l'origine de troubles neurodégénératifs (Prusiner, S. B. 1998) dont certains peuvent passer la frontière des espèces, comme l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou maladie de la vache folle, la tremblante du mouton, la maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'homme....  $\text{PrP}^c$  est codée par *prnp*, un petit gène porté par un seul brin du chromosome 20 chez l'homme, et fortement exprimé dans les neurones. La protéine Prion humaine contient 253 acides aminés dont les 22 premiers sont codés par une séquence clivée après la transcription. La maturation de la protéine prévoit l'ajout d'une unité GPI, du côté C-terminal, afin de faciliter la liaison de  $\text{PrP}^c$  à la membrane cellulaire, ainsi que deux sites de glycosylation. La protéine se caractérise également par une séquence nonapeptidique suivie de la répétition de 4 octapeptides identiques entre les résidus 51 et 91. La structure de la protéine Prion, résolue par RMN en 1996 par Wutrich, nous montre une protéine globulaire composée de trois régions en hélices  $\alpha$  (deux d'entre elles étant reliées par un pont disulfure), d'un court segment en feuillets  $\beta$  anti-parallèles et d'une extrémité N-terminale flexible (Fig. 7) (Calzolari, L. *et al.* 2005 ; Viles, J. H. *et al.* 2001 ; Lopez Garcia, F. *et al.* 2000). La structure obtenue par cristallographie est en accord avec ces observations tout en révélant l'existence d'une forme dimérique possédant un segment en feuillets  $\beta$  anti-parallèles supplémentaire (Haire, L. F. *et al.* 2004).



**Figure 7 :** Structure tridimensionnelle de la protéine prion bovine bPrP(23-230) (López Garcia, F. *et al.* 2000)



**Figure 8 :** Vue schématique de la conversion structurale de  $\text{PrP}^c$  en protéine pathogène  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Ziegler, J. *et al.* 2003)

### ◆ *La protéine Prion et les ions métalliques*

Outre le mauvais repliement menant à la formation d'agrégats et les mutations du gène codant *prnp*, les maladies dues au prion se caractérisent également par des signes évidents de dommages oxydants dans les zones touchées du cerveau. Par conséquent, les ions métalliques produiraient des espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables du stress oxydant, *via* les réactions de Fenton par exemple. La protéine Prion engendrerait aussi des radicaux hydroxyles en présence de Cu(II) et de Fe(II) (Turnbull, S. *et al.* 2003) comme le font l'amyloïde- $\beta$  ou l' $\alpha$ -synucléine.

Les métaux lourds sont également responsables d'autres propriétés de la protéine Prion. Par exemple, dans un milieu de faible force ionique, des quantités micromolaires d'ions Cu(II) restaureraient ses propriétés de résistance aux protéases en contrôlant la conformation de la partie flexible en N-terminal (Nishina, K. *et al.* 2004). Cependant, à des concentrations plus élevées en métaux Mn(II), Cu(II), Ni(II), Co(II) ou Zn(II), de l'ordre du millimolaire, ceux-ci provoqueraient l'agrégation de la protéine (Giese, A. *et al.* 2004). Dans les maladies dues au prion, le manganèse, en particulier, se substituerait au cuivre stabilisant la partie N-terminale, et engagerait le changement de conformation de la protéine PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup>. Cette observation s'expliquerait par la différence de propriétés entre le cuivre, métal doux se liant préférentiellement aux atomes d'azote, et le manganèse, métal plus dur se liant plutôt aux atomes d'oxygène (Tsenkova, R. N. *et al.* 2004). Ainsi, dans le cas de la protéine Prion, le cuivre, en faible quantité, permettrait de maintenir une conformation stable de la protéine. La présence d'ions manganèse empêcherait la liaison du cuivre sur la protéine, affectant le transport du métal et la résistance au stress oxydant provoquant ainsi l'agrégation de la protéine.

### ◆ *La relation cuivre - protéine Prion*

#### *\* La biochimie du prion et les ions métalliques*

Il existe un lien étroit entre la biochimie du prion, l'infection et les ions cuivre. Le cuivre participerait à la stabilité de PrP<sup>c</sup> et à sa résistance au stress oxydant et aux protéases tandis qu'il causerait le changement conformationnel de PrP<sup>c</sup> en feuillets  $\beta$  à des concentrations supérieures à 100  $\mu$ M et favoriserait l'oxydation de la protéine par le peroxyde d'hydrogène (et la progression de la maladie).

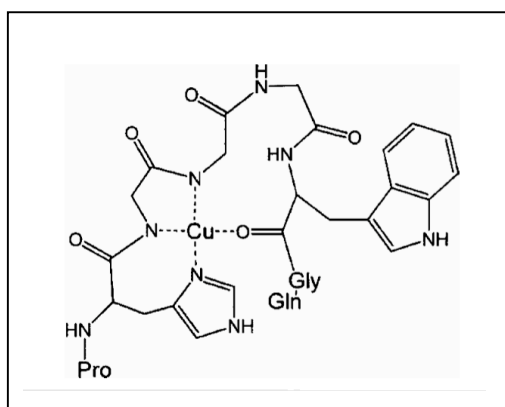
La protéine Prion lie sélectivement quatre ions cuivre au niveau de sa région de répétition octapeptidique (Burns, C. S. *et al.* 2002 ; Stöckel, J. *et al.* 1998), suivant une

géométrie de coordination identique, avec une affinité comprise entre 1 nM et 10  $\mu$ M, et de 1 fM pour un des ions cuivre (Burns, C. S. *et al.* 2003). Ces derniers se lient également au niveau d'un cinquième site formé par 2 histidines (Burns, C. S. *et al.* 2003) ainsi qu'au niveau d'un fragment C-terminal.

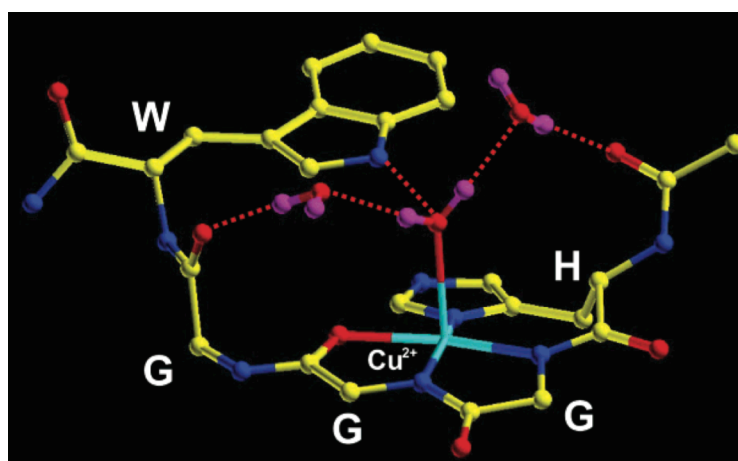
*\* Caractéristiques spectrales*

Le dichroïsme circulaire et la spectroscopie de fluorescence révèlent, par extinction de la fluorescence, déplacement du spectre d'émission vers les plus faibles longueurs d'onde et modification du spectre CD dans la zone proche UV, des changements, induits par les ions  $\text{Cu}^{2+}$ , dans la structure secondaire (hélice  $\alpha \rightarrow$  feuillets  $\beta$ ) (Stöckel, J. *et al.* 1998).

Les premières observations par résonance paramagnétique électronique montrent l'existence de deux modes de liaison du cuivre. Le principal ferait intervenir 3 atomes d'azote et 1 atome d'oxygène tandis que 2 atomes d'azote et 2 atomes d'oxygène formerait le second (Fig. 9). L'unité de liaison des ions  $\text{Cu}^{2+}$  serait formée par la séquence HGGGW et la stoechiométrie  $\text{Cu}^{2+}$ /octapeptide serait rigoureusement de 1/1. Ces données ainsi que les premières études par cristallographie, potentiométriques et par RMN<sup>1</sup>H sont en accord avec un modèle impliquant le cycle imidazole de l'histidine, les deux atomes d'azote amide déprotonés des glycines suivantes et l'atome d'oxygène du groupe carbonyle d'une autre glycine (coordination équatoriale) (Fig. 9). Le repliement peptidique permettrait l'interaction du tryptophane avec  $\text{Cu}^{2+}$  via une liaison hydrogène avec une molécule d'eau (Fig. 10) (Aronoff-Spencer, E. *et al.* 2000 ; Burns, C. S. *et al.* 2002 ; Luczhowski, M. *et al.* 2002).



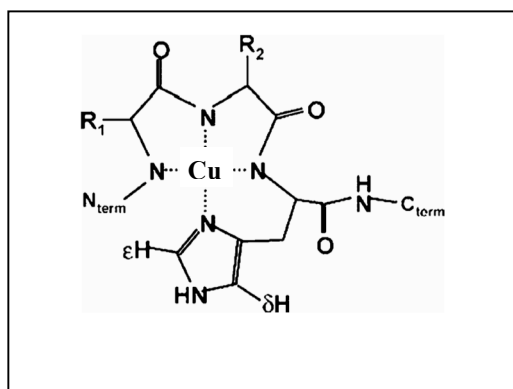
**Figure 9 :** Modèle de liaison entre le cuivre et les segments octapeptidiques (PHGGGWGQ) proposé d'après les premières études RPE (Aronoff-Spencer, E. *et al.* 2000).



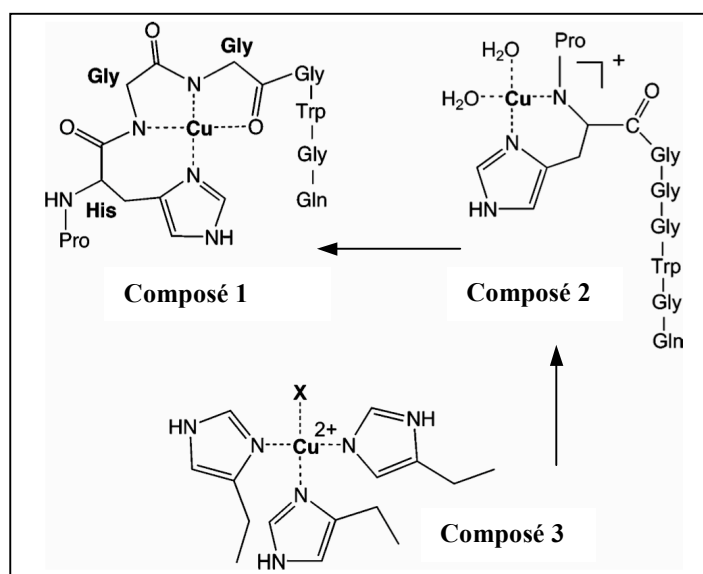
**Figure 10 :** Représentation moléculaire de la liaison du cuivre au motif HGGGW de la protéine Prion d'après la structure cristallographique de la région HGGGW (Burns, C. S. *et al.* 2002).

La nature des ligands du cuivre est également en accord avec la zone de stabilité de la protéine Prion. A pH inférieur à 6.5, les azotes amides sont protonés, la liaison G-Cu est donc instable et les ions  $\text{Cu}^{2+}$  ne parviennent plus à maintenir la structure des régions octapeptidiques (Burns, C. S. *et al.* 2003).

Les études RPE ultérieures confirment la liaison de 5 ions cuivre par protéine. Cependant, chaque répétition octapeptidique ne formerait pas un site cuivre indépendant des autres mais se replierait de façon coopérative autour des ions  $\text{Cu}^{2+}$ , les résidus histidine, glycine et proline étant nécessaires au maintien de la géométrie de coordination (Garnett, A. P. et Viles, J. H. 2003). Enfin, trois modes de coordination du cuivre au niveau des régions octapeptidiques ont pu être distingués. Une coordination multiple avec les histidines serait observée (composé 3). Lorsque tous les sites cuivre sont occupés, le repliement du domaine de répétition octapeptidique, passant par un composé 2, intermédiaire, permet une interaction dipolaire Cu-Cu, et facilite la prise en charge du cuivre (composé 1) (Chattopadhyay, M. *et al.* 2005) (Fig. 12).



**Figure 11** : Modèle moléculaire des sites de liaison métalliques au niveau du domaine de répétition octapeptidique obtenu en présence de cuivre ou de nickel (Jones, C. E. *et al.* 2005).



**Figure 12** : Modèles des trois modes de coordination équatoriaux. X représente soit un quatrième cycle imidazole soit une molécule d'eau (Chattopadhyay, M. *et al.* 2005).

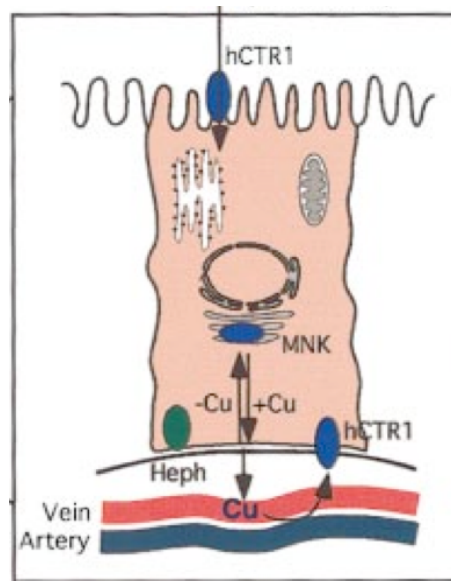
## 2.4 Le métabolisme du cuivre chez l'être humain et ses dérèglements

Le transport et le métabolisme du cuivre impliquent des protéines membranaires et des petites protéines solubles qui font partie d'un système intégré visant à maintenir son homéostasie.

### 2.4.1 L'homéostasie du cuivre : absorption, distribution aux protéines cibles et détoxification

Bien que le cuivre soit essentiel à la vie et au fonctionnement de nombreuses enzymes d'intérêt en neurobiologie (tyrosinase, céruloplasmine, cytochrome *c* oxydase...), une mauvaise distribution ou une élévation de la concentration en cuivre dans la cellule et l'existence d'une liaison Cu(II)-protéine incorrecte sont à l'origine de stress oxydatif pathologique dans de nombreux troubles neurodégénératifs.

Le corps d'un homme d'environ 70 kg en bonne santé, contient moins de 97 mg de cuivre. La majorité de ce cuivre se situe dans les os (en particulier la moelle osseuse : 46 mg), les muscles (26 mg), le foie (10 mg), le cerveau (8,8 mg), et le sang (6 mg). L'apport journalier recommandé en cuivre chez l'adulte est de 0,9 mg, la dose maximale au-dessus de laquelle l'apport en cuivre devient dangereux se situe à 10 mg/jour. Le maintien de la teneur physiologique en cuivre de l'organisme est assuré par un équilibre entre l'absorption intestinale et l'excrétion biliaire. La voie d'entrée du cuivre fait intervenir les cellules polarisées de l'intestin par lesquelles 40 % du cuivre alimentaire est absorbé. Le cuivre traverse la paroi apicale par le transporteur membranaire hCtr1 également présent dans les autres types de cellules où il assure le transport du cuivre à haute affinité grâce à son extrémité extra-cellulaire riche en résidus méthionine et histidine (Puig, S. et Thiele, D. J. 2002) (Fig. 13). Le cuivre est alors séquestré par la métallo-chaperonne Atox1 qui le délivre à une ATPase localisée dans les membranes de l'appareil de Golgi (Hamza I. *et al.* 2000). Cette ATPase est dénommée protéine de Menkes. Elle est codée par le gène *atp7a* (Chelly, J. et Monaco, A. P. 1993 ; Mercer J. F. *et al.* 1993). Lorsque la concentration intracellulaire de cuivre devient trop élevée, l'ATPase de Menkes migre à la membrane basolatérale (Petris, M. J. *et al.* 1996). Elle permet ainsi l'expulsion du cuivre dans la circulation sanguine où il est principalement lié à l'albumine.



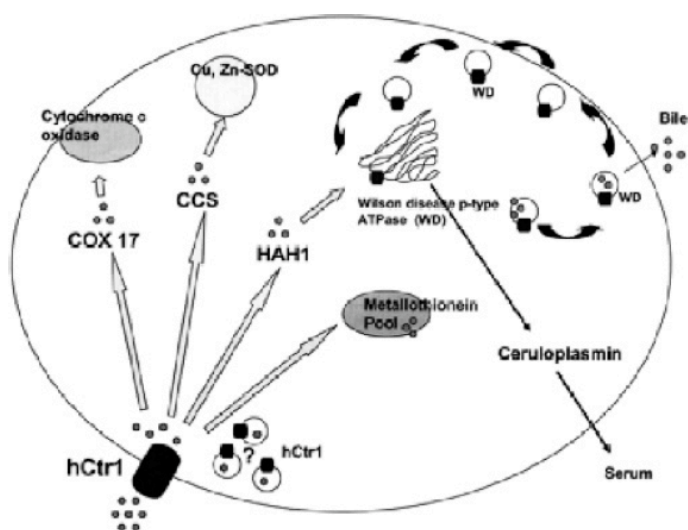
**Figure 13 :** Homéostasie du cuivre dans une cellule intestinale (d'après Peña, M. M. *et al.* 1999). L'absorption du cuivre est assurée par le transporteur Ctr1 et son transfert dans la circulation sanguine par l'ATPase de Menkes (MNK)

Sous cette forme, le cuivre est capté par les cellules hépatiques qui le restituent à l'organisme selon ses besoins : le foie constitue donc l'organe central de l'homéostasie du cuivre. Dans les hépatocytes, l'ATPase de Wilson (homologue de l'ATPase de Menkes) codée par le gène *atp7b* (Tanzi, R. E. *et al.* 1993) est une protéine transmembranaire, dans la membrane de l'appareil de Golgi et qui joue un rôle crucial dans le métabolisme du cuivre. Le cuivre lui est apporté par l'intermédiaire de la métallo-chaperonne Atox1, comme précédemment décrit pour la protéine de Menkes. L'ATPase de Wilson catalyse alors le transport du métal du cytosol vers le compartiment cellulaire trans-Golgien, où le cuivre est intégré à diverses enzymes comme la céruloplasmine. Cette dernière assure la distribution du métal aux tissus périphériques. Elle est secondée par l'albumine et la transcupréine (Hellman, N. E. et Gitlin, J. D. 2002).

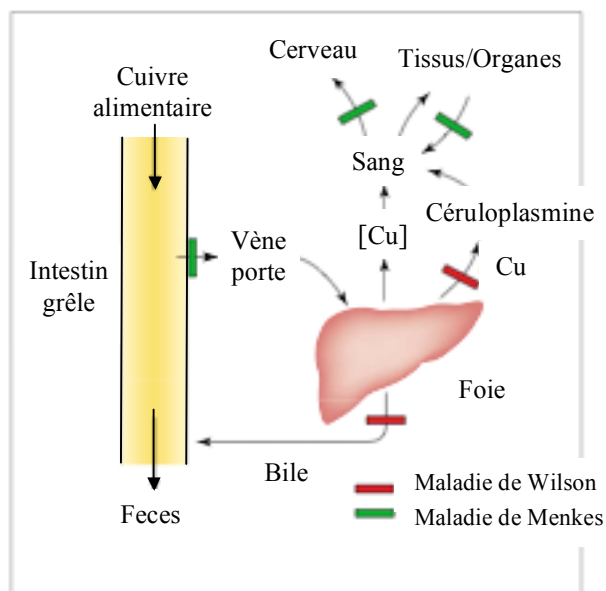
Par ailleurs, le foie assure une fonction de détoxification du cuivre lorsque la concentration devient trop élevée. Ce mécanisme implique une migration de la protéine de Wilson, des membranes de l'appareil de Golgi vers des vésicules qui fusionnent avec la région de la membrane plasmique en contact avec le canalicule biliaire (Terada, K. *et al.* 1999 ; Lutsenko, S. et Petris, M. J. 2003). L'excès de cuivre est alors éliminé par voie biliaire. Ainsi, la distribution du cuivre aux enzymes cibles dépend d'un système faisant intervenir au moins trois métallochaperonnes : (a) Cox17 libère le cuivre dans les mitochondries pour distribution ultérieure à la cytochrome oxydase ; (b) une chaperonne à cuivre (CCS) délivre le cuivre à la superoxyde dismutase (SOD) dans le cytoplasme ; (c) Atox1 ou HAH1 distribue le cuivre à

ATP7A dans l'appareil de Golgi pour l'incorporation ultérieure au sein d'autres protéines à cuivre comme la céruloplasmine.

Le cuivre peut aussi intervenir dans les métallothionéines (Fig. 14).



**Figure 14** : Modèle du transport du cuivre dans un hépatocyte (d'après Shim, H. et Harris, Z.L, 2003).



**Figure 15** : Etapes déficientes du métabolisme du cuivre dans les maladies de Wilson et de Menkes (d'après Mercer, J. F. B. *et al.* 2001)

Par conséquent, les ATPases de Menkes et de Wilson jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie du cuivre (Lutsenko, S. et Petris, M. J. 2002). Partout où elles sont exprimées, ces deux protéines sont responsables de l'acheminement du cuivre à l'intérieur de l'appareil de Golgi, un des lieux de maturation des protéines. Leurs fonctions dépendent du type cellulaire dans lequel elles sont exprimées. Ainsi, la protéine de Menkes assure l'absorption du cuivre alimentaire au niveau de l'intestin et le distribue rapidement dans le cerveau. A l'inverse, la protéine de Wilson, qui assure la détoxification du cuivre, se trouve essentiellement dans les cellules hépatiques et dans les neurones où elle délivre le cuivre à la céruloplasmine (Yatsunyk L. A. et Rosenzweig, A. C. 2007). Des mutations au niveau des gènes codant pour les ATPases de Wilson (ATP7B) ou Menkes (ATP7A) sont à l'origine de deux maladies génétiques dont les symptômes et la gravité diffèrent selon l'ATPase déficiente (Fig. 15).

#### ◆ La maladie de Wilson

Décrite en 1912, la maladie de Wilson, appelée aussi dégénérescence hépatolenticulaire progressive, est liée à une anomalie congénitale du métabolisme du cuivre. Le gène responsable de cette maladie a été isolé et séquencé en 1993. La maladie de Wilson est

transmise selon le mode autosomique récessif et sa prévalence est d'environ 1/30000. La fonctionnalité altérée de l'ATP7B se caractérise par un défaut d'incorporation du cuivre à la céruloplasmine couplé à une absence d'excrétion du cuivre par la bile (Fig. 15). Elle s'accompagne de divers symptômes principalement dus à une surcharge de cuivre hépatique non maîtrisée (manifestations hépatiques, neuropsychiques et de pigmentation particulière de la cornée) (Gaggelli, E. *et al.* 2006).

### ◆ *La maladie de Menkes*

La maladie de Menkes a été décrite pour la première fois en 1962. En 1972, un scientifique du nom de Danks remarque que de jeunes enfants atteints de cette maladie ont des cheveux décolorés similaires à la laine des moutons élevés en Australie sur les sols carencés en cuivre. C'est de cette manière que le rôle du cuivre a été découvert et que cette maladie a été associée à un défaut d'absorption intestinale du métal. Ce dysfonctionnement met en jeu l'ATP7A (Fig. 15). La transmission de cette maladie se fait suivant le mode gonosomique récessif et elle touche une naissance sur 250 000. La fonction de nombreuses enzymes à cuivre est perturbée, ce qui entraîne des phénomènes de lésion diffuse comme l'hypothermie, la pigmentation des cheveux et de la peau, la déminéralisation du squelette. Cette grave maladie est incurable et l'espérance de vie des patients reste limitée à 10 ans, voire 6 ans (Gaggelli, E. *et al.* 2006).

### **2.4.2 Les maladies neurodégénératives**

Les maladies neurodégénératives sont liées à la présence d'un excès de protéines mal repliées. Ces protéines ont tendance à s'agréger et former des dépôts solides tels que les plaques des maladies d'Alzheimer ou du prion, les corps de Lewy de la maladie de Parkinson, les inclusions nucléaires et cytoplasmiques de la maladie de Huntington, les corps de Bunina de la sclérose... Dans tous ces cas, les protéines normalement solubles se transforment, malgré tous les mécanismes de contrôle du repliement protéique, en agrégats insolubles, hautement organisés et extrêmement stables, formant des dépôts irréversibles et toxiques, non seulement dans le cerveau mais aussi au niveau du squelette, des tissus musculaires, du cœur et du foie.

La liste des maladies associées à ces dépôts d'amyloïdes ne cesse d'augmenter. Plus d'une vingtaine sont connues aujourd'hui, incluant le diabète de type II. Les dépôts de protéines mal repliées trouveraient leur origine dans des mutations génétiques ou dans le



mauvais contrôle homéostatique des radicaux libres et des ions métalliques (Gaggelli E. *et al.* 2006).

### ◆ *La neurobiologie des ions métalliques*

La neurochimie et la neurophysiologie se sont longtemps limitées au rôle du calcium, du magnésium, du potassium et du sodium. Les progrès faits dans l'étude du système nerveux central a permis de comprendre l'importance des métaux de transition comme le fer, le cuivre, le manganèse et le zinc, dans la transmission synaptique, la mémoire et les maladies neurologiques, mais aussi dans les phénomènes de création de radicaux ou de défense contre les radicaux. Le cerveau en particulier se doit de se protéger des ions métalliques par une homéostasie efficace. Les dommages au niveau de la frontière sang-cerveau et les dysfonctionnements dans la production et consommation d'ATP au sein du cerveau sont deux caractéristiques des troubles neurodégénératifs. Ces derniers reposent sur deux réactions importantes : l'association protéine-métal menant à l'agrégation des protéines (Zn(II), Cu(II), Fe(III)) ou l'oxydation des protéines catalysée par un métal et provoquant dommages et dénaturation des protéines (Cu(II), Fe(III), Mn(II)) (Gaggelli, E. *et al.* 2006).

### ◆ *La maladie d'Alzheimer*

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus répandue, affectant environ 10 % de la population âgée de plus de 65 ans et 50 % des personnes de plus de 85 ans. Découverte en 1907, cette maladie est progressive et irréversible. Elle provoque perte de la mémoire, comportements inhabituels, changements de personnalité et déclin de la pensée. Elle s'accompagne de trois principaux changements structuraux dans le cerveau : perte des neurones, dépôts protéiques intracellulaires (enchevêtrements de neurofibrilles), et dépôts protéiques extracellulaires (plaques amyloïdes) (Leslie, R. A. 2002). Ces derniers dépôts résulteraient principalement du dysfonctionnement d'une protéine précurseur amyloïde (APP) et de l'agrégation d'un peptide A $\beta$  (Hardy, J. et Selkoe, D. J. 2002). La mort des neurones serait également due au stress oxydatif jouant un rôle non négligeable (Meloni, G. *et al.* 2007) ainsi qu'à la mauvaise homéostasie du cuivre. APP et A $\beta$  sont capables de lier et de réduire le cuivre qui forme un complexe de haute affinité avec le peptide A $\beta$ , initiant ainsi son agrégation (Opazo, C. *et al.* 2003). De plus, le cuivre (avec le zinc et le fer) s'accumule dans les dépôts d'amyloïdes formés par les chélateurs de cuivre. Le cuivre provoque aussi l'oligomérisation de A $\beta$  dont le métabolisme est très sensible aux infimes variations du métal ; ce dernier pourrait

alors traverser la frontière sang-cerveau grâce au site spécifique du Cu(II) chez A $\beta$  et APP. La similarité de structure des sites de liaison au cuivre chez A $\beta$  et la superoxyde dismutase 1 (SOD1) laisserait penser que A $\beta$  jouerait un rôle de détoxification du métal, rôle affecté dans la maladie d'Alzheimer. APP, de son côté, protégerait la cellule contre les effets neurotoxiques induits par Cu(II) (Cerpa, W. F. *et al.* 2004).

### ◆ *La sclérose latérale amyotrophique (SLA)*

La SLA, ou maladie de Charcot, est également une maladie neurodégénérative progressive des neurones moteurs touchant environ une personne sur 200 000. 10 % des cas sont héréditaires ; dans les autres cas, 1/4 sont causés par des mutations du gène codant pour SOD1. Cette maladie se caractérise par des inclusions ressemblant à des corps de Lewy au niveau des neurones ainsi que des inclusions du mutant de SOD1. L'existence de mutations au sein de SOD1 provoque une liaison non appropriée du cuivre sur la protéine qui perd sa fonction d'antioxydant (Gaggelli, E. *et al.* 2006).

### ◆ *La maladie de Parkinson*

La maladie de Parkinson est aussi une maladie neurologique affectant le système nerveux central. Elle est responsable d'anomalies motrices à évolution progressive se manifestant par des mouvements et tremblements involontaires, une rigidité importante, une bradykinésie et une instabilité de posture. La maladie se caractérise par la dégénérescence et la mort des neurones dopaminergiques et l'accumulation d'inclusions intracellulaires circulaires appelés corps de Lewy (Dawson, T. M. et Dawson, V. L. 2003). Elle touche 0,1 % de la population âgée de plus de 40 ans. Les corps de Lewy sont composés de fibrilles d' $\alpha$ -synucléines. Deux gènes associés à la maladie ont été récemment découverts : *park1* codant pour l' $\alpha$ -synucléine et *park2* codant pour la protéine parkin (Kitada, T. *et al.* 1998). L' $\alpha$ -synucléine est une petite protéine de 14 kDa exprimée dans les neurones du système nerveux central. Cette protéine est intrinsèquement peu repliée et s'assemble en filaments formant ensuite les corps de Lewy en s'associant à la membrane des tissus du cerveau. Plusieurs facteurs favorisent la formation de fibrilles comme l'acidité de la région C-terminale ou la présence de Cu(II) induisant des changements conformationnels de l' $\alpha$ -synucléine.

### ◆ *Les maladies dues au prion*

Les autres maladies neurodégénératives importantes correspondent à celles mettant en jeu la protéine Prion PrP<sup>c</sup> (voir paragraphe 2.3.3). Ces troubles sont dus à des changements conformationnels de PrP<sup>c</sup> et provoquent la dégénérescence des neurones. Une de leurs caractéristiques est qu'ils sont transmissibles entre espèces (l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou maladie de la vache folle, la tremblante du mouton, la maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'homme...).

## III - L'homéostasie du cuivre chez les bactéries

Les propriétés du cuivre le rendant à la fois essentiel et toxique, un contrôle strict de la concentration en métal doit nécessairement être mis en œuvre par la cellule. Les bactéries utilisent pour cela diverses stratégies mettant en jeu différentes protéines.

### 3.1 Le cuivre cytoplasmique

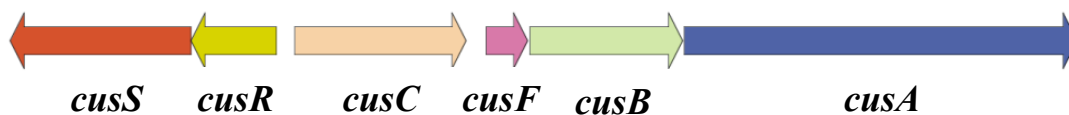
Le milieu cytoplasmique est réducteur. Le glutathion (GSH), présent à des concentrations de l'ordre du millimolaire, représente très probablement l'agent réducteur principal chez les eucaryotes et probablement aussi chez les procaryotes. Les composés réducteurs lient très fortement le cuivre et créent des ions Cu(I). Par conséquent, le cuivre cytoplasmique se trouve sous la forme réduite Cu<sup>+</sup>, complexé par le glutathion ou d'autres petites molécules qui permettent le transfert aux métallothionéines ou à la superoxyde dismutase (Ascone, I. *et al.* 1993).

### 3.2 L'homéostasie du cuivre chez *Escherichia coli*

Découverte en 1885 par Théodore Escherich dans des selles de nourrissons, *Escherichia coli*, ou colibacille, est une bactérie gram-négative de la famille des entérobactéries, se logeant communément dans la microflore commensale intestinale des mammifères. Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures suivant la naissance. Elle constitue alors tout au long de la vie de l'hôte l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin. Certaines souches spécialisées

d'*E. coli* sont associées à des pathologies très diverses telles que diarrhées, gastro-entérites, méningites, septicémies... Le patrimoine génétique de la souche *E. coli* non pathogène a été entièrement séquencé en 1997. Son génome comprend 4,6 millions de paires de bases pour environ 4 200 protéines.

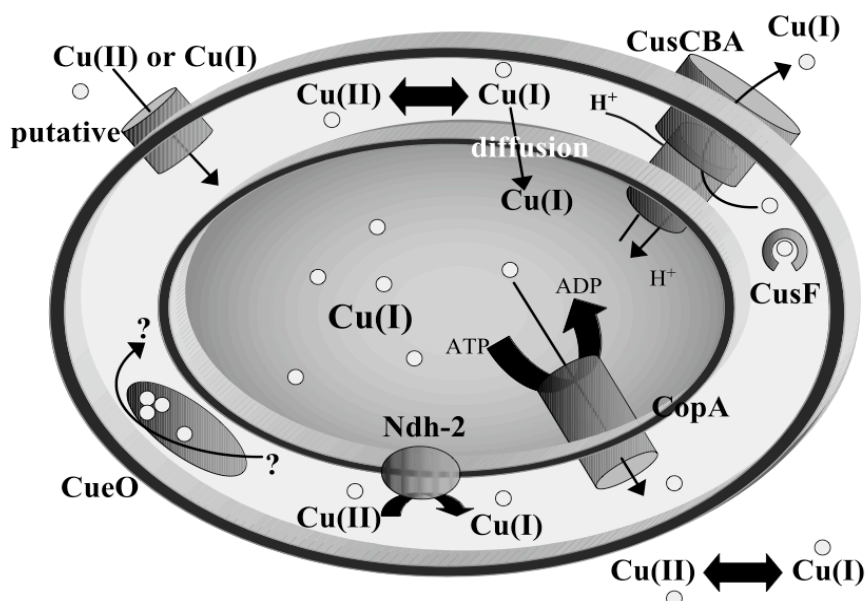
Au cours de son évolution, *E. coli* a mis en place différents systèmes de contrôle de la quantité de cuivre (Rensing, C. et Grass, G. 2003). Deux principaux systèmes de régulation ont été identifiés. Le premier est un système de transduction du signal à deux composants, le locus Cu-senseur ou locus *cus* : les gènes *cusRS* forment une paire régulatrice activant les gènes *cusCFBA* (Munson, G. P. *et al.* 2000) (Fig. 16). Les protéines CusCBA sont homologues à une famille de complexes impliqués dans le transport des ions métalliques, xénobiotiques et médicaments et autres molécules, la famille des HME-RND (Heavy-Metal Efflux – Resistance Nodulation cell Division). CusF est une protéine périplasmique liant le cuivre (Franke, S. *et al.* 2003 ; Kittleson, J. T. *et al.* 2006).



**Figure 16** : Le déterminant *cus* composé de la paire régulatrice *cusRS* et des gènes *cusCFBA*, transcrits suivant des directions opposées.

Le second système, appelé *cue* (pour Cu efflux), est composé de deux gènes *copA* et *cueO*. Il est régulé par la protéine CueR.

L'élément central de l'homéostasie du cuivre est représenté par l'ATPase de type P, CopA, localisée dans la membrane interne et assurant l'export des ions  $\text{Cu}^+$  depuis le cytoplasme. Dans le périplasma, l'oxydase CueO et le système d'efflux CusCFBA contrôlent la concentration en cuivre. En outre, plusieurs souches d'*E. coli* possèdent des gènes plasmidiques permettant d'accroître considérablement leur tolérance au cuivre et leur survie dans les environnements riches en métal (Rouch, D. *et al.* 1985).



**Figure 17** : Homéostasie du cuivre chez *E. coli*. CopA est une ATPase de type P transférant le Cu(I), NDH-2 une réductase à cuivre, CueO une oxydase à cuivre et CusCFBA une pompe à efflux composée de quatre domaines. Le cuivre traverse probablement la membrane externe grâce aux porines OmpC et OmpF (Rensing, C. et Grass, G. 2003).

#### ◆ L'ATPase CopA

CopA joue un rôle clé dans l'homéostasie du cuivre chez *E. coli*, que ce soit en conditions aérobies ou anaérobies (Rensing, C. et Grass, G. 2003). L'étude de souches d'*E. coli* (en utilisant des biosenseurs luminescents par exemple) a révélé que les cellules ne possédant pas le gène *copA* étaient 2 fois plus sensibles au cuivre et à l'argent que la souche sauvage (Stoyanov, J. V. *et al.* 2003). Le même type d'étude a permis de mettre en avant l'importance de CopA dans l'homéostasie de l'argent et de l'or. Son expression est régulée par CueR, un activateur transcriptionnel induit par Cu(I) et Ag(I) (Outten, F. W. *et al.* 2000). L'expression de *copA* peut également être influencée par la protéine CpxR dont le gène est exprimé en réponse à un stress de l'enveloppe cellulaire (Outten, F. W. *et al.* 2001). CopA se situe dans la membrane interne. Elle est composée de 834 acides aminés et possède huit hélices  $\alpha$  transmembranaires. Elle est également constituée d'un site de liaison à l'ATP (dont elle utilise l'énergie d'hydrolyse), d'un site d'autophosphorylation, d'un domaine phosphatase (Solioz, M. et Vulpe, C. 1996) ainsi que deux sites de liaison métallique CXXC au niveau de son extrémité N-terminale cytoplasmique. Ces motifs ne sont cependant pas essentiels à la fonction ni à la spécificité métallique (Rensing, C. et Grass, G. 2003). Ils ont toutefois un rôle régulateur : le  $K_m$  de la réaction de transport du métal est plus grand lorsque ces motifs sont

présents sur la protéine (Rensing, C. *et al.* 2000). CopA exporte les ions cuivre sous la forme Cu(I) du cytoplasme vers le périplasme. Il est également capable de transporter les ions Ag(I).

#### ◆ *Le régulateur CueR*

CueR (régulateur d'export du cuivre) est un activateur de transcription de type MerR possédant une région de liaison à l'ADN en N-terminal, un site de liaison au cuivre en C-terminal et un domaine permettant la dimérisation. Il régule la transcription du système « CueO ». Il est composé en particulier de deux gènes *copA* et *cueO*, qui ne sont pas organisés en opéron. CueR est également activé par l'argent et l'or (Stoyanov, J. V. *et al.* 2003). CueR lierait les ions cuivre Cu(I) libres avec une affinité de l'ordre du zeptomolaire ( $10^{-21}$  M), ce qui représenterait moins d'un ion cuivre libre par cellule (Rae, T. D. *et al.* 1999). La structure cristallographique révèle que CueR (Changela, A. *et al.* 2003) lie un ion cuivre au niveau d'un site inaccessible au solvant, au sein d'une boucle située à l'interface des deux sous-unités monomériques. Seuls deux cystéines, essentielles, joueraient le rôle de ligands (Stoyanov, J. V. *et al.* 2003).

#### ◆ *CueO : oxydase à cuivre périplasmique*

Le gène *cueO*, régulé par CueR, et induit dès 3  $\mu$ M de cuivre (Outten, F. W. *et al.* 2000 ; Munson, G. P. *et al.* 2000), code pour l'oxydase à cuivre CueO, impliquée dans la détoxification du métal. En effet, la délétion du gène *cueO* rend les cellules concernées plus sensibles au cuivre (Grass, G. et Rensing, C. 2001). En tant qu'oxydase à cuivre, CueO couple l'oxydation du substrat à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Elle possède une activité de laccase, plus précisément de phénol oxydase et de ferroxidase. Elle a aussi pour fonction de protéger les enzymes périplasmiques des dommages induits par le cuivre (Grass, G. et Rensing, C. 2001). Elle catalyserait, en présence de cuivre, l'oxydation de l'entérobactine, sidérophore de catéchol très toxique pour *E. coli* (Grass G. *et al.* 2004). Elle oxyderait également les ions Cu(I) périplasmiques en ions Cu(II) moins perméables et moins toxiques (Singh, S. K. 2004). CueO lierait 5 ions cuivre par molécule et se caractérise par un centre à cuivre typique des laccases (Roberts, S. A. *et al.* 2002 ; Li, X. *et al.* 2007)) (Fig. 18). Elle possède aussi un motif à deux arginines et une séquence signal reconnue par le système TAT transportant les protéines liées à leur cofacteur dans le périplasme (Berks, B. C. *et al.* 2000). Enfin, son activité d'oxydase à cuivre est dépendante de l'oxygène : CueO ne fonctionne qu'en

conditions aérobies. *E. coli* possède un autre système intervenant dans l'homéostasie du cuivre en l'absence d'oxygène – l'opéron *cusCFBA* (Outten, F. W. *et al.* 2001).



**Figure 18** : Structure de CueO. Les atomes de cuivre sont représentés par les sphères bleues et l'oxygène par la sphère rouge (Roberts, S. A. *et al.* 2002).

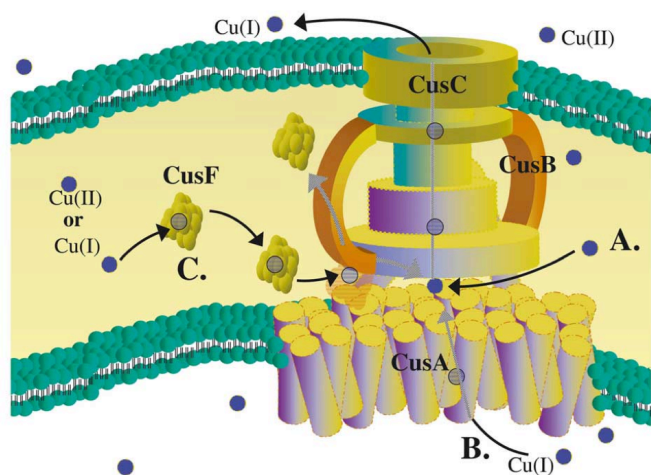
Enfin, la NADH-déshydrogénase-2 (NDH-2) appartenant à la chaîne respiratoire d'*E. coli* possède également une activité de cuprique réductase et la délétion du gène codant rend plus sensibles les souches concernées. Elle participerait ainsi également à la diminution des dommages du cuivre et/ou du stress oxydant dans la chaîne respiratoire et contribuerait à la détoxification du cuivre chez *E. coli* (Rodriguez-Montelongo L. *et al.* 2006).

### ◆ *Le système Cus*

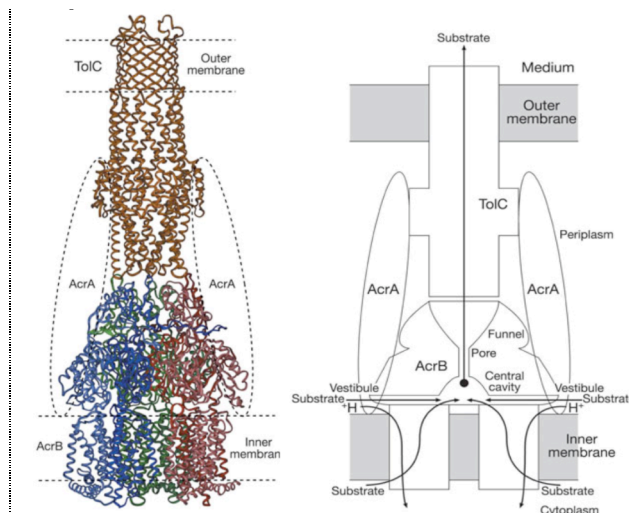
Le système Cus d'*E. coli* se trouve sur son chromosome et code pour un système de résistance au cuivre et à l'argent. Ce dernier est composé d'un antiporteur proton-cation CusCBA et d'une petite protéine périplasmique CusF (Fig. 19), contrôlés par le système de régulation CusRS.

Les gènes *cusCBA* codent pour une famille de transporteurs homologues impliqués dans l'export des ions métalliques, xénobiotiques et autres molécules chez les bactéries gram-négatives (Nies, D. H. 2003). Par analogie à l'organisation structurale du complexe AcrAB-TolC, premier complexe RND assurant l'efflux d'antibiotiques, sels, détergents, xénobiotiques solvant organiques et autres molécules organiques chez *E. coli* à avoir été caractérisé, un modèle a pu être avancé concernant CusCBA. AcrB est une protéine RND (Resistance Nodulation cell Division) de la membrane interne. Elle est trimérique, et possède 12 hélices transmembranaires par monomère. AcrA est une protéine de fusion membranaire (MFP) assurant la cohésion de AcrB et TolC (OMF – Outer Membrane Factor). TolC est la première OMF dont la structure est connue à haute résolution. Elle s'assemble en un homotrimère

formant un canal, enchâssé dans la membrane externe (Koronakis, V. *et al.* 2000 ; Andersen, C. *et al.* 2000), entre les domaines périplasmiques de la protéine AcrB et l'extérieur. La partie supérieure de AcrB s'ouvre comme un entonnoir où TolC peut s'accrocher. Les pores et les cavités ainsi formées serviraient de microenvironnements où le substrat s'accumulerait, permettant alors un rapide export par diffusion (Fig. 20).



**Figure 19** : Modèle fonctionnel du complexe d'efflux Cus, composé de la protéine de la membrane interne jouant le rôle de pompe CusA, de la protéine périplasmique CusB et de la protéine membranaire CusC formant un canal à travers l'espace périplasmique. L'entrée du cuivre peut se faire depuis le périplasmique (A), le cytoplasme (B), ou *via* la chaperonne CusF périplasmique (C) (Rensing, C. et Grass, G. 2003).



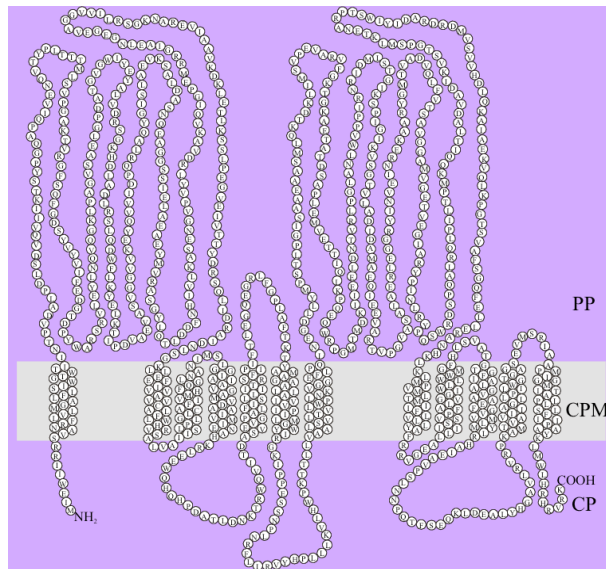
**Figure 20** : Modèle du complexe AcrB-AcrA-TolC et mécanisme proposé pour l'export des substrats par le système AcrAB-TolC (Murakami, S. *et al.* 2002 ; Murakami, S. *et al.* 2003).

Chez *E. coli*, le gène *cusA* code pour une protéine de la membrane interne appartenant à la famille RND. CusA se comporterait comme un transporteur secondaire utilisant l'énergie de l'antiport proton-substrat ; elle serait également responsable de la spécificité du substrat. Le gène *cusB* code pour la protéine de fusion membranaire (MFP) servant d'adaptateur entre CusA et CusC (OMF – Outer Membrane Factor) qui forme un canal à travers l'espace périplasmique (Rensing, C. et Grass, G. 2003) (Fig. 19). Par analogie à CzcA, protéine RND de *C. metallidurans* (Goldberg, M. *et al.* 1999), CusA (1047 acides aminés) posséderait 12 domaines transmembranaires et deux boucles périplasmiques contenant probablement les sites de liaison métallique (Fig 21). Plusieurs méthionines de la seconde boucle seraient également importantes dans la fonction de CusA (Franke, S. *et al.* 2003). CusA et CzcA font l'objet de l'étude décrite dans le chapitre 4.

CusF est une petite protéine périplasmique de 10 kDa se comportant comme une chaperonne à cuivre. Elle jouerait un rôle essentiel dans la tolérance au cuivre en transférant le



métal, sous forme Cu(I), au complexe d'efflux CusCBA (Franke, S. *et al.* 2003 ; Kittleson, J. T. *et al.* 2006 ; Loftin, I. R. *et al.* 2005). CusF possède des caractéristiques structurales uniques pour une protéine à cuivre : elle est formée de cinq feuillets se structurant en un tonneau  $\beta$ . Les données RMN suggèrent qu'un ion Cu(I) serait lié à une histidine et deux méthionines, à l'intérieur du tonneau  $\beta$  (Loftin, I. R. *et al.* 2005 ; Astashkin, A. V. *et al.* 2005).



**Figure 21** : Modèle topologique de CusA (Rensing, C. et Grass, G. 2003)

Les gènes *cusCFBA* sont régulés par *cusRS* qui active la transcription de *cusCFBA* en présence de cuivre (Munson, G. P. *et al.* 2000). Les gènes *cusRS* codent pour un système à deux composants permettant la transduction du signal en réponse à un stress cuivre (Franke, S. *et al.* 2003). CusR est un régulateur de réponse. Il active les deux opérons *cusCFBA* et *cusRS*, transcrits de façon divergente, en se fixant entre les deux promoteurs. CusS est un homologue des histidine kinases. Leurs plus proches homologues sont également des systèmes dipartites régulateurs de cuivre : CusR possède 61 % d'identité avec PcoR d'*E. coli* et CopR de *P. syringae* tandis que CusS possède 42 % d'identité avec CopS d'*E. syringae* et 38 % avec PcoS de *P. coli*.

Le système Cus transporterait le cuivre depuis l'espace périplasmique (Franke, S. *et al.* 2003), de la même façon qu'AcrB ou MexB transportent leurs substrats (Zgurskaya, H. I. et Nikaido, H. 2000). Il fonctionne tant en conditions aérobies qu'anaérobies.

Enfin, une fonction supplémentaire surprenante a été attribuée à CusC chez *E. coli* K1, la plus connue des bactéries gram-négatives causant des méningites néonatales. CusC contribuerait de façon déterminante à l'invasion des cellules endothéliales microvasculaires dans le cerveau (Wang, Y. et Kim, K. S. 2002).

◆ *Les régulons à cuivre*

L'homéostasie du cuivre est principalement maintenue en contrôlant l'export du cuivre en excès hors de la cellule. L'analyse par microarrays a permis de mettre en évidence 29 gènes affectés, spécifiquement et significativement, par le cuivre. Il existerait une hiérarchie entre ces gènes qui forment au moins quatre régulons (Yamamoto, K. et Ishihama, A. 2005) :

\* *Le régulon CusR* – Les microarrays confirment l'activation des opérons *cusCFBA* et *cusRS* par le cuivre. Le régulateur de réponse CusR régule strictement les deux opérons en se fixant entre les deux. Le système *cue* serait également fortement induit par le cuivre. De grandes concentrations de cuivre provoqueraient également la transcription de régulons impliqués dans la réponse au stress oxydant, au stress de l'enveloppe cellulaire et dans l'homéostasie du fer.

\* *Le régulon CueR* – L'activateur CueR, de type MerR, se fixe au niveau des promoteurs de *copA* et *cueO*. Il possède aussi de nombreux autres sites de liaison, régulant d'autres types de gènes.

\* *Le régulon CpxR* – Ce régulon est principalement responsable de la réponse induite par un stress au niveau de l'enveloppe cellulaire. Les gènes *cpxP* et *spy* sont particulièrement induits par le cuivre et contrôlés par le système à deux composants CpxA-CpxR.

\* *Le régulon YedW* – Le système à deux composants *yedVW* est considérablement induit par le cuivre. La kinase YedV transférerait le phosphate non seulement à son partenaire YedW, mais aussi à CusR dont l'activation dépendrait en partie de YedV.

Enfin, le facteur sigma de la famille de protéines extracytoplasmique, RpoE, induit par un stress métallique, a un rôle important pour obtenir une résistance maximale aux ions Zn(II), Cd(II), et Cu(II). RpoE est impliquée dans le maintien de l'intégrité des protéines périplasmiques et de la membrane externe (Ruiz, N. *et al.* 2006).

Mécanisme d'homéostasie...	...régulé par	Fonction
CopA	CueR (senseur de Cu(I) périplasmique) et CpxR (senseur du stress subi par l'enveloppe cellulaire)	Détoxication du Cu(I) cytoplasmique
CusCFBA	CusRS (système de régulation dipartite, senseur du Cu(I) périplasmique)	Détoxication du Cu(I) périplasmique (et probablement aussi cytoplasmique)
CueO	CueR (senseur de Cu(I) périplasmique)	Protection des protéines périplasmiques contre la toxicité induite par le cuivre
PcoABCD	PcoRS (système de régulation dipartite, senseur du Cu(I) périplasmique) (et CusRS)	Protection contre le stress extrême induit par le cuivre périplasmique
PcoE	CusRS (PcoRS)	Chaperonne à cuivre périplasmique, liaison au cuivre

**Tableau 4** : Eléments essentiels de l'homéostasie du cuivre chez *E. coli* (Rensing, C. et Grass, G. 2003)

### 3.3 La résistance au cuivre gouvernée par les gènes plasmidiques (Magnani, D. et Solioz, M. 2007)

*E. coli* possède plusieurs opérons chromosomiques impliqués dans la résistance au cuivre. Cependant, la capacité de survivre dans des environnements riches en cuivre nécessite des gènes de résistance plasmidiques. L'un des premiers systèmes bactériens plasmidiques de résistance au cuivre à avoir été étudié en détail fut identifié chez *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. Il fut découvert dans des bactéries résistantes au cuivre isolées à partir de cultures de tomates traitées par des agents antimicrobiens et antifongiques contenant du sulfate de cuivre, dans le sud de la Californie. La résistance au cuivre leur est conférée par l'opéron *copABCDRS* porté par le plasmide pPT23D, homologue au système Pco du plasmide pRJ1004 d'*E. coli*. Des clusters de gènes similaires à *pcoABCDRS* chez *E. coli* et *copABCDRS* chez *P. syringae* peuvent être identifiés chez de nombreuses bactéries, PcoCD ou CopCD constituant toujours les éléments essentiels du processus de résistance.

Le cluster de gènes *pco* du plasmide pRJ1004 d'*E. coli* contient, en plus de l'opéron *pcoABDCRS*, le gène *pcoE* transcrit à partir de son propre promoteur (Cooksey, D.A. 1994).

Le mécanisme d'efflux du cuivre, associé au système de résistance au cuivre *pco*, nécessiterait de l'énergie (Brown, N. L. *et al.* 1995).

Les cellules de *P. syringae* deviennent bleues lorsqu'elles sont exposées à de hautes concentrations en cuivre, le métal s'accumulant dans le périplasma.

La résistance au cuivre, gouvernée par les opérons *pco* chez *E. coli* et *cop* chez *P. syringae* s'est révélée être inductible par le cuivre (Mellano, M. A. et Cooksey, D. A. 1988). Un système dipartite, PcoRS ou CopRS, induit la transcription de l'opéron *pcoABCDRS*, au sein duquel PcoR agit comme un activateur transcriptionnel liant l'ADN. PcoS est une histidine kinase périplasmique, senseur du cuivre. Le gène *pcoE* est transcrit à partir d'un autre promoteur également sous le contrôle de PcoRS (Rouch, D. A. et Brown N. L. 1997). Les deux promoteurs sont toutefois également induits par le cuivre en l'absence du système de régulation *pcoRS* grâce à la présence d'un second système de régulation dépendant du cuivre, *cusRS* nécessaire à l'expression du système d'efflux *cusCFBA* (Franke, S. *et al.* 2003 ; Munson, G. P. *et al.* 2000).

Un autre type de régulateur, de type *pco*, a été identifié chez *Xanthomonas axonopodis*. Le système CopRS serait remplacé par une nouvelle protéine, CopL, régulant l'expression de l'oxydase CopA (Voloudakis, A. E. *et al.* 2005).

Les fonctions et relations entre les protéines Pco et Cop impliquées dans la résistance au cuivre sont représentées par la figure 22.

La protéine PcoA d'*E. coli* est une oxydase à cuivre de 66 kDa similaire à CueO d'*E. coli* et CopA de *P. syringae*. PcoA par analogie à CueO oxyderait les ions Cu(I) en Cu(II) moins toxiques et/ou oxyderait les sidérophores de catéchol comme l'entérobactine qui peut séquestrer le cuivre (Fig. 22). Elle est capable de remplacer CueO chez les souches d'*E. coli* qui en sont dépourvues (Rensing, C. et Grass, G. 2003). D'autre part, comme CueO, PcoA possède un motif arginine-arginine dans sa séquence « leader » et est probablement exportée à travers la membrane cytoplasmique par le système TAT.

La protéine PcoB, de 33 kDa, serait localisée dans la membrane externe. Elle permettrait la séquestration du cuivre et agirait de conserve avec PcoA pour conférer une plus grande résistance au métal.

PcoC est une protéine périplasmique de 12 kDa. Elle lierait les ions Cu(I) et Cu(II) de façon concomitante (Zhang, L. *et al.* 2006). PcoC est une chaperonne à cuivre originale dans le sens où elle ne contient pas de cystéine. Elle possède une structure en tonneau  $\beta$  avec deux sites de liaison du cuivre interdépendants, l'un spécifique du cuivre (I) et l'autre spécifique du cuivre (II). Elle délivre le cuivre, probablement Cu(I), à PcoD, protéine de 34 kDa située dans la membrane cytoplasmique.

Le gène *pcoE* est transcrit par son propre promoteur. PcoE est une petite protéine nécessaire pour obtenir une résistance maximale et fonctionnant comme chaperonne à cuivre dans le périplasma (Rensing, C. et Grass, G. 2003).

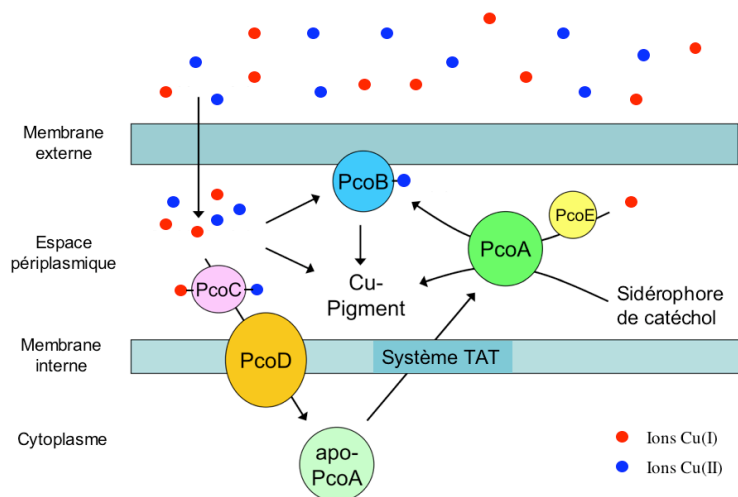


Figure 22 : Les systèmes Pco/Cop d'*E. Coli* et *P. syringae* (adapté de Magnani, D. et Solioz, M. 2007)

### 3.4 L'homéostasie du cuivre chez *Enterococcus hirae*

Depuis la découverte des deux ATPases à cuivre CopA et CopB chez *E. hirae* en 1992, l'étude de l'homéostasie du cuivre a systématiquement été faite en comparaison avec cette bactérie gram-négative. Elle possède un opéron *cop* nécessaire à l'homéostasie du cuivre et composé de quatre gènes *copY*, *copZ*, *copA* et *copB*. CopY joue le rôle de répresseur, CopZ est une chaperonne à cuivre et CopA et CopB sont des ATPases à cuivre de type CPx. La figure 23 représente l'état des connaissances sur *E. hirae* à ce jour.

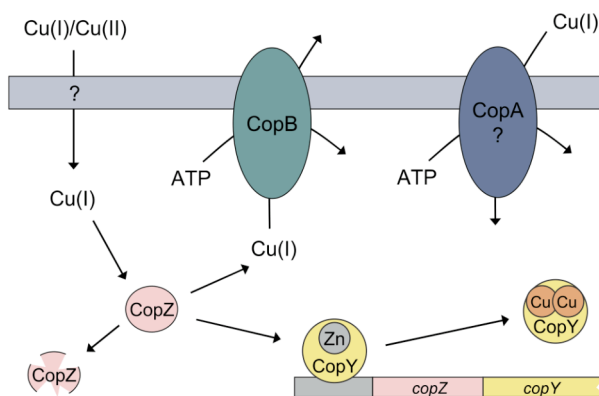


Figure 23 : L'homéostasie du cuivre chez *E. hirae* (Magnani, D. et Solioz, M. 2007).

#### ◆ CopZ : convoyeur intracellulaire de cuivre

Le transport intracellulaire du cuivre est gouverné par les chaperonnes à cuivre, protéines spécialisées délivrant le cuivre intracellulaire aux enzymes utilisant le métal (O'Halloran, T. V. et Culotta, V. C. 2000). Chez *E. hirae*, CopZ fonctionne comme une

chaperonne délivrant spécifiquement le cuivre au répresseur CopY. La structure de CopZ en solution, résolue par RMN, montre une structure globulaire : deux hélices  $\alpha$  parallèles à quatre feuillets  $\beta$  antiparallèles. Elle possède un motif de type CxxC pouvant lier les ions Cu(I) et Ag(I). CopZ interagit également avec CopA en présence de Cu(I). Des études préliminaires montrent que CopZ interagirait aussi avec CopB. La quantité de protéine CopZ augmente avec la concentration de cuivre jusqu'à 0,5 mM puis diminue pour des concentrations plus hautes en cuivre. Il a été montré *in vitro* qu'une protéase à sérine assurait la dégradation de CopZ à hautes concentrations en cuivre (Magnani, D. et Solioz, M. 2005).

### ◆ *La régulation de l'opéron cop*

CopY est un homodimère qui joue le rôle de répresseur en se fixant au niveau de deux régions distinctes sur le promoteur *cop* et réprime la transcription des quatre gènes *cop*, *copY*, *copZ*, *copA*, et *copB*. Chaque sous-unité de CopY se structure autour d'un ion zinc. La structure de CopY est modulaire et possède une région de liaison à l'ADN en N-terminal et un domaine de liaison au cuivre. La partie C-terminale contient quatre résidus cystéine comme chez d'autres régulateurs transcriptionnels tels que les facteurs transcriptionnels des transporteurs de cuivre Ctr1 ou Ctr3 chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Quand la transcription de l'opéron *cop* est activée, Cu(I)CopZ interagit avec CopY grâce à quatre résidus lysine essentiels en N-terminal et transfère deux ions cuivre par monomère de Zn(II)CopY, libérant ainsi Zn(II), ce qui provoque des changements conformationnels de CopY et une diminution de son affinité pour le promoteur, permettant alors l'expression des gènes en aval (Magnani, D. et Solioz, M. 2005).

### ◆ *Les ATPases CopA et CopB*

CopA possède une activité d'ATPase optimale à pH 5.7-6.5. Elle se caractérise également par un 'turnover' relativement faible par rapport aux ATPases non métalliques.

CopB confère la résistance au cuivre chez *E. hirae* en expulsant l'excès de cuivre. Elle appartient à la même famille que les ATPases ATP7A et ATP7B impliquées respectivement dans les maladies de Menkes et de Wilson (Magnani, D. et Solioz, M. 2007).

### 3.5 Les chalkophores

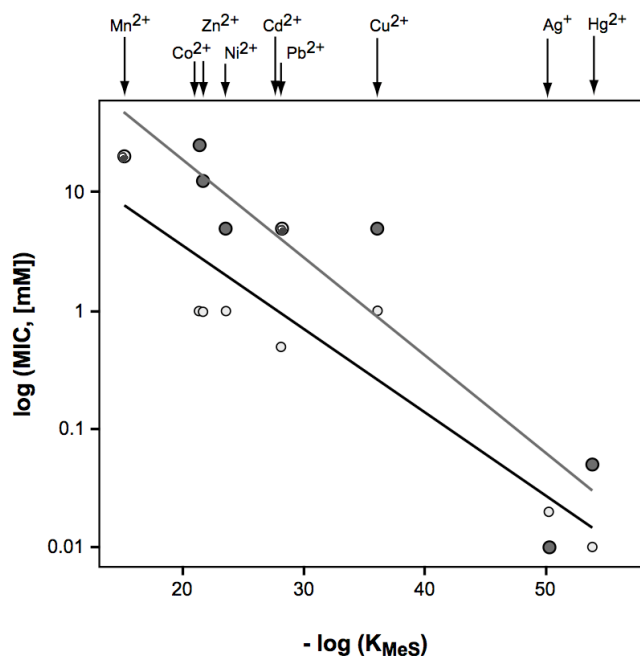
Les sidérophores sont très largement répandus dans la nature, jouant un rôle particulier dans l'acquisition de fer. Ce sont des chélateurs de fer extracellulaires sécrétés par les cellules. Ils permettent de fixer les ions ferriques présents en faible quantité. Des molécules analogues ont été mises en évidence chez certains méthanotrophes, micro-organismes ayant besoin du cuivre pour la biosynthèse des méthane monooxygénases et qui nécessitent un mécanisme efficace pour fixer le cuivre de l'environnement extérieur. La sécrétion d'un 'sidérophore' à cuivre, ou chalkophore, permettrait la croissance du micro-organisme dans un environnement pauvre en cuivre (Choi, D. W. *et al.* 2006).

## IV - Le cas de *Cupriavidus metallidurans* CH34

*Cupriavidus metallidurans* est une souche bactérienne, gram-négative, principalement présente dans les environnements industriels pollués rejetant des déchets métalliques. La première souche de ce groupe, *C. metallidurans* CH34, fut découverte à la fin des années 1970 dans un bassin de décantation d'une industrie produisant du zinc, près de Liège, en Belgique. Anciennement appelée *Alcaligenes eutrophus*, puis *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans*, et *Wautersia metallidurans*, *C. metallidurans* se révéla très résistante aux ions Zn(II), Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), CrO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Hg(II) et Pb(II). Bactérie chimiolithotrophe, elle est capable de se développer aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies en présence de H<sub>2</sub> (utilisé comme source d'énergie) et CO<sub>2</sub> (utilisé comme source de carbone). Elle possède une grande plasticité génomique lui permettant de s'adapter à un grand nombre de stress et sa capacité à exprimer des gènes homologues ou orthologues rend plus aisée sa manipulation génétique. *C. metallidurans* CH34 possède une température optimale de croissance de 30°C et ne peut se développer à plus de 37°C.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des métaux importants biologiquement ont été comparées chez *C. metallidurans* et *E. coli* (Mergeay, M. *et al.* 1985 ; Nies, D. H. 2003) (Fig. 24). Aucune bactérie ne voit sa croissance inhibée jusqu'à 50 mM de MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et Fe<sup>3+</sup>. Les deux espèces possèdent une CMI de 2 mM pour UO<sub>2</sub><sup>2-</sup>. *E. Coli* est plus résistante aux ions VO<sub>3</sub><sup>-</sup>, AsO<sub>4</sub><sup>-</sup> et SbO<sub>2</sub><sup>2-</sup>, et *C. metallidurans* est 2,5 fois plus résistante

aux ions  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Elle est également plus résistante aux cations  $\text{Co(II)}$ ,  $\text{Zn(II)}$ ,  $\text{Ni(II)}$ ,  $\text{Cu(II)}$ ,  $\text{Hg(II)}$ ,  $\text{Pb(II)}$  et  $\text{Tl(II)}$ . Elle est aussi capable de résister à un métalloïde comme le sélénite (Roux, M. *et al.* 2001). Sa résistance au cadmium est similaire à celle d'*E. coli* (Nies, D. H. 2003).



**Figure 24** : Toxicité des métaux lourds en fonction de l'affinité des cations pour les sulfures (pour *E. coli* – cercles blancs, et pour *C. metallidurans* – cercles grisés) (Nies, D. H. 2003).

*C. metallidurans* CH34 possède un génome complexe lui permettant de résister à ces métaux, en particulier deux plasmides, pMOL28 et pMOL30, en plus d'un mégaplasme (2,6 Mb), et d'un chromosome (3,9 Mb) (Fig. 25). Sa résistance aux ions  $\text{Zn(II)}$ ,  $\text{Cd(II)}$  et  $\text{Co(II)}$  (locus *czc*) est liée au plasmide pMOL30 (environ 234 kb), tandis que les gènes de résistance aux ions  $\text{Co(II)}$ ,  $\text{Ni(II)}$  (locus *cnr*) et chromates sont portés par le plasmide pMOL28 (171 kb). Les deux plasmides codent pour la résistance à  $\text{Tl(I)}$  et  $\text{Hg(II)}$ . Le locus *ncc* permet d'atteindre une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 40 mM en  $\text{Ni(II)}$  contre seulement 2,5 mM pour le déterminant génétique *cnr*. D'autres déterminants génétiques ont été décrits plus tard, comme le locus *pbr* (résistance au plomb), et le locus *cop* (résistance au cuivre), portés par le plasmide pMOL30.



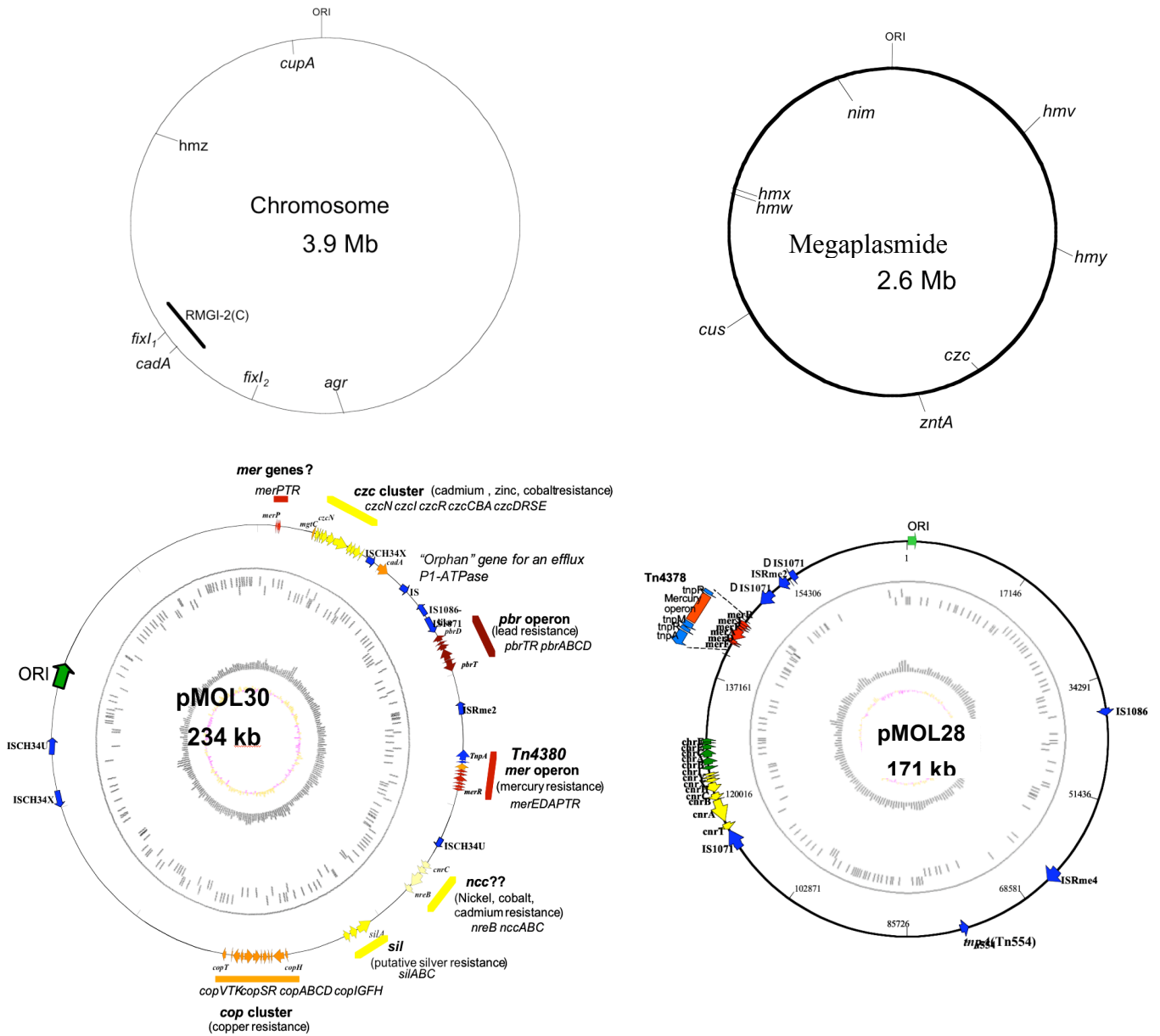


Figure 25 : Génome de *C. metallidurans* CH34

*C. metallidurans* CH34 possède donc une organisation génétique complexe (de nombreux déterminants génétiques de résistance à un grand nombre de métaux lourds portés par des systèmes différents) ce qui lui permet de survivre dans des environnements pollués par de grandes concentrations de métaux lourds. L'étude de la croissance de la bactérie en fonction de la température a permis de mettre en évidence un fort taux de mortalité à 37°C et un haut pourcentage de mutants parmi les bactéries survivantes (Taghavi, S. *et al.* 1997). A 36°C, aucune mortalité ni aucune mutation ne sont détectées (Mergeay M. 2000). Une température supérieure ou égale à 37°C causerait un stress cellulaire auquel la bactérie répondrait en exprimant de nouvelles fonctions entraînant des mutations, létales ou non. La génération de ces mutants résulterait de l'activité d'éléments génétiques mobiles (comme les transposons ;

Mergeay, M. 2000). Ce phénomène mutatoire appelé TIMM (Temperature-Induced Mutagenesis and Mortality) révèle la plasticité génomique de *C. metallidurans* CH34 et lui permettrait de s'adapter à des conditions environnementales extrêmement dures et de survivre face à divers stress extérieurs (Taghavi, S. *et al.* 1997).

*C. metallidurans* CH34 représente ainsi une souche modèle dans l'étude de la résistance aux métaux lourds chez les bactéries et permet d'envisager son utilisation dans le développement de nouveaux outils en biologie comme les biosenseurs (Tibazarwa, C. *et al.* 2001) ou pour la bioremédiation de nombreux métaux (Valls, M. et de Lorenzo, V. 2002 ; Nies, D. H. 2000).

### 4.1 Les gènes de résistance aux métaux

#### 4.1.1 Les gènes de régulation : le système RS

Les gènes de régulation chez *C. metallidurans* sont étroitement liés aux gènes de structure. Les systèmes RS constituent l'un des mécanismes majeurs responsables de l'adaptation des organismes vivants à des changements d'environnement. Chaque système fait intervenir une kinase généralement membranaire possédant un motif de reconnaissance et un facteur de transcription régulateur, activant ou réprimant l'expression des gènes. A la suite d'un stimulus externe, la kinase phosphoryle l'un de ces résidus histidine et transfère le groupement phosphate à un résidu aspartate sur la protéine régulatrice. De tels systèmes permettent en général une réponse adaptée à un large spectre de stimuli environnementaux et jouent un rôle crucial dans les processus métaboliques comme la respiration, la sporulation, la virulence... (Koretke, K. K. *et al.*, 2000). *C. metallidurans* contient un grand nombre de protéines codées par ce genre de système régulateur à deux composants RS, avec 42 kinases et 67 protéines régulatrices identifiées, contre respectivement 29 et 37 chez *E. coli*. La régulation par système de type RS est une caractéristique des opérons contenant des gènes RND. Chez *C. metallidurans*, au moins sept systèmes à deux composants sont associés à des gènes de la famille RND, dont cinq opérons de type *czc* ; cependant, ils peuvent être situés en amont, ou en aval des gènes de structure, ou même de part et d'autre de l'opéron.

#### 4.1.2 Le cluster de gènes HME-RND

Le génome de *C. metallidurans* contient au moins douze gènes codant pour un système d'efflux HME-RND (paralogues et orthologues de CzcA) (Tseng, T. T. *et al.* 1999) : l'un (*cnrA*) est porté par le plasmide pMOL28, trois par le plasmide pMOL30 et huit par le chromosome. Le nombre élevé de paralogues *czcA* révèle la longue évolution adaptative de *C. metallidurans* aux biotopes riches en métaux.

Chez *C. metallidurans* CH34, les HME peuvent être divisées en quatre classes : les HME1 contenant l'opéron *czc*, les HME2 comprenant l'opéron *cnr* du plasmide pMOL28, les HME3 dont la fonction est encore inconnue et les HME4 possédant les deux opérons intervenant dans la résistance au cuivre et à l'argent sur le plasmide pMOL30.

Le premier membre identifié de la famille RND a été la protéine CzcA, suivie de CnrA (Saier, M. H., Jr. *et al.* 1994). La présence du plus grand des deux plasmides, pMOL30, augmente 50 fois la CMI du zinc, 33 fois celle du cobalt et 7 fois celle du cadmium (Mergeay, M. 1985), tandis que le second plasmide, pMOL28, permet la résistance au nickel et augmente d'un facteur 16 la résistance au cobalt.

Le déterminant *czc* se trouve sur le plasmide pMOL30 (Nies, D. H. *et al.*, 1989). Les gènes de structure codent pour l'OMF CzcC, la MFP CzcB et la protéine RND CzcA, et forment l'opéron *czcCBA*. Ils sont accompagnés de plusieurs gènes de régulation métal-dépendants (van der Lelie, D. *et al.* 1997 ; Grosse C. *et al.* 1999). L'efflux des cations nécessite la force motrice des protons.

Le déterminant *cnr*, porté par pMOL28, implique également l'efflux de cations. *cnrCBA* code aussi pour l'OMF CnrC, la MFP CnrB et la protéine RND CnrA. Le plasmide pMOL30 contient également le déterminant *ncc* qui pourrait contribuer à la résistance aux cobalt, zinc et cadmium, mais *ncc* ne possède pas de gènes de régulation. Aucune expression n'a pu être mesurée (Rensing, C. et Grass, G. 1997).

#### 4.1.3 Les autres clusters et opérons

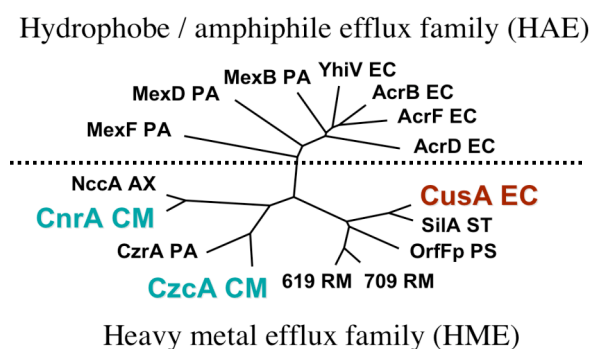
La plupart des clusters et opérons impliqués dans la résistance aux métaux lourds chez *C. metallidurans* CH34 se situe sur le plasmide pMOL30. *merPTR* code pour la résistance au mercure. Le cluster *czc* est impliqué dans la résistance aux ions cadmium, zinc et cobalt. L'opéron *pbr* intervient dans la résistance au plomb, et l'opéron *mer* dans la résistance au mercure. L'opéron *ncc* permet quant à lui la résistance aux ions nickel, cobalt, cadmium et

l'opéron *sil* la résistance aux ions argent. Enfin, la résistance au cuivre est gouvernée par le cluster *cop*, composé de 19 gènes (voir paragraphe 4.4).

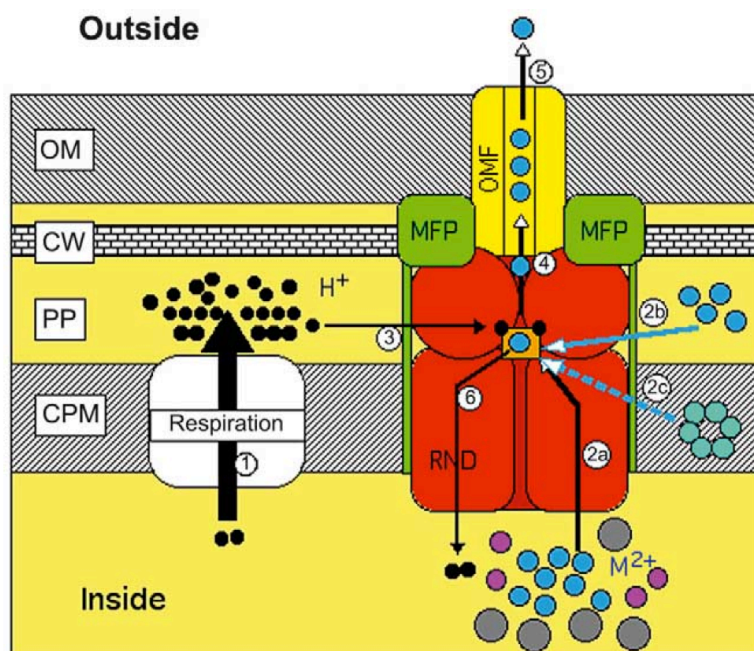
## 4.2 La famille RND (Resistance Nodulation cell Division)

Contrairement aux bactéries gram-positives, une bactérie gram-négative doit posséder un système de transport à travers la membrane externe pour protéger le compartiment périplasmique vital des dommages induits par les métaux. Les protéines RND ont d'abord été décrites comme des transporteurs bactériens impliqués dans la résistance aux métaux lourds (*C. metallidurans* notée CM), la nodulation (*Mesorhizobium lotii*), et la division cellulaire (*E. coli* notée EC). Cette famille RND a ensuite été agrandie : elle rassemble sept familles de protéines présentes dans tous les règnes importants du vivant. Chez les bactéries et archaebactéries, les membres de cette superfamille jouent un rôle dans le transport de métaux lourds, de composés hydrophobes, amphiphiles, de facteurs de nodulation, et dans l'export de protéines (SecDF).

Chez les eucaryotes, les protéines RND interviennent dans le transport de stérols ou jouent le rôle de récepteurs. Seules les protéines HME-RND (Heavy Metal Efflux – Resistance Nodulation cell Division) et HAE-RND (Hydrophobic and Amphiphilic Efflux – Resistance Nodulation cell Division) seront étudiées ici.



Dans la plupart des cas, la protéine RND fait partie d'un complexe de trois protéines codées par un seul opéron. La protéine RND joue le rôle d'antiport proton – substrat (Goldberg, M. *et al.* 1999). Un second gène de l'opéron, voisin immédiat du gène RND, code pour une protéine périplasmique de fusion membranaire (MFP). Outre les MFP, de nombreuses protéines RND coopèrent avec une troisième protéine appartenant à la famille des OMF (Outer Membrane Factors). Les OMF sont associées à la membrane externe et traversent l'espace périplasmique. Ces trois protéines forment ainsi un complexe d'efflux transportant le substrat du cytoplasme vers le périplasma à travers la membrane, puis du périplasma vers l'extérieur à travers la membrane externe (Fig. 26) (Nies, D. H. 2003). Pour distinguer ce système de transport des systèmes ABC utilisant l'énergie de l'ATP, les systèmes d'export RND seront appelés transporteurs CBA.



**Figure 26 :** Mécanisme modèle de fonctionnement des protéines RND. L'action des protéines RND utilise l'énergie des protons (ronds noirs) d'abord expulsés par la chaîne respiratoire (1). Dans le cas des protéines HME1 et HME2, les cations métalliques divalents  $M^{2+}$  migrent à travers le canal et sont pris en charge par un substrat périplasmique (carré orange, 2a). Ce site est aussi accessible aux cations périplasmiques (2b) en particulier dans le cas de  $Cu^+$  et des protéines HME4. Les transporteurs HAE lieraient leurs substrats organiques depuis l'environnement hydrophobe de la membrane cytoplasmique (2c). L'affinité du site de liaison périplasmique est diminué par sa protonation par les protons périplasmiques (3) et cette énergie est utilisée pour accumuler les substrats dans le tube formé par l'OMF (4). Cette haute concentration permet la diffusion des substrats vers l'extérieur (5). Le site de liaison périplasmique est alors déprotoné par l'import de protons dans le cytoplasme (6). (OM : Outer Membrane ; CW : Cell Wall ; Periplasmic Space ; CPM : Cytoplasmic Membrane) (Nies, D. H. 2003)

De la même façon que les protéines HME-RND exportent les ions métalliques, généralement du périplasme vers l'extérieur, les protéines HAE-RND transporteront les substances organiques telles que les antibiotiques à partir du périplasme (Kohler, T. *et al.* 1999). Les mécanismes de résistance aux antibiotiques via les protéines RND représentent 50 % des mécanismes de résistance découverts dans les souches *Pseudomonas aeruginosa* résistantes qui apparaissent *in vivo* en milieu hospitalier, d'où l'importance des protéines RND d'un point de vue médical. *P. aeruginosa* contient au moins 13 systèmes de transport RND, une protéine HME-RND et 12 HAE-RND dont MexB, MexD et MexF. Ces protéines permettent la détoxification d'une grande variété de molécules organiques avec leurs MFP respectives (MexA, MexC et MexE) et leurs OMF (OprM, OprJ et OprN).

*E. coli* contient 6 protéines HAE-RND, dont la plus connue constitue le système AcrAB-TolC, et une seule protéine HME-RND, CusA.

Système de résistance aux métaux	<i>E. coli</i>	<i>C. metallidurans</i>
RND-HAE	6	8
RND-HME	1	12

**Tableau 5 :** Comparaison génomique (Nies, D. H. 2003)

Bien que l'importance de leur rôle soit sans équivoque, seuls quelques membres de cette famille de protéines ont été étudiés. Par exemple, la protéine CzcA chez *C. metallidurans* CH34 jouerait le rôle d'antiport proton-cations (Cd, Zn, Co) dépendant de la force motrice des protons. La fonction d'AcrB dépendrait de la différence de pH entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et catalyserait l'extrusion de phospholipides. Dans tous les cas, les membres des deux familles RND, HAE et HME, sont des antiports proton-substrat.

Les protéines RND sont de grosses protéines de plus de 1000 acides aminés constituées de deux boucles périplasmiques longues de 300 acides aminés et de 12 hélices transmembranaires. La quatrième hélice contient des acides aminés conservés dans la plupart des protéines RND. La présence d'acides aminés chargés est nécessaire au sein de la quatrième hélice pour la fonction d'antiport proton-substrat. Par exemple, l'aspartate et le glutamate sont essentiels pour la fonction de CusA (Franke, S. *et al.* 2003). Ceci a permis de proposer un premier modèle de fonctionnement des systèmes RND (Fig. 26).

Que l'exportation des cations se fasse à partir du périplasma (comme c'est probablement le cas pour Cu(I)), depuis le cytoplasme (comme peut-être pour Zn(II)), ou depuis l'intérieur de la membrane cytoplasmique (comme vraisemblablement dans le cas des substrats hydrophobes des protéines HAE-RND), dans tous les cas un cycle de protonation/déprotonation permet de coupler la liaison du substrat et l'import d'un proton. De plus, la protonation faciliterait l'adaptation du site de liaison chargé négativement vers un site neutre (protéines HME-RND), ou d'un site hydrophile vers un site hydrophobe (protéines HAE-RND). Une grande partie des avancées dans la compréhension du fonctionnement des systèmes RND ont été rendues possibles par l'obtention de la structure tridimensionnelle d'AcrB (Fig. 20) (Murakami, S. *et al.* 2006 ; Seeger, M. A. *et al.* 2006 ; Schuldiner, S. 2006 ; Eswaran, J. *et al.* 2004 ; Murakami, S. *et al.* 2002 ; Pos, K. M. *et al.* 2004).

Les MFP interagissent avec les protéines RND et sont reliées à la membrane cytoplasmique par un résidu hydrophobe. Elles ont une structure flexible permettant un bon contact entre la pompe RND et le tube OMF. Elles ne fusionnent probablement pas avec les membranes cytoplasmique et externe mais elles permettent la connexion de l'OMF avec la protéine RND. Les MFP et OMF interagiraient pour former un canal actif à travers le périplasma connectant le cytoplasme à la membrane externe (Fig. 26). Les protéines OMF et MFP joueraient un rôle dans la reconnaissance du substrat.

Les protéines RND constituent ainsi l'élément central et essentiel des systèmes d'efflux CBA. Elles jouent un rôle actif dans le processus de transport, déterminent la spécificité du substrat et sont impliquées dans l'assemblage du complexe protéique.

### 4.3 Les autres protéines impliquées dans la résistance aux métaux lourds

#### 4.3.1 Les protéines CDF (Cations Diffusion Facilitators)

Les protéines CDF forment une famille de transporteurs de métaux présents dans tous les règnes du vivant. Leurs substrats sont  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , et  $Fe^{2+}$ . Leur transport se fait grâce à un gradient de concentration, un gradient chimiosmotique, une différence de potentiel, une différence de pH ou un gradient de potassium (Nies, D. H. 2003).

L'archétype de cette famille est la protéine CzcD chez *C. metallidurans* CH34 capable de réguler l'expression de CzcCBA et de permettre la résistance aux ions  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  en l'absence du système CzcCBA. Une des deux protéines CDF d'*E. coli*, ZitB, a été caractérisée également en tant que système de résistance au zinc (Grass, G. et Rensing, C. 2001). Elle diminue la concentration cellulaire en  $Zn^{2+}$  grâce à un gradient de potassium et la force motrice des protons.

#### 4.3.2 Les ATPases de type P : système de base de défense contre les métaux lourds

*C. metallidurans* contient 11 gènes codant pour ces protéines dont au moins huit coderaient pour des ATPases transportant des métaux, contre environ 2 ou 3 gènes chez les bactéries en général (Mergeay, M. *et al.* 2003).

#### 4.3.3 Les autres systèmes d'export de métaux lourds : les protéines CHR et les systèmes NreB et CnrT

##### ◆ *Les protéines CHR détoxiquent le chromate*

La famille CHR contient des protéines liées à la membrane cytoplasmique par 10 encrages transmembranaires. Ce sont probablement des pompes à efflux du chromate tirant leur énergie du gradient chimiosmotique. *C. metallidurans* contiendrait 4 protéines CHR.

##### ◆ *Les protéines de type NreB*

Il arrive qu'une protéine CHR soit accompagnée d'une protéine de type NreB. Le gène *nreB* est induit par le nickel et confère une résistance au nickel chez *C. metallidurans* et *E. coli*.

Les protéines NreB sont constituées généralement de 400 acides aminés, contiennent probablement 12 domaines transmembranaires et une extrémité C-terminal riche en résidus histidine.

◆ *Les protéines de type CnrT*

Le gène *cnrT* est situé directement en aval du déterminant de résistance *cnr* sur le plasmide pMOL28 chez *C. metallidurans*. Ces protéines possèdent 12 ou 14 domaines transmembranaires et une extrémité C-terminal riche en résidus histidine.

Les protéines CnrT et NreB ne possèdent pas de site de liaison à l'ATP et utilisent probablement la force motrice de protons, comme les protéines CDF. Ces trois groupes de protéines contiennent des boucles cytoplasmiques riches en sites de liaison métalliques potentiels et exportent leurs substrats à travers la membrane cytoplasmique. Les protéines CnrT et NreB joueraient le rôle de second filtre pour Ni<sup>2+</sup> et les protéines CDF pour Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> et Cd<sup>2+</sup>.

#### 4.4 Le cluster *cop*

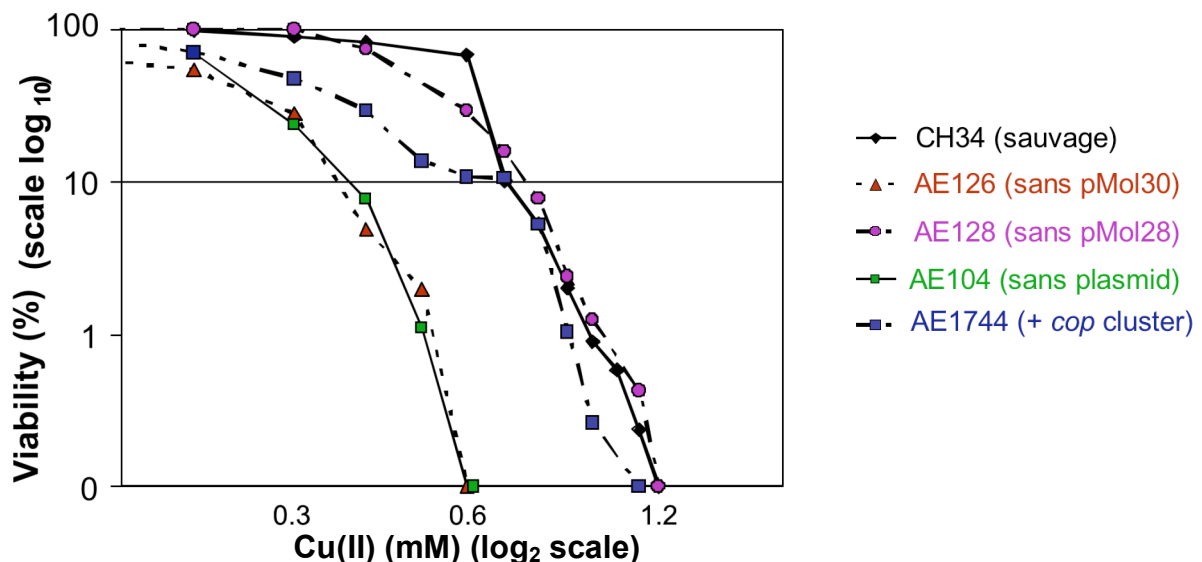
Il a été montré, chez *C. metallidurans*, que le plasmide pMOL30 était impliqué dans la résistance au cuivre (Diels, L. *et al.* 1989 ; Corbisier, P. 1997). Un catalogue des gènes participant à la résistance aux métaux lourds chez *C. metallidurans* (Mergeay, M. *et al.* 2003) a été réalisée à partir des séquences fournies par US Department of Energy – University of California Joint Genome Institute. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence des gènes *copRScopABCD* sur le plasmide pMOL30 mais également sur le mégaplasmide de 2,6 Mb. Ces gènes sont également présents chez *R. solanacearum*, un pathogène des plantes, très proche de *C. metallidurans* (Salanoubat, M. *et al.* 2002). La liste s'est enrichie d'autres gènes chromosomiques qui pourraient être impliqués dans la résistance et l'homéostasie du cuivre, comme les gènes *cus* (Nies, D. H. 2003 ; Rensing, C. et Grass, G. 2003) et un gène codant pour une ATPase à cuivre, CupA (Mergeay, M. *et al.* 2003) (locus *cupC cupA cupR*).



Peu d'informations existent sur la résistance au cuivre chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Il a été montré cependant, à la suite d'études par transcriptomique, que cette résistance impliquait le plasmide pMOL30, et plus particulièrement le cluster *cop*, porté par ce plasmide (Monchy, S. *et al.* 2006).

#### 4.4.1 Le plasmide pMOL30 et le phénotype de résistance au cuivre (Monchy, S. *et al.* 2006)

Plusieurs phénotypes, différents de la souche *C. metallidurans* CH34, ont été utilisés pour étudier la sensibilité de cette dernière vis-à-vis du cuivre (Fig. 27). La souche sauvage portant les plasmides pMOL28 et pMOL30 (losanges noirs) et la souche AE128 ne possédant pas le plasmide pMOL28 (cercles violets) sont caractérisées par la même valeur de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les ions Cu(II), valeur 2 à 3 fois plus grande que celle relative aux souches sans le plasmide pMOL30 (AE126 et AE104). Cette différence entre les valeurs de CMI est toutefois plus faible que celles observées pour des phénotypes liés à d'autres métaux lourds. Par exemple, la présence du plasmide pMOL30 permet une résistance aux ions cadmium, zinc et cobalt (impliquant *czc* porté par pMOL30) respectivement 4, 33, et 133 fois plus grande pour la souche correspondante, en comparaison de celle ne possédant plus le plasmide pMOL30. De même, pMOL28 assure une résistance aux ions nickel (*cnr* sur pMOL28) 4 fois plus grande qu'en l'absence dudit plasmide.



**Figure 27** : Phénotypes de résistance aux métaux chez *C. metallidurans*. Pourcentage de bactéries viables en fonction de quantités croissantes de cuivre Cu(II) (adapté de Monchy, S. *et al.* 2006).

L'insertion de fragments de plasmide pMOL30 dans une souche sans plasmide (appelée AE104) a permis de mettre en évidence la grande résistance des souches résultantes vis-à-vis du cuivre. Le séquençage de ces inserts a montré la présence d'ORFs similaires aux gènes communément impliqués dans la résistance au cuivre chez d'autres bactéries, tels que *copRSABCD* et *copF* (Monchy, S. *et al.* 2006).

#### 4.4.2 Le cluster de gènes impliqué dans la résistance au cuivre

Le séquençage de la région permettant la résistance au cuivre, au sein du plasmide pMOL30, a permis d'identifier un cluster composé de 19 gènes accompagnés de gènes appelés *resU* (codant pour une recombinaison) et *caiA* (codant pour une acétyl-CoA déshydrogénase). Les 19 gènes (Fig. 28), désignés par *copVTMKNSRABCDIJGFLQHE*, sont organisés comme suit :

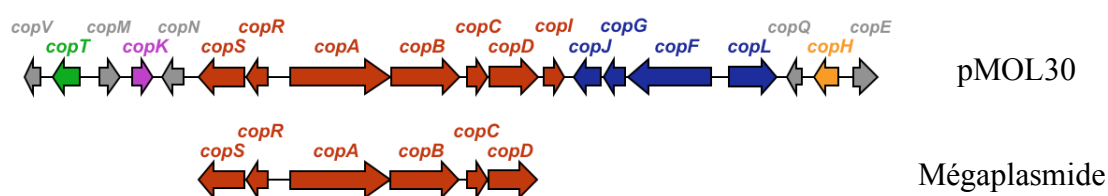


Figure 28 : Organisation du cluster *cop* chez *C. metallidurans* (Monchy, S. *et al.* 2006)

Les gènes *copRScopABCD* représentent les gènes permettant une résistance minimale au cuivre chez les bactéries. Chez *C. metallidurans* CH34, il est à noter que les gènes *copRScopABCD* sont portés par le plasmide pMOL30 mais également par le mégaplasmide. Ils sont donc présents en double exemplaire au sein du génotype de *C. metallidurans* CH34. Une différence existe toutefois entre les deux : le gène *copI* est ajouté en aval des gènes *copABCD* sur le plasmide pMOL30. Les premières informations concernant ces différents gènes ont été apportées par transcriptomique (Monchy, S. *et al.* 2006).

Les gènes *copS* (1388 paires de bases - pb) et *copR* (683 pb) codent pour les protéines CopS et CopR, jouant le rôle de régulateurs (Mergeay, M. *et al.* 2003 ; Mills, S. D. *et al.* 1994). Les deux gènes sont situés juste en amont de l'opéron *copABCDI* et transcrits en direction inverse (Fig. 23). Cette organisation génique est différente de celle présente chez d'autres bactéries comme *E. coli* par exemple, chez qui l'on trouve l'organisation : *pcoABCDRSE*.

**Protéines probablement impliquées dans la détoxification du périplasme :**

**La protéine CopA**, codée par le gène *copA* (1841 pb), est un homologue de CopA chez *P. syringae*, et de PcoA chez la souche *E. coli* portant le plasmide pRJ1004. CopA est présente à la fois dans le cytoplasme et dans le périplasme. C'est une oxydase à cuivre, oxydant les ions Cu(I) en Cu(II) (Rensing, C. et Grass, G. 2003). Elle contient un motif MGGM répété 5 fois. Pour comparaison, la protéine CopA de *P. syringae* possède 2 motifs MGGM et deux motifs MAGM et est capable de lier 11 ions Cu(II) (Cha, J. S. et Cooksey, D. A. 1991). Contrairement aux clusters *copRScopABCD* du mégaplasme où les gènes *copA* et *copB* se chevauchent, un espace intergénique de 32 pb existe entre *copA* et *copB* au sein du plasmide pMOL30.

**La protéine CopB**, codée par le gène *copB* (1488 pb), contient une région extrêmement riche en résidus méthionine (46 résidus méthionine). Sa région N-terminale contient 10 répétitions du motif caractéristique de liaison aux ions Cu(I) : MXXMXHXXMXXM où X représente un acide aminé autre que M et H. Pour comparaison, ce motif est présent seulement une ou deux fois au sein des autres protéines CopB chez les bactéries, comme celle codée par le gène *copB* présent sur le mégaplasme de *C. metallidurans* CH34.

**La protéine CopC**, codée par le gène *copC* (395 pb), contient deux sites potentiels de liaison au cuivre : l'un riche en résidus méthionine, similaire au motif présent chez CopB, et liant les ions Cu(I), l'autre liant les ions Cu(II) (Arnesano, F. *et al.* 2003). La présence du motif riche en méthionines chez CopB et CopC suggère une étroite interaction entre ces deux protéines. La présence des deux sites Cu(I) et Cu(II) laisse prévoir un mécanisme de détoxification impliquant les deux ions (Djoko, K. Y. *et al.* 2007 ; Zhang, L. *et al.* 2006 ; Koay, M. *et al.* 2005).

**La protéine CopD**, codée par le gène *copD* (914 pb), est composée de huit hélices transmembranaires formant probablement un canal permettant à CopA de lier les ions Cu(II) (Rensing, C. et Grass, G. 2003).

Enfin, **la protéine CopI**, codée par *copI* (473 pb), possède une grande homologie avec les oxydoréductases. Elle possède un orthologue, appelé CopC chez *Aeromonas veronii*, dont le gène se trouve en amont des gènes *copABCD*. Il a été montré que cet orthologue était impliquée dans la résistance au cuivre (Francki, K. T. *et al.* 2000). L'association *copABcopI* chez *A. veronii* suggère que CopI jouerait un rôle dans les processus de détoxification périplasmique et de transport du cuivre gouvernés par les gènes *copABCD*. CopI contient le motif MEHEIM, similaire au motif MXHXXM répété 10 fois chez CopB.

**Ainsi, les 4 protéines CopA, CopB, CopC et CopI contiennent un motif riche en méthionines et interviendraient probablement dans la détoxification du périplasme.**

### **Protéines probablement impliquées dans la détoxification du périplasma :**

En aval du cluster *copABCDI*, se trouvent les gènes *copFGJ*, transcrits en sens inverse à *copABCDI*.

Le gène *copF* (2414 pb) code pour l'ATPase de type P1, **CopF**. Celle-ci serait localisée dans la membrane interne, ses hélices transmembranaires formant probablement un canal à cations. Elle contient un domaine de liaison métallique riche en résidus histidine du côté N-terminal (Mergeay, M. *et al.* 2003 ; Monchy, S. *et al.* 2006). CopF contiendrait également un domaine TRASH en N-terminal et le motif CSNSC. Le domaine TRASH représente un système impliqué dans le transport de métaux (Ettema, T. J. *et al.* 2003). CopF interviendrait probablement dans l'efflux des ions Cu(I) du cytoplasme vers le périplasma. Pour comparaison, les autres protéines du cluster *cop* possédant un motif riche en résidus cystéine du type CXXC ou CXCC, comme CopT, CopL, CopJ et CopG, ne contiennent pas de domaine TRASH.

Très peu d'informations concernant **la protéine CopG** sont connues. Codée par le gène *copG* (410 pb), elle possède une séquence signal et serait donc périplasmique. Elle possède un motif riche en cystéines, résidus possédant une grande affinité pour les métaux : CXCC.

**CopJ**, codée par *copJ* (521 pb), possède des similarités avec les protéines de type cytochrome *c* et contient le motif riche en résidus susceptibles de lier les métaux : CXXCH.

Le gène *copL* (1262 pb) (en bleu, à droite de *copF*) est transcrit en sens inverse à *copFGJ*. **La protéine CopL** contient un motif riche en résidus cystéine : HXCXCC. CopL intervient probablement dans la régulation de l'ATPase CopF.

***L'ensemble des gènes copFGJ et copL code donc pour des protéines possédant un motif riche en résidus cystéines (CXCC ou CXXC), protéines probablement impliquées dans la détoxification du cytoplasme.***

### **Le gène *copH* et la protéine CopH :**

**Le gène *copH*** (458 pb) ne fait partie d'aucun groupe de gènes au sein du cluster *cop* ; il est transcrit, seul, en sens inverse à *copABCDI*. D'autre part, la concentration minimale inhibitrice (CMI), en cuivre, est abaissée à une valeur comprise entre 0,8 et 1 mM Cu(II) pour une souche dans laquelle seul le gène *copH* est supprimé (Tab. 6). Pour comparaison, la souche sauvage se caractérise par une CMI égale à 1,2 mM Cu(II) (Fig. 27). **La protéine CopH** ne possède qu'un seul homologue, ou plus précisément paralogue, la protéine CzcE, codée par le

gène *czcE* localisé dans l'opéron *czc* permettant la résistance aux cadmium, zinc et cobalt chez *C. metallidurans* CH34 et présent également sur le plasmide pMOL30. CopH ne possède ni résidu méthionine, ni cystéine, mais seulement 2 résidus histidine et 12 carboxylates susceptibles de lier les métaux.

	Souche <i>C. metallidurans</i> CH34 sauvage	<i>C. metallidurans</i> $\Delta cop$	<i>C. metallidurans</i> $\Delta copH$	<i>E. coli</i>
<b>Concentration minimale inhibitrice (CMI) en Cu(II)</b>	1,2 mM Cu(II)	0,6 mM	0,8 – 1 mM	1 mM

**Tableau 6** : Comparaison des CMI en cuivre pour la souche *C. metallidurans* CH34 sauvage, pour la souche ne possédant plus le cluster *cop*, pour la souche ne possédant plus le gène *copH*, et pour *E. coli* sauvage.

### Les autres protéines codées par les gènes du cluster *cop* :

**La protéine CopK**, codée par le gène *copK* (281 pb), possède, du côté C-terminal, un motif riche en résidus méthionine : MXMX<sub>7</sub>MXM. Il a été montré que CopK liait les ions Cu(I) et était impliquée dans la détoxification du périplasma. Sa structure a été résolue par RMN (Bersch, B. *et al.* en préparation).

**La protéine CopT**, codée par *copT* (761 pb), possède une très grande homologie avec une partie de la protéine PbrT, codée par le gène *pbrT* et faisant partie de l'opéron *pbr* porté par le plasmide pMOL30 (Borremans, B. *et al.* 2001). Elle contient le domaine de type cytochrome *c* présent chez PbrT, sans posséder le domaine transmembranaire qui est *a priori* impliqué dans le transport des métaux du périplasma vers le cytoplasme (Borremans, B. *et al.* 2001).

Enfin, **les cinq gènes *copV*** (350 pb), ***copM*** (407 pb), ***copN*** (491 pb), ***copQ*** (245 pb) et ***copE*** (632 pb) ne font pas non plus partie d'un groupement de gènes au sein du cluster *cop* et sont transcrits seuls. Ils codent pour des protéines ne possédant aucun équivalent dans les bases de données. Aucune fonction ne peut leur être assignée *a priori*.

CopM et CopQ possèdent une séquence signal et seraient, de ce fait, probablement des protéines périplasmiques. Elle se caractérisent par une faible masse moléculaire. CopQ, en particulier, ne possède que 52 acides aminés.

CopM, CopN et CopE seraient plutôt cytoplasmiques.

◆ *La transcription des 19 gènes cop est induite par le cuivre*

Une analyse transcriptomique par microarrays, réalisée sur des cultures de *C. metallidurans* CH34 en présence de 0,1 mM de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, après 30 minutes d'incubation, a permis d'évaluer et de comparer l'expression des différents gènes *cop* situés sur le plasmide pMOL30 et sur le mégaplasme (Tab. 7). L'induction maximale est observée pour le gène *copC* du plasmide pMOL30 (taux d'expression : 21,6 – encadré en jaune) et la plus faible induction pour *copH* (taux d'expression : 2,2 – encadré en rouge).

Il est à noter que l'ensemble des gènes *copRScopABCD* portés par le mégaplasme est également induit, mais de façon généralement plus faible que celui porté par le plasmide pMOL30. Par exemple, à la suite du stress cuivre décrit précédemment, le gène *copC* du plasmide pMOL30 est transcrit avec un taux de 21,6 alors que celui porté par le mégaplasme l'est avec un taux 10 fois plus faible (2,6) (encadrés en jaune). Autre exemple, le gène *copB* du plasmide pMOL30 est transcrit à un taux de 20,1, largement supérieur à celui correspondant à la transcription de *copB* porté par le mégaplasme (encadrés en rose). Seul le gène *copD* porté par le mégaplasme est induit à un taux comparable (13,7) à celui porté par pMOL30 (14,1) (encadrés en bleu).

Rank	Gene	Location	Fold ind.	SD	P value
1	<i>copC</i>	pMOL30	21.6	0.10	$3.99 \times 10^{-5}$
2	<i>copB</i>	pMOL30	20.1	0.06	$3.20 \times 10^{-4}$
3	<i>copQ</i>	pMOL30	18.1	0.15	$1.17 \times 10^{-4}$
4	<i>copK</i>	pMOL30	15.0	0.51	$2.94 \times 10^{-3}$
6	<i>copD</i>	pMOL30	14.1	0.35	$1.24 \times 10^{-3}$
7	<i>copD</i>	MPL	13.7	0.22	$2.26 \times 10^{-2}$
8	<i>copR</i>	pMOL30	13.3	0.36	$1.38 \times 10^{-3}$
10	<i>copA</i>	pMOL30	11.8	0.41	$8.08 \times 10^{-3}$
11	<i>copS</i>	pMOL30	8.8	0.24	$8.69 \times 10^{-4}$
30	<i>copN</i>	pMOL30	5.1	0.42	$7.64 \times 10^{-3}$
34	<i>copM</i>	pMOL30	4.9	0.27	$2.75 \times 10^{-3}$
39	<i>copF</i>	pMOL30	4.6	0.25	$2.70 \times 10^{-3}$
40	<i>copT</i>	pMOL30	4.5	0.02	$1.04 \times 10^{-2}$
41	<i>copI</i>	pMOL30	4.4	0.62	$2.49 \times 10^{-2}$
46	<i>copJ</i>	pMOL30	4.1	0.23	$2.81 \times 10^{-3}$
48	<i>copA</i>	MPL	3.9	0.50	$1.89 \times 10^{-2}$
49	<i>copG</i>	pMOL30	3.8	0.07	$2.93 \times 10^{-4}$
62	<i>copB</i>	MPL	3.4	0.11	$8.89 \times 10^{-4}$
68	<i>copR</i>	MPL	3.1	0.50	$1.03 \times 10^{-1}$
82	<i>copE</i>	pMOL30	2.8	0.51	$3.78 \times 10^{-2}$
95	<i>copC</i>	MPL	2.6	0.40	$2.74 \times 10^{-2}$
122	<i>copV</i>	pMOL30	2.4	0.16	$4.35 \times 10^{-3}$
139	<i>copL</i>	pMOL30	2.3	0.28	$1.77 \times 10^{-2}$
163	<i>copS</i>	MPL	2.2	0.06	$4.34 \times 10^{-3}$
168	<i>copH</i>	pMOL30	2.2	0.38	$3.90 \times 10^{-2}$

**Tableau 7** : Analyse transcriptomique de cultures de *C. metallidurans* 30 minutes après un stress cuivre correspondant à 0,1 mM Cu(II) (Monchy, S. *et al.* 2006)

Des analyses de la plupart des gènes *cop* ont également été effectuées, par PCR quantitative, après différents temps d'incubation de *C. metallidurans* CH34 (5, 30, et 60 minutes), en présence de plusieurs quantités de Cu(II) (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, et 0,8 mM) (Tab. 8).

Gene	Fold induction with Cu(II) at:				
	0·1 mM	0·2 mM	0·4 mM	0·6 mM	0·8 mM
<i>caiA</i>	1·36 ± 0·2	0·77 ± 0·1	1·58 ± 0·2	1·16 ± 0·4	0·94 ± 0·6
<i>copT</i>	38·6 ± 6·4	45·2 ± 11·1	9 ± 1·9	3·4 ± 0·8	1·4 ± 0·3
<i>copK</i>	158·8 ± 87·2	66·3 ± 22·9	165·1 ± 57·6	6·2 ± 3·1	2·1 ± 1·1
<i>copS</i>	54·4 ± 23·1	40·1 ± 18·4	50·4 ± 20·8	6·2 ± 3·6	1·1 ± 0·3
<i>copR</i>	51 ± 9·6	46·1 ± 15·1	54·5 ± 10·8	13·5 ± 3·1	6·2 ± 1·2
<i>copA</i>	86·1 ± 14·6	74·6 ± 10·1	94·4 ± 21·6	14·2 ± 3·4	4·6 ± 1·14
<i>copB</i>	134·5 ± 40	143·5 ± 31·7	203·3 ± 29·7	25·8 ± 8·9	6·4 ± 3
<i>copC</i>	278·9 ± 26·6	438 ± 52·4	1159 ± 677·4	31·4 ± 3·3	2·8 ± 0·6
<i>copD</i>	97·2 ± 27·7	67 ± 16·7	158·5 ± 40·2	10·5 ± 2·7	1·1 ± 0·3
<i>copI</i>	55·8 ± 11·2	16·9 ± 1·8	20·6 ± 1·8	5·5 ± 0·8	1·6 ± 0·2
<i>copJ</i>	4·6 ± 0·7	3·3 ± 0·6	7·9 ± 1·2	1·2 ± 0·2	0·33 ± 0·07
<i>copG</i>	8·4 ± 1·4	3 ± 0·7	11·3 ± 1·9	1·9 ± 0·3	0·72 ± 0·1
<i>copF</i>	10·1 ± 1·1	12·6 ± 1·3	22·6 ± 3	6·9 ± 2·4	1·6 ± 0·2
<i>copL</i>	16·8 ± 3	20·2 ± 2·9	26·1 ± 2·1	4·2 ± 1·4	0·59 ± 0·2
<i>copH</i>	15·3 ± 3·3	16·9 ± 3·4	15·5 ± 3·1	2·2 ± 0·4	0·4 ± 0·1
<i>resU</i>	1·4 ± 0·4	1·1 ± 1	2·4 ± 0·6	2·2 ± 1·1	0·22 ± 0·06
<i>copC</i> (MPL)	9·8 ± 5·4	11·2 ± 7	6·5 ± 4·7	3·8 ± 1·6	1·3 ± 0·6

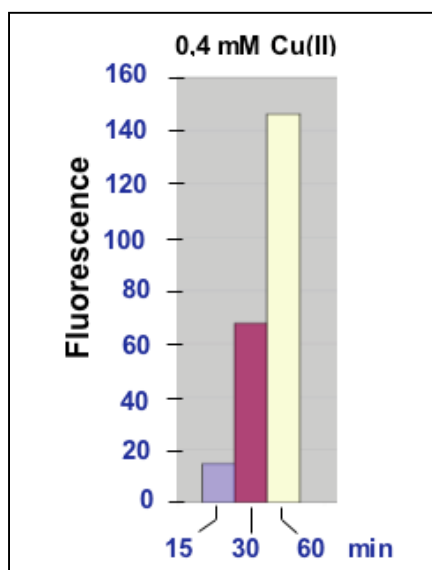
**Tableau 8** : Analyse transcriptomique des gènes *cop* de pMOL30 par PCR quantitative effectuée 30 minutes après les stress cuivre correspondant à 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, ou 0,8 mM Cu(II). Seule l'analyse transcriptomique du gène *copH* a été réalisée 1 heure après le stress cuivre (Monchy, S. *et al.* 2006).

Ces analyses ont montré que l'expression maximale des gènes *cop* était atteinte après 30 minutes, quelle que soit la concentration en cuivre. Seule l'expression du gène *copH* atteint son maximum 1 heure après l'application du stress cuivre (exemple pris pour 0,4 mM Cu(II)) (Fig. 29).

D'autre part, l'expression des gènes *cop* est maximale pour une induction par 0,4 mM Cu(II). Elle diminue ensuite pour des concentrations de cuivre plus élevées. A 0,6 mM Cu(II), la viabilité de la souche sauvage commence à diminuer (Fig. 27). Le groupe *copTKSRABCDI* est fortement induit en comparaison des gènes *copJGFL* (Fig. 28 ; Tab. 8).

Tous ces résultats laissent penser que les 19 gènes *cop* sont donc induits par le cuivre et participent au mécanisme de résistance au métal, avec une expression particulièrement haute pour les gènes *copABCD* et *copK*. Le gène *copC* du mégaplasme est également induit, mais à un taux bien supérieur à celui de l'expression du gène *copC* de pMOL30 (Tab. 8). L'expression de ce dernier atteint cependant son maximum 30 minutes après le stress cuivre, contrairement à celle du gène *copC* du mégaplasme qui est maximale seulement après 1 heure. Ces observations suggèrent une faible et tardive activation des gènes *copRScopABCD* du

mégaplasmide, qui participent probablement au processus de détoxication pour des concentrations de cuivre inférieures à 100  $\mu\text{M}$  (Monchy, S. *et al.* 2006).



**Figure 29** : Taux d'expression des gènes *cop* contrôlé par fluorescence, en fonction du temps, à la suite d'un stress cuivre correspondant à 0,4 mM Cu(II). La plupart des gènes *cop* sont transcrits 30 minutes après le stress cuivre. Le gène *copH* l'est après 1 heure.

#### ◆ Conclusion

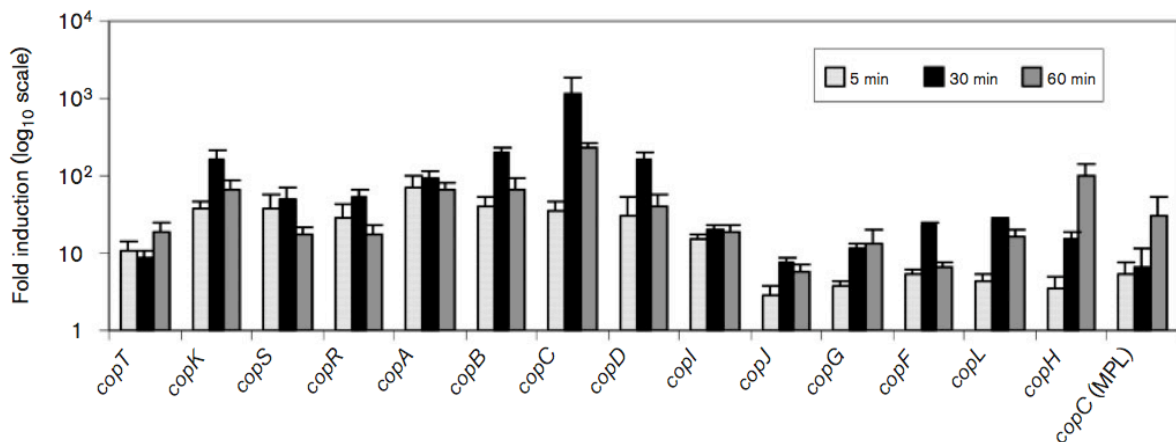
Chez *C. metallidurans* CH34, un cluster de six gènes, *copRScopABCD*, est localisé sur le mégaplasmide (2,6 Mb). Un second locus, composé des 19 gènes, *copV copT copM copK copN copRS copABCDI copFGJ copL copQ copH copE*, se situe sur le plasmide pMOL30. Il intervient dans le processus de résistance à de hautes concentrations de cuivre. Ces différents gènes peuvent être classés en trois groupes :

★ les gènes impliqués dans la détoxication périplasmique des ions cuivre : *copRScopABCD* (Rensing, C. et Grass, G. 2003 ; Cha, J. S. et Cooksey, D. A. 1991) et probablement également *copI* dont l'orthologue nommé *copC* chez *A. veronii* participe à la résistance au cuivre chez la bactérie (Francki, K. T. *et al.* 2000). Les gènes *copRScopABCD* existent en deux exemplaires car présents sur le mégaplasmide et sur le plasmide pMOL30. Cependant, les protéines codées par les gènes portés par le plasmide pMOL30 possèdent des caractéristiques bien particulières représentées par exemple par la richesse en résidus méthionine de la protéine CopB (motif MXXMXHXXM). L'existence de ce long motif suggère que les gènes plasmidiques *copRScopABCD* ne sont pas une simple copie des gènes du mégaplasmide mais pourraient avoir une fonction modifiée par rapport à celle des protéines codées par les gènes du mégaplasmide, plus précisément une fonction améliorée pour lutter contre de plus hautes concentrations de cuivre ou pour contrôler d'autres ions comme Ag(I) (Mergeay, M. *et al.* 2003).



★ les gènes probablement impliqués dans la détoxification cytoplasmique des ions cuivre : le gène *copF* codant pour l'ATPase CopF (Mergeay, M. *et al.* 2003 ; Rensing, C. *et al.* 2000) et probablement *copL* codant pour une protéine cytoplasmique. Les trois gènes *copJ*, *copG* et *copL*, situés proche de *copF* codent pour des protéines riches en résidus cystéine (motifs CXXC ou CXCC). Ces dernières pourraient constituer des partenaires de l'ATPase CopF.

★ les gènes pour lesquels aucun homologue n'existe dans les bases de données, ou pour lesquels le nombre d'homologues est très réduit. Cela concerne les gènes *copK*, *copJ*, *copG* et *copH* ainsi que les cinq petits ORFs *copV*, *copM*, *copN*, *copQ* et *copE*. Les études par transcriptomique montrent que CopK est fortement exprimée dès la présence d'une petite quantité de cuivre (0,1 mM Cu(II)). Les premières données concernant la structure de CopK ont été publiées par Tricot, C. *et al.* en 2005 et sa structure vient d'être résolue par RMN (Bersch, B. *et al.* en préparation). La protéine CopH, quant à elle, semblerait intervenir dans la phase de réponse tardive au stress cuivre, son taux d'expression maximum étant atteint au bout d'une heure (Fig. 30).



**Figure 30** : Taux d'expression de certains gènes *cop* en fonction du temps après induction avec 0,4 mM Cu(II) (Monchy, S. *et al.* 2006)

Ce cluster de 19 gènes paraît extrêmement spécialisé dans la réponse bactérienne mise en place à la suite d'un stress cuivre. Il est également unique dans le sens où il rassemble tous les gènes impliqués dans la détoxification du cytoplasme et du périplasma, ce qui laisserait penser que ces deux processus de détoxification seraient concertés.

Outre les gènes du plasmide pMOL30, le génome de *C. metallidurans* CH34 contient de nombreux gènes intervenant probablement dans le processus de réponse au stress cuivre.

Sur le mégaplasme, ont été identifiés les gènes *copRScopABCD* et *cusCBAX*; sur le chromosome, un cluster de trois gènes *cupG cupA cupR* serait impliqué dans l'expression de l'ATPase de type P, CupA (Monchy, S. *et al.* 2006).

Le cluster *cop* du plasmide pMOL30 est également unique parce qu'il rassemble de nombreux gènes et fonctions tout en régulant la réponse au stress cuivre par de légers incréments de la CMI. Ceci représente une caractéristique du processus de détoxication du cuivre, différente de celles relatives aux processus de détoxication du zinc (accroissement de la CMI d'un facteur 33), ou du cobalt (augmentation de la CMI d'un facteur 133) par exemple. Parallèlement, il est logique de penser que chaque augmentation de la CMI correspondrait à un investissement génétique particulier ou à une modulation du système d'expression. La naissance de la structure en mosaïque du cluster *cop* sur pMOL30 pourrait être le résultat de réarrangements variés, de transferts et de duplications de gènes et même de motifs au sein des protéines, comme chez CopB par exemple.

De là, de nombreuses questions restent en suspens : quelle est la raison de la présence des gènes *copRScopABCD* en double exemplaire au sein du génome de *C. metallidurans* ? Pourquoi les gènes *copRScopABCD* portés par le plasmide pMOL30 sont-ils transcrits avec un taux bien plus important que ceux du mégaplasme ? Pourquoi sont-ils suivis du gène *copI* ? Quelle est sa fonction ?

Le nombre élevé de gènes et ORFs composant le cluster *cop* laissent également prévoir un mécanisme de résistance au cuivre faisant intervenir l'ensemble des protéines et s'appuyant donc sur l'existence d'interactions spécifiques entre les différentes protéines. Ces dernières agissent probablement de concert à la mise en place du processus de détoxication du cuivre. Mais qui interagit avec qui ? Dans quel but précis ? Quelle est l'action particulière de chaque protéine ? Quelle est le résultat de son action coordonnée avec son ou ses partenaires ?

Les réponses à ses différentes questions pourront permettre de mieux comprendre ce qui rend la souche *C. metallidurans* si résistante à tout un panel de métaux lourds, et de là, de mieux comprendre les processus mis en œuvre par la bactérie pour survivre dans des environnements pollués par des métaux en grandes concentrations.

La connaissance des mécanismes de résistance aux métaux lourds et de leur régulation peut alors permettre des applications industrielles dans les domaines de l'écologie microbienne et la biotechnologie environnementale. Par exemple, en 2001, Tibazarwa, C. *et al.* ont étudié

l'utilisation de bactéries jouant le rôle de biosenseurs dans le but de contrôler la concentration de métaux lourds dans différents sols (Tibazarwa, C. *et al.* 2001). De la même façon, plusieurs études ayant pour but la phytoremédiation ou le développement de bioréacteurs permettant l'élimination des métaux lourds des sols ou des effluents pollués (Diels, L. *et al.* 1999) sont menées mais n'en sont qu'à leurs balbutiements. De la même façon, une souche recombinante de *C. metallidurans* CH34 a été utilisée avec succès pour immobiliser les métaux dans le sol, permettant ainsi la nouvelle pousse de la végétation (Valls, M. et de Lorenzo, V. 2002).

### V – Sujet de thèse

Comme nous venons de le voir, la résistance au cuivre chez les bactéries n'a fait l'objet d'aucune étude exhaustive. Nous avons d'autre part pu constater la difficulté à clarifier l'état de l'art concernant l'homéostasie du cuivre chez les bactéries, et ce pour deux raisons principales. La résistance aux métaux chez les bactéries est un domaine très vaste, encore mal connu. La littérature à ce sujet est ainsi peu fournie. Une seule revue a tenté de faire le point sur les différents systèmes connus, ou tout du moins décrits, chez les bactéries (Magnani, D. et Solioz, M. 2007). Il apparaît cependant clairement que de nombreux systèmes ou interactions sont représentés par un point d'interrogation et qu'aucune classification de ces systèmes n'existe. Par exemple, plusieurs protéines portent le même nom, chez des bactéries différentes, bien qu'elles ne possèdent pas la même fonction...

Cette étude a donc eu pour but de contribuer à l'amélioration des connaissances globales de la résistance au cuivre chez *C. metallidurans* CH34, en se focalisant sur les mécanismes d'efflux et de reconnaissance du métal. Ce projet s'est ainsi divisé en deux grandes parties.

Chronologiquement, nous nous sommes d'abord intéressés à l'étude des transporteurs HME-RND, CusA et CzcA, impliqués dans l'efflux des ions  $\text{Cu}^+$  et  $\text{Ag}^+$  pour le premier et  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , et  $\text{Cd}^{2+}$  pour le second. Cette étude s'est organisée autour du comportement des deux protéines en détergent dans un but structural et fonctionnel.

Ensuite, l'analyse et la caractérisation physicochimique de la protéine CopH ont fait l'objet d'un second projet. Comme nous venons de le voir, la découverte du cluster *cop* chez *C. metallidurans* étant récente, peu d'information concernant les dix-neuf protéines codées

existent dans la littérature. Parmi ces différentes protéines, nous avons focaliser notre attention sur l'étude de la protéine CopH.

L'étude de ces différentes protéines s'est enrichie de méthodes de caractérisation variées, disponibles à l'Institut de Biologie Structurale ou apprises au cours de stages au sein d'équipes scientifiques expertes du domaine d'intérêt, en France (équipes de James Sturgis à Marseille, et de Jean-Louis Rigaud à Paris), en Belgique (équipe de Ruddy Wattiez), et en Allemagne (équipe du professeur D. H. Nies).

Au fil de ce manuscrit, nous suivrons tout d'abord l'étude de la protéine CopH, puis celle des transporteurs membranaires CusA et CzcA.

# *Matériel et méthodes*



## Matériel et méthodes

### I – Matériel biologique et milieux de culture

#### 1.1 Souches bactériennes

**BL21(DE3)** et **BL21(DE3)pLysS** :  $F^- dcm ompT HsdS(\tau_B^- m_B^-) gal \lambda(DE3) [pLysS Cam^R]$

Ce système permet la surproduction de protéines dont les gènes sont sous le contrôle de promoteurs du phage T7 (Studier, F. W. et Moffatt, B. A. 1986). L'insert chromosomique DE3 est issu du phage T7 et code pour l'ARN polymérase T7. Il est lui-même sous le contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible par l'IPTG. Le plasmide pLysS joue quant à lui deux rôles en synthétisant une faible quantité de lysosyme : le lysosyme est un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase T7, supprimant ainsi l'expression basale des gènes cibles. Le lysosyme est également utile pour fragiliser les parois cellulaires et faciliter la lyse des cellules par une succession de chocs thermiques. Cependant, pour les cultures cellulaires en milieu minimum, une souche sans pLysS sera utilisée, en raison de la trop grande fragilité de la paroi.

**BL21C43(DE3)** : Cette souche développée par Miroux et Walker (Miroux, B. et Walker, J. E. 1996) a été obtenue par mutation spontanée de BL21(DE3) pour la surproduction de protéines membranaires. En effet, elle est capable, pendant la surproduction de protéines membranaires, de générer également des quantités importantes de membranes, qui s'accumulent au sein de son cytosol, limitant ainsi les risques de saturation et d'éclatement des membranes « naturelles » durant la surexpression.

**XL1-Blue** :

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

Les cellules XL1-Blue ne possèdent pas d'endonucléase (*endA*), ce qui améliore considérablement la qualité de la préparation d'ADN, ni de site de recombinaison (*recA*) améliorant la stabilité de l'insert. La mutation *hsdR* empêche le clivage de l'ADN cloné par le système d'endonucléase *EcoK*. Le gène *lacI<sup>q</sup>ZΔM15* sur l'épisome F' permet la sélection des bactéries par leur couleur blanche ou bleue. Elles représentent une souche de choix dans la préparation d'ADN plasmidique de haute qualité, quelle que soit sa longueur. Elle possède un

très fort taux de transformation permettant de l'utiliser pour les transformations ne nécessitant pas de souche particulière.

## 1.2 Vecteurs plasmidiques

**pET-28a** : Ce vecteur de surexpression contient en amont du multi-site de clonage, un promoteur fort T7 inductible à l'IPTG. Il possède également une origine de réplication, un site de fixation des ribosomes (rbs) ainsi que le gène *Kan* conférant la résistance à la kanamycine (Fig. 31). Ce vecteur a permis la surexpression de CopH.

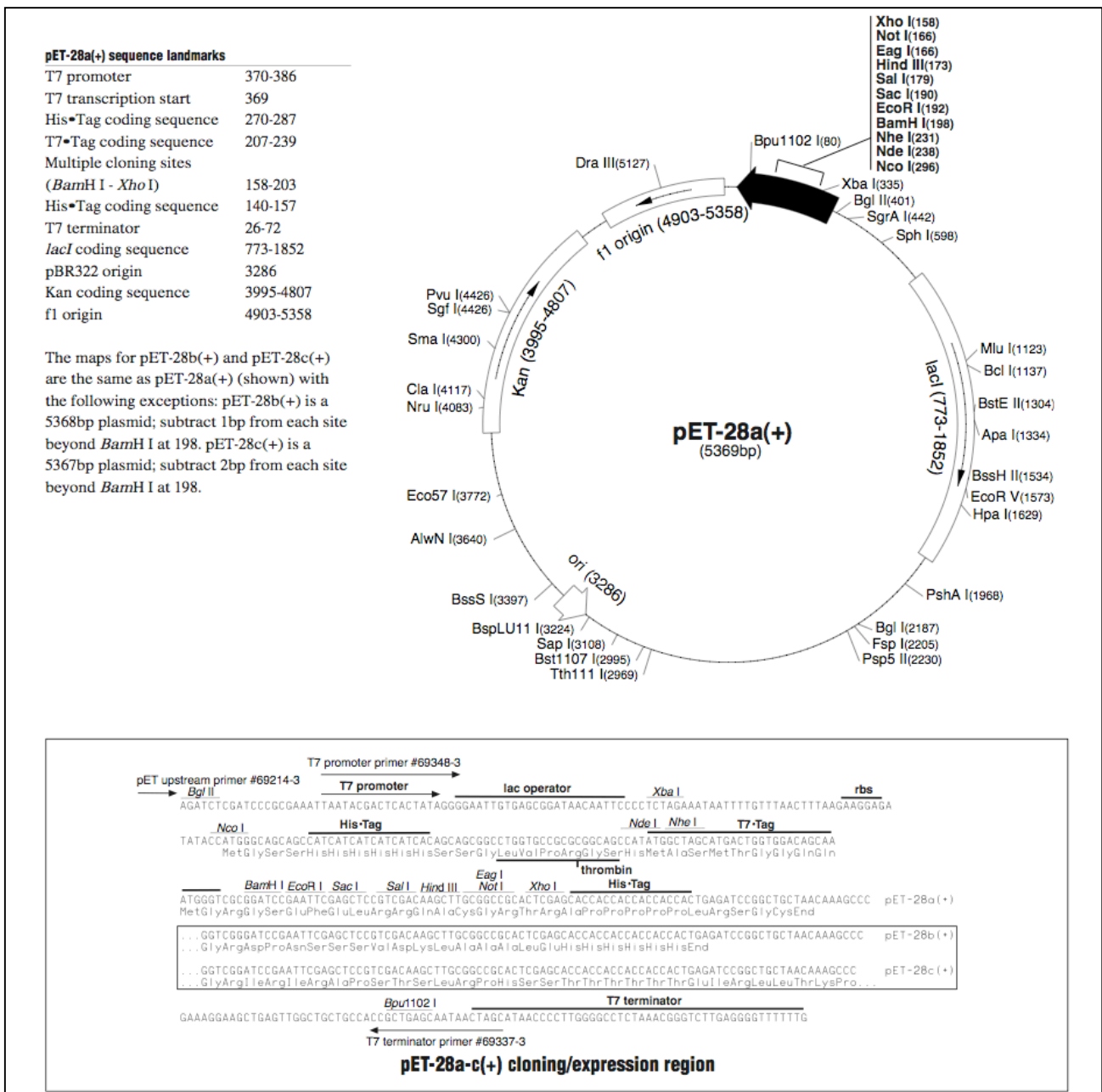


Figure 31 : Représentation du plasmide pET28 (Novagen)



**pASK-IBA3** : Ce vecteur permet la surexpression de protéines recombinantes en fusion avec un strep-tag II en C-terminal. Le Strep-tag II est un petit peptide (8 acides aminés : WSHPQFEK) possédant des propriétés de liaison sélectives pour un dérivé de la streptavidine appelé ‘Strep-Tactin’, de par sa séquence et sa structure proches de celles de la biotine (Voss, S. et Skerra, A. 1997 ; Korndörfer, I. P. et Skerra, A. 2002). Le vecteur pASK-IBA3 confère la résistance à l’ampicilline à la souche qui le porte (Fig. 32). Ce vecteur a permis la surexpression des protéines CusA et CzcA, surexpression inducible à l’anhydrotétracycline.

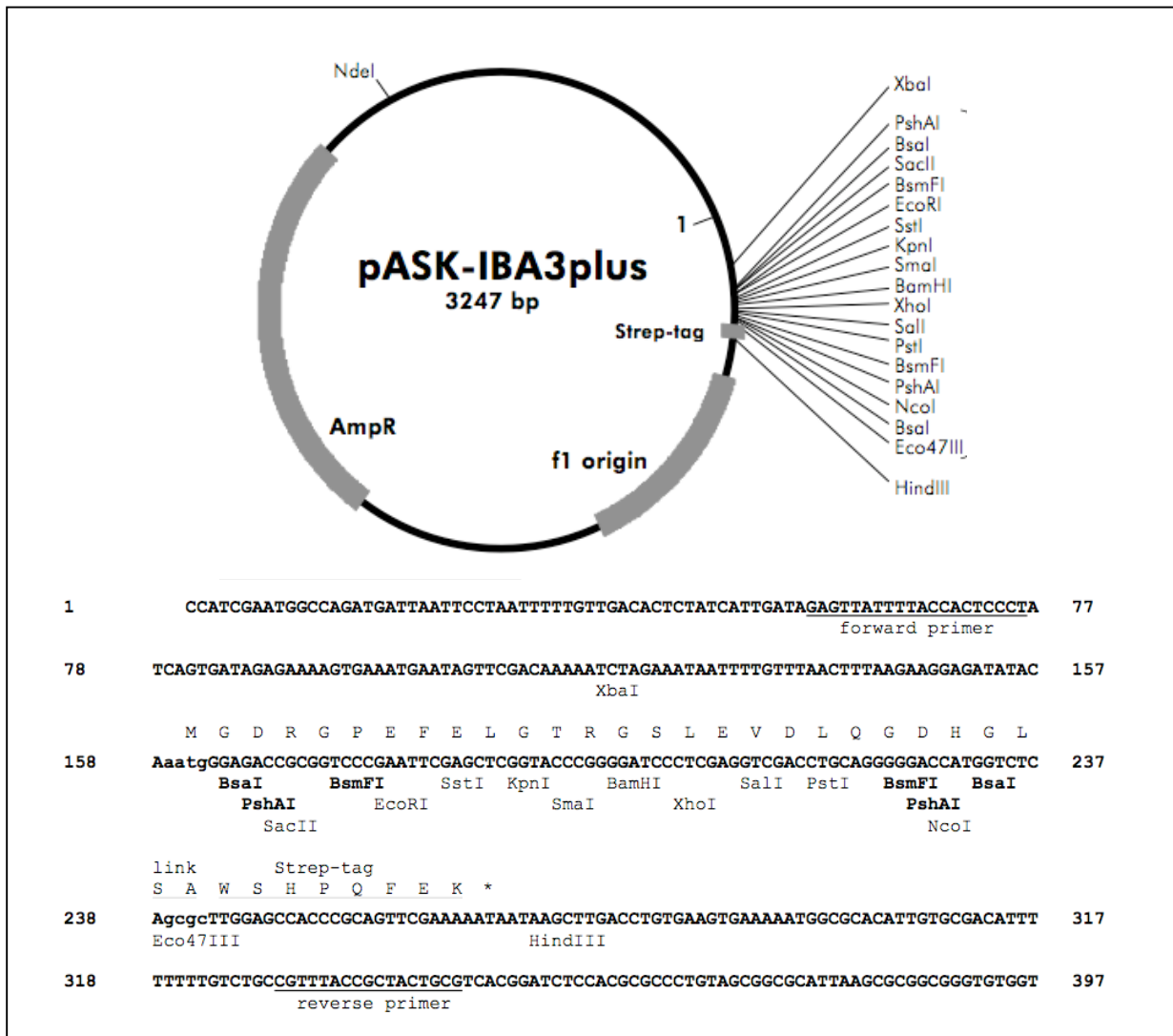


Figure 32 : Représentation du plasmide pASK-IBA3 (IBA)

### 1.3 Milieux de culture

**LB** (Luria-Bertani) (Tryptone 10 g, extrait de levure 5 g, NaCl 10 g, pour 1 L d'eau) : Ce milieu a été utilisé pour cultiver la souche BL21(DE3) d'*E. coli* afin de surexprimer la protéine CopH et ses mutants. Il est également utilisé pour les cultures en milieu solide (boîte de pétri LB-agar) (Sigma). Sa composition a été décrite par Sambrook (Sambrook, J. *et al.* 1989).

**TB** (Terrific Broth) (peptone de soja 12 g, extrait de levure 24 g, glycérol, 4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,5 g, dans 1 L d'eau) : Les cultures d'*E. coli* BL21(DE3)pLysS (production des protéines CusA et CzcA) ont été faites en milieu TB (Sigma).

**Milieu 284** : Ce milieu est le milieu minimum, choisi pour les cultures de *C. metallidurans* CH34 (production de CopH), dans le but de tester le temps de latence de l'expression ainsi que la surproduction de la protéine en fonction de la quantité de cuivre ajoutée. Les essais d'immunoprécipitation ont également été faits à partir de cultures dans ce milieu. (Tris-HCl 20 mM, NaCl 80 mM, KCl 20 mM, NH<sub>4</sub>Cl 20 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1 mM, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 1 %, Fe(III)NH<sub>4</sub>citrate 0,048%, Gluconate 0,2% + oligoéléments : en particulier ici CuCl<sub>2</sub>).

**SOB** (bactotryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, et MgCl<sub>2</sub> 1 M / MgSO<sub>4</sub> 1 M stériles additionnés au 1/100 en volume) : ce milieu est utilisé pour la préparation des XL1-Blue ultra compétentes.

## II – Biologie moléculaire

### 2.1 Transformation dans BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS et XL1-Blue

#### 2.1.1 Préparation de cellules compétentes

\* *BL21(DE3)* et *BL21(DE3)pLysS* compétentes

La technique décrite est dérivée de la méthode de traitement au CaCl<sub>2</sub> (Inoue, H. *et al.* 1990). Toutes les étapes se déroulent stérilement. Une préculture, dans 10 mL de LB, à partir d'une colonie de la souche voulue, est incubée sous agitation pendant la nuit à 37°C. Une culture d'environ 200 mL estensemencée avec 2 mL de la préculture. Les bactéries sont cultivées à 37°C, sous agitation, jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $A_{600} \approx 0,4$ ). La croissance bactérienne est alors arrêtée par un passage à 4°C durant 15

minutes. A partir de là, toutes les manipulations se font à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 15 minutes à 4500 rpm (rotor SLC-6000 - Sorvall). Le culot bactérien est repris dans 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M froid et maintenu à 4°C pendant 30 minutes. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris en douceur dans 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M avec 20% de glycérol. Les cellules sont alors aliquotées par 200 µL, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

*\* XL1-Blue compétentes*

La méthode de préparation des XL1-Blue ultra compétentes a été appliquée à partir de cellules commerciales (Stratagene) selon le protocole décrit par Inoue, Nojima et Okayama (Inoue, H. *et al.* 1990). Toutes les étapes se déroulent stérilement. Une préculture de 2 mL de SOB additionnés de 10 µL d'anhydrotétracycline 2 mg/mL à partir de XL1-Blue commerciales est incubée pendant une nuit à 37°C, puis quelques heures à 24°C. Une culture de 500 mL de SOB avec 2,5 mL de MgCl<sub>2</sub> 2 M filtré stérilement estensemencée avec 1 mL de la préculture. Les cellules sont cultivées à 20°C, sous agitation, pendant une nuit. Après 22 heures de culture, la croissance est arrêtée à A<sub>600</sub> ≈ 0,45 en plaçant l'erlenmeyer de culture dans un mélange glace + sel pendant 10 minutes. Les cellules sont centrifugées à 2500 g pendant 10 minutes à 4°C (les tubes et la centrifugeuse ayant au préalable été refroidis à cette température). Les culots sont resuspendus doucement dans du tampon TB froid (500 mL filtrés stérilement : CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM, PIPES 10 mM dans 450 mL d'eau (pH ajusté à 6,7 avec KOH 3 M), MnCl<sub>2</sub> 55 mM), et les cellules sont centrifugées à nouveau à 2500 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est encore une fois resuspendu dans 13 mL de tampon TB additionné de 1 mL de DMSO. Les cellules sont aliquotées par 200 µL, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

### **2.1.2 Transformation par de l'ADN plasmidique**

Dans un tube eppendorf stérile, 100 µL de cellules compétentes sont incubées avec 50 à 100 ng d'ADN plasmidique à 4°C pendant 30 minutes. Après un choc thermique de 2 minutes à 42°C pour les BL21(DE3) ou BL21(DE3)pLysS, ou de 90 secondes à 42°C pour les XL1-Blue, les bactéries sont remises 2 minutes à 4°C avant d'être reprises dans 1 mL de LB. Après une heure d'incubation à 37°C, sous agitation, les cellules sont centrifugées 4 minutes à 6500 rpm (centrifugeuse de paillasse). Le culot est repris dans 100 µL de LB et

étalé sur boîte de pétri contenant du milieu LB-agar additionné des antibiotiques adéquats à la sélection des transformants, puis incubé à 37°C pendant 16 à 18 heures.

## 2.2 Clonage de CopH

### 2.2.1 Amplification du gène par PCR

CopH étant une protéine de *C. metallidurans* CH34, son clonage dans le vecteur d'expression pET-28a a été fait à partir de l'ADN génomique de cette bactérie. Ce dernier a servi de matrice pour l'amplification par PCR du gène *copH*, à partir des amorces copHfor et copHrev (Tab. 9). Les proportions des différents composants du mélange réactionnel et le cycle de PCR y sont également décrits. L'amplification a été effectuée avec un appareil Mastercycler gradient (ependorf), permettant d'effectuer plusieurs réactions à différentes températures d'hybridation.

Après réaction, les produits de PCR sont purifiés au moyen des kits « Nucleospin® Extract » (Clontech Laboratories) ou « QIAquick® PCR Purification » (Qiagen). L'élution est faite avec 25 µL d'eau.

A	NcoI						
	<b>CopHfor</b>	5' AAATTTTC <u>CATGGCTGACAAACTCGAATCCACC</u> 3'					$T_m = 87^\circ\text{C}$
	<b>CopHrev</b>	5' TTAAAGG <u>TTCGAGTCAACCGCCGATGTAGAGTCTG</u> 3'					$T_m = 97^\circ\text{C}$
	XhoI						
B	ADN pur (4 µg/µL)	dNTPs (10 mM)	PCR buffer (+MgSO <sub>4</sub> )10x (Fermentas)	CopHfor 10 µM	CopHrev 10 µM	H <sub>2</sub> O	Pfu polymérase (2,5 u/µL) (Fermentas)
	0,5 µL	1 µL	5 µL	2,5 µL	2,5 µL	37,3 µL	0,7 µL
	Volume total = 50 µL						
C	1 – T = 95°C, 5 minutes						
	2 – T = 95°C, 45 secondes						
	3 – T = 50°C, 30 secondes						
	4 – T = 72°C, 2 minutes						
	5 – T = 72°C, 5 minutes						
	6 – T = 4°C						
cycle répété 30 fois							

**Tableau 9 :** (A) Amorces de PCR utilisées pour le clonage du gène *copH*. Les sites de coupure des enzymes de restriction sont soulignés (**copHfor** : NcoI ; **copHrev** : XhoI), la partie codante du gène est représentée en gras. (B) Mélange réactionnel effectué pour l'amplification du gène *copH*. (C) Conditions d'amplification par PCR du gène *copH*.

### 2.2.2 Digestion d'ADN par les enzymes de restriction

Avant d'être inséré dans le vecteur d'expression pET-28a, le produit de PCR ainsi que le plasmide pET-28a, doivent être digérés par les enzymes de restriction pour ajuster leurs extrémités complémentaires. Les sites ont été insérés sur les oligonucléotides afin d'obtenir un gène à extrémités cohésives compatibles avec ceux du vecteur. Après digestion, les inserts sont purifiés au moyen des kits « Nucleospin® Extract » (Clontech Laboratories) ou « QIAquick® PCR Purification » (Qiagen). L'éluion est faite avec 25 µL d'eau.

**copH** : Le produit de PCR est digéré par NcoI et XhoI (Tab. 10).

Insert <i>copH</i>	NcoI (BioLabs)	XhoI (BioLabs)	Tampon 2 (BioLabs)
25 µL	1 µL	1 µL	3 µL

Volume total = 30 µL. Elution dans 20 µL d'eau après purification (kits « Nucleospin® Extract » (Clontech Laboratories) ou « QIAquick® PCR Purification » (Qiagen)).

Tableau 10 : Digestion de l'insert *copH*.

**pET-28a** : Le morceau d'ADN à éliminer entre les sites de restriction NcoI et XhoI étant long (plusieurs dizaines de paires de bases), le plasmide est digéré par 4 enzymes afin de couper ce morceau en bouts plus petits, plus faciles à éliminer lors de la purification. Le risque de religation du plasmide est alors minimisé. Après purification, le vecteur est prêt à recevoir l'insert (Tab. 11).

pET-28a	NcoI (BioLabs)	NdeI (BioLabs)	BamHI (BioLabs)	XhoI (BioLabs)	Tampon 2 (BioLabs)	H <sub>2</sub> O
10 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	4 µL	22 µL

Volume total = 40 µL. Elution dans 30 µL d'eau après purification (kits « Nucleospin® Extract » (Clontech Laboratories) ou « QIAquick® PCR Purification » (Qiagen)).

Tableau 11 : Digestion du plasmide pET-28a.

La présence et l'état de l'insert et du vecteur sont vérifiés à chaque étape par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

### 2.2.3 Ligation et transformation

Le vecteur et l'insert sont mélangés suivant un rapport molaire 1 : 3 (respectivement dans notre cas 2 µL de pET-28a digéré et 6 µL d'insert digéré) avec 4 µL de tampon 2

(concentré 5x), 10 µL de tampon 1 (concentré 2x) et 1 µL de ligase (kit « Rapid DNA Ligation » (Fermentas)). Le mélange réactionnel est laissé 40 minutes à température ambiante. La transformation est effectuée avec 5 µL de produit de ligation pour 100 µL de bactéries XL1-Blues super compétentes et les cellules sont étalées sur boîte LB-agar-kanamycine (50 µg/mL de kanamycine).

Certaines souches obtenues après une nuit à 37°C sont utilisées pour une PCR sur colonies afin de vérifier la présence de l'insert au sein du plasmide. Elles ont permis d'ensemencer plusieurs petites cultures de LB (5 mL). Après incubation une nuit à 37°C, sous agitation, l'ADN est extrait avec le kit « Nucleospin® Plasmid » (Clontech Laboratories) ou le kit « QIAprep® Spin Miniprep » (Qiagen). L'insertion du gène *copH* est vérifiée à nouveau par PCR et son intégrité est vérifiée par séquençage (Génome Express - Meylan, France). Lorsque le résultat du séquençage est positif, le plasmide issu du clonage est préparé en plus grande quantité (1 mL) avec le kit « HiSpeed® Plasmid Midi » (Qiagen) à partir de culture de 250 mL.

Le vecteur pET-28a contient alors le gène *copH* : pET-28a:copH

## **2.3 Mutagenèse dirigée : obtention des mutants His26Ala, His24Ala et His24-26Ala puis Gln19Ser et Gln23Ser**

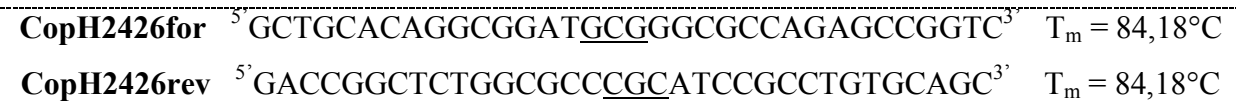
### **2.3.1 Conception des oligonucléotides**

Le remplacement de l'histidine en position 24 par une alanine nécessite une région de mésappariement de trois paires de bases. La conception des oligonucléotides doit prendre en compte différentes règles essentielles à la réussite de la mutagenèse. Les oligonucléotides doivent être longs d'au moins 12 à 15 bases avant et après la zone de mésappariement, leur température de fusion doit être supérieure à 78°C et ils doivent contenir un minimum de 40 % de bases G et C (Fig. 33).

<b>CopH24for</b>	5' CAAGTGGCTGCACAG <u>GCG</u> GATCATGGCGCCAGAG3'	T <sub>m</sub> = 79,25°C
<b>CopH24rev</b>	5' CTCTGGCGCCATGAT <u>CGC</u> CCTGTGCAGCCACTTG3'	T <sub>m</sub> = 79,25°C
<b>CopH26for</b>	5' GCTGCACAGCATGAT <u>GCG</u> GGCGCCAGAGCCGGTC3'	T <sub>m</sub> = 81,76°C
<b>CopH26rev</b>	5' GACCGGCTCTGGCGCC <u>GCA</u> TGCTGTGCAGC3'	T <sub>m</sub> = 81,76°C

**Figure 33** : Amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse du gène *copH* (production des simples mutants His24Ala et His26Ala). La zone de mésappariement correspondant au remplacement du codon CAT (His) par GCG (Ala) est soulignée.

Pour obtenir l'oligonucléotide correspondant au double mutant His24-26Ala, la mutation de l'histidine 26 est introduite à partir du mutant His24Ala (Fig. 34).



**Figure 34:** Amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse du gène *copH* (production du double mutant His24-26Ala). La zone de mésappariement correspondant au remplacement du codon CAT (His) par GCG (Ala) est soulignée.

Deux autres mutants, prévoyant le remplacement des glutamines en position 19 et 23 par des sérines, ont été conçus. Les mêmes principes énoncés plus haut ont été respectés pour la conception des oligonucléotides (Fig. 35).



**Figure 35 :** Amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse du gène *copH* (production des simples mutants Gln19Ser et Gln23Ser). Les zones de mésappariement, correspondant au remplacement du codon CCA (Gln) par TCA (Ser) pour Gln19Ser et du codon CAG (Gln) par TCG (Ser) pour Gln23Ser, sont soulignées.

### 2.3.2 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été conduite en utilisant le kit « QuickChange® Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene) (Tab. 12). Après amplification du plasmide selon le cycle de PCR présenté dans le tableau 1, le produit de PCR est laissé 2 minutes dans la glace, additionné de 0,5 µL de DpnI puis incubé 1 heure à 37°C. Ensuite, la transformation est opérée avec 50 µL de bactéries XL1-Blue ultra compétentes et 5 µL du produit de digestion et les cellules sont étalées sur boîte LB-agar-kanamycine (50 µg/mL de kanamycine).

Composition du mélange réactionnel de formation des mutants de la protéine CopH par PCR		Cycle de PCR
Tampon de réaction 10x	2,5 µL	1 – T = 95°C, 30 secondes 2 – T = 95°C, 30 secondes 3 – T = 55°C, 1 minute 4 – T = 68°C, 6 minutes 5 – T = 68°C, 10 minutes 6 – T = 4°C cycle répété 16 fois
Plasmide CopH	8 ng	
Oligonucléotide for	125 ng	
Oligonucléotide rev	125 ng	
dNTP Mix	0,5 µL	
H <sub>2</sub> O	volume adéquat	
Pfu Turbo polymérase	0,5 µL	
Volume total = 25 µL		

**Tableau 12** : Mutagenèse dirigée : mélange réactionnel de PCR et cycle de PCR.

Certaines colonies obtenues après une nuit à 37°C sont utilisées pour ensemercer plusieurs petites cultures de LB (5 mL). Après incubation une nuit à 37°C, sous agitation, l'ADN est extrait suivant le kit « Nucleospin® Plasmid » (Clontech Laboratories) ou le kit « QIAprep® Spin Miniprep » (Qiagen). L'intégrité des différentes mutations du gène *copH* est vérifiée par séquençage (Génome Express - Meylan, France). Lorsque le résultat du séquençage est positif, le plasmide issu de la mutagenèse est préparé en plus grande quantité (1 mL) avec le kit « HiSpeed® Plasmid Midi » (Qiagen).

### III – Expression des protéines d'intérêt dans *E. coli* et purification

Toutes les cultures ont été effectuées à 37°C ou 20°C, sous agitation (environ 220 rpm).

#### 3.1 CusA et CzCA

##### 3.1.1 Surexpression induite par l'anhydrotétracycline (AHT)

Une colonie isolée de *E. coli* BL21(DE3)pLysS sur boîte de pétri (souche contenant le vecteur pASKIBA3:cusA) est mise en culture dans 20 mL de milieu TB additionné de



34 µg/mL de chloramphénicol et 100 µg/mL d'ampicilline. Cette préculture laissée à 37°C pendant une nuit sert d'inoculum à une culture de 1 L. La croissance est suivie par mesure de la turbidité à l'aide d'un spectrophotomètre (absorbance à 600 nm) et la production de protéine est induite à  $A_{600} \approx 0,8-0,9$  avec 200 µg d'anhydrotétracycline. Après 4 heures, les cellules sont centrifugées à 4000 rpm (rotor SLC-6000 – Sorvall) pendant 20 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 30 mL de tampon TBS (Tris Buffer Salt) et les bactéries sont centrifugées à nouveau à 4500 rpm (rotor S4180 – Beckman) pendant 20 minutes. Le culot est congelé à -80°C.

### 3.1.2 Préparation des extraits membranaires

Chaque culot issu d'une culture de 1 L est décongelé et resuspendu dans 30 à 40 mL de tampon A (Tris-HCl 100 mM pH = 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 2 mg d'ADNase, anti-protéases (Complete, Roche, 1 tablette/50 mL)). Après avoir subi un cycle de trois à quatre congélations/décongelations, les cellules sont cassées par sonication et centrifugées à 4500 rpm (rotor S4180 – Beckman) pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est à nouveau centrifugé à 35000 rpm (rotor TI45 - Beckman) pendant une heure à 4°C. Le culot est resuspendu dans environ 5 mL de tampon B (Tris-HCl 100 mM pH = 8, NaCl 500 mM) et centrifugé à 35000 rpm (rotor TI70 - Beckman) à 4°C pendant une heure. Le culot, correspondant à l'extrait membranaire de protéine, est resuspendu dans 10 mL de Tris-HCl 100 mM pH = 8.

### 3.1.3 Purification en détergent

**Solubilisation des membranes** - L'extrait membranaire est décongelé, laissé sous agitation lente en présence de DDM 1 % (soit 100 fois la cmc) et NaCl 500 mM pendant 30 minutes à 4°C et centrifugé à 40000 rpm (rotor TI70 - Beckman) à 4°C pendant 30 minutes.

**Purification sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> (IBA)** (à 4°C) – La protéine possédant un strep-tag II, elle est purifiée sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> (IBA) (streptavidine immobilisée – 5 mg/mL de résine). La colonne (2 mL de résine) est équilibrée dans 10 mL de tampon 1 (Tris-HCl 100 mM pH = 8, NaCl 500 mM, DDM 0,2%). Le surnageant après centrifugation (environ 10 mL) est alors placée sous agitation lente en suspension avec la résine (agitation lente pendant 30 minutes) et la partie non retenue (flow-through) est récupérée par gravité. La résine est lavée par 20 ml de tampon 2 (Tris-HCl 100 mM pH = 8, NaCl 100 mM, DDM 0,2%) puis 10 mL de tampon 3 (Tris-HCl 100 mM pH = 8,

NaCl 100 mM, DDM 0.05 %) et la protéine est éluée avec la desthioiotine (20 mL de tampon 3 contenant 2,5 mM de desthioiotine). Vingt fractions de 1 mL sont récupérées et leur valeur d'absorbance à 280 nm est mesurée au spectrophotomètre. Les fractions de  $A_{280}$  supérieure à 0,15 sont rassemblées et concentrées sur membrane Amicon® Ultra 100,000 MWCO (Millipore) jusqu'à un volume voisin de 250  $\mu$ L. Le rendement est d'environ 800  $\mu$ g de protéine par litre de culture.

**Filtration sur gel** – Les 250  $\mu$ L sont chargés sur colonne Superdex™ 200 XK16/100 (25 mL) (GE Healthcare) préalablement équilibrée en tampon 3. La filtration est effectuée avec un débit de 0.5 mL/min, à 4°C, et la protéine est récupérée par fractions de 0,5 mL. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées et concentrées sur Amicon® Ultra 100,000 MWCO (Millipore).

La purification de CusA a également été effectuée en Fos-choline 14 (FC14) et en utilisant un mélange de DDM et SDS. Dans ce dernier cas, il suffit de rajouter 0,02% SDS dans les tampons 1, 2 et 3. Le rendement est alors d'environ 800  $\mu$ g de protéine par litre de culture. La solubilisation des membranes en FC 14 nécessite une concentration de 0,05% (soit 10 fois la cmc), sous agitation lente pendant une heure à 4°C. Lors de la purification, le tampon 1 d'équilibration et le tampon 2 de lavage contiennent 0,05 % de FC14. Le tampon 3 en contient 0,025 %.

## 3.2 CopH et ses mutants

### 3.2.1 Surexpression induite par l'IPTG

Une colonie isolée de *E. coli* BL21(DE3) sur boîte de pétri est mise en culture dans 50 mL de milieu LB additionné de 50  $\mu$ g/mL de kanamycine. Cette préculture est laissée à 37°C pendant une nuit et permet d'ensemencer une culture de un litre. La croissance est suivie par absorbance à 600 nm et la surexpression de protéine est induite à  $A_{600} \approx 0,9$  avec 250  $\mu$ M d'IPTG. La culture est alors refroidie à 20°C et laissée à cette température et sous agitation pendant la nuit. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4000 rpm (rotor SLC-6000 – Sorvall) pendant 20 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 30 mL du tampon Tris-HCl 10 mM pH = 7 et les bactéries sont centrifugées à nouveau à 4500 rpm (rotor S4180 – Beckman) pendant 20 minutes. Le culot est congelé à -80°C.

### 3.2.2 Purification

**Précipitation au sulfate d'ammonium** – Toutes les étapes suivantes sont effectuées à 4°C. Le culot issu de la culture de BL21(DE3) est décongelé et resuspendu dans le tampon 1 (Tris-HCl 100 mM pH = 7, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 2 mg d'ADNase I, anti-protéases (Complete, Roche, 1 tablette/50 mL)). Les cellules sont lysées par sonication (20 cycles de 30 secondes de pulses à 40 % d'intensité et 30 secondes de repos dans la glace) et centrifugées 1h30 à 40000 rpm (rotor TI 70 – Beckman). Le volume de surnageant est mesuré et additionné de sulfate de streptomycine (3 % final) sous agitation pendant une heure afin de précipiter les acides nucléiques résiduels. Après centrifugation 20 minutes à 10000 rpm (rotor F0850 – Beckman), le volume de surnageant est à nouveau mesuré et additionné de sulfate d'ammonium (saturation finale de 50 %) par pincées et laissé sous agitation à 4°C pendant une heure. Une dernière centrifugation à 10000 rpm (rotor F0850 – Beckman) pendant 40 minutes permet d'obtenir un culot blanc de protéines précipitées au sulfate d'ammonium.

**Filtration sur gel** – Le culot obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium est resuspendu dans un volume minimal de tampon de travail (Hepes 50 mM pH = 7,5 ou Tris-HCl 50 mM pH = 7,5) ( $pI_{\text{COPH}} = 4,83$ ), servant également à équilibrer la colonne Superdex™ 75 XK26/60 (120 mL) (GE Healthcare). La protéine est chargée par injection de 2 mL. L'élution est menée à un débit de 0,8 mL/min et des fractions de 1 mL sont collectées. La composition des fractions est vérifiée par spectrophotométrie (absorbance à 280 nm) et par électrophorèse (analyse SDS-PAGE). Les fractions contenant la protéine CopH sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur cellule DIAFLO® (Amicon®) équipée d'une membrane d'ultrafiltration en cellulose (NMWL 3,000 - Millipore). La solution protéique est alors aliquotée par 200 µL et congelée à -80°C.

La purification des mutants His26Ala, His24Ala et His24-26Ala, puis Gln19Ser et Gln23Ser, se déroule de la même façon que celle de la protéine CopH.

## IV – Biochimie

### 4.1 Solubilisation ménagée de CusA et CzcA dans différents détergents

La détermination du détergent permettant la solubilisation d'une protéine membranaire est cruciale dans la purification ainsi que dans le travail de caractérisation fonctionnelle et structurale de la protéine. Cette étape nécessite de tester un grand nombre de détergents, à diverses concentrations.

Les essais ont été faits en utilisant un extrait membranaire concentré à 0,7 mg/mL dans 200  $\mu$ L. Dans 6 tubes eppendorf, sont mélangés 100  $\mu$ L d'extrait membranaire concentré à 1,4 mg/mL et 100  $\mu$ L de détergent à une concentration connue en Tris-HCl 100 mM pH = 8 (Tab. 13 et 14). Le contenu des eppendorfs est laissé une heure à 4°C et placé dans de petits tubes (Polyallomer Centrifuge Tubes – Beckman) avant d'être centrifugé 15 minutes à 20 psi (environ 20000 g) sur une centrifugeuse à air comprimé (Airfuge<sup>TM</sup> – Beckman). Les surnageants sont récupérés et les culots sont repris dans 50  $\mu$ L de Tris-HCl 100 mM pH = 8 pour être analysés par électrophorèse SDS-PAGE.

Les détergents testés pour la solubilisation de CusA sont : DDM,  $\beta$ -OG, fos-choline 12 (FC12), fos-choline 14 (FC14), et fos-choline 16 (FC16).

Les détergents testés pour la solubilisation de CzcA sont : C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, fos-choline 12 (FC12), fos-choline 14 (FC14), et fos-choline 16 (FC16).

<b>DDM</b> (cmc = 0,01 %)	Rapport massique $m_{\text{prot}}/m_{\text{dét}}$	$\infty$	2,8	1,4	0,9	0,5	0,28
	Concentration (%)	0	0,025	0,05	0,078	0,14	0,25
<b><math>\beta</math>-OG</b> (cmc = 0,6 %)	Rapport massique $m_{\text{prot}}/m_{\text{dét}}$	$\infty$	0,048	0,019	0,012	0,0068	0,0048
	Concentration (%)	0	1,46	3,65	5,85	10,2	14,6
<b>FC 12</b> (cmc = 0,05 %)	Rapport massique $m_{\text{prot}}/m_{\text{dét}}$	5	0,5	0,13	0,09	0,05	
	Concentration (%)	0,014	0,14	0,53	0,77	1,4	
<b>FC 14</b> (cmc = 0,0045 %)	Rapport massique $m_{\text{prot}}/m_{\text{dét}}$	$\infty$	5	1,54	0,9	0,5	0,28
	Concentration (%)	0	0,014	0,045	0,078	0,14	0,25
<b>FC 16</b> (cmc = 0,00053 %)	Rapport massique $m_{\text{prot}}/m_{\text{dét}}$	$\infty$	50	13,23	9	5	2,8
	Concentration (%)	0	0,0014	0,0053	0,0078	0,014	0,025

Tableau 13 : Tests de solubilisation ménagée de CusA.

C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> (cmc = 0,048 %)	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	∞	5	1,4	0,9	0,5	0,28
	Concentration (%)	0	0,014	0,048	0,078	0,14	0,25
FC 12 (cmc = 0,05 %)	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	∞	5	1,67	0,9	0,5	0,28
	Concentration (%)	0	0,014	0,068	0,78	0,14	0,25
FC 14 (cmc = 0,0045 %)	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	∞	5	1,54	0,9	0,5	0,28
	Concentration (%)	0	0,014	0,045	0,078	0,14	0,25
FC 16 (cmc = 0,00053 %)	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	∞	50	13,23	9	5	2,8
	Concentration (%)	0	0,0014	0,0053	0,0078	0,014	0,025

Tableau 14 : Tests de solubilisation ménagée de CzcA.

## 4.2 Les gradients de sucrose

La méthode communément employée pour séparer plusieurs populations de molécules biologiques est la centrifugation sur gradient de densité. Dans notre cas, un gradient de sucrose a été utilisé afin d'évaluer le nombre de populations, l'état oligomérique et l'état d'agrégation de la protéine CusA en sortie de colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup>.

Le type de gradient utilisé est constitué de sucrose 0,5 M, Tris-HCl 100 mM pH = 8, NaCl 100 mM et détergent, dans un volume de 10 mL. La nature et la concentration de détergent dépend du choix fait lors de la purification et correspond à : DDM 0.05 %, ou DDM 0,05 % et SDS 0,02 %, ou fos-choline 14 0,025 %. Le mélange est bien homogénéisé, placé dans un tube de 10 mL (Ultra-Clear<sup>TM</sup> Centrifuge Tubes - Beckman) et congelé à – 80°C. Le gradient de densité en sucrose est créé par lente décongélation à 4°C, les plus grandes concentrations en sucrose se situant au fond du tube. Lorsque le gradient est complètement décongelé, une petite quantité de protéine (500 µg dans un volume de 500 µL) est chargée lentement, à la pipette, sur le dessus. Le tube est alors disposé dans un rotor SW41 (Beckman) et centrifugé 16 heures à 40000 rpm à 4°C. Les molécules de protéine traversent le gradient jusqu'à atteindre un point où la densité du gradient de sucrose correspond à leur propre densité. Après centrifugation, des fractions de 700 µL sont récupérées, une à une, en pipetant lentement le dessus du gradient. Les fractions sont analysées par spectrophotométrie d'absorbance UV-visible et par électrophorèse SDS-PAGE.

Le haut du gradient correspond à une densité proche de 1 et le bas à une densité d'environ 1,3. Au cours de la centrifugation, la migration de l'échantillon protéique n'atteint l'équilibre

(la densité d'une protéine étant voisine de 1,3) mais en fonction de son facteur de sédimentation  $s$ , lui-même fonction de la masse de la protéine et de la densité  $\rho_s$  du milieu.

$s = M_{\text{protéine}}(1 - \rho_s \bar{V}_{\text{protéine}}) / (6\pi\eta R_h)$  où  $\eta$  représente la viscosité du milieu et  $R_h$  le rayon hydrodynamique de la protéine (avec  $R_h^3 = 3/4\pi \bar{V}_{\text{protéine}} M_{\text{protéine}}$ ).

### 4.3 Les dosages

#### 4.3.1 Dosage du DDM

La méthode de dosage du DDM utilisée s'inspire de la méthode classique de dosage des sucres décrite par Saha et Brewer (Saha, S. K. et Brewer, C. F. 1994). Le DDM, dans son tampon, et en présence de phénol, réagit avec l'acide sulfurique. L'absorbance lue à 490 nm correspond à la concentration de DDM présente au départ dans le tube. Cette méthode est rapide et ne nécessite qu'un spectrophotomètre. Cependant, sa précision est assez faible en particulier à cause de la difficulté que représente l'étalonnage.

#### 4.3.2 Dosage protéique par la technique Bradford

Cette technique est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250 sur les protéines, en milieu acide. Cette complexation provoque un déplacement du pic d'absorbance du colorant du rouge (465 nm) au bleu (595 nm, longueur d'onde à laquelle est lue l'absorbance) (Bradford, M. M. *et al.* 1976). C'est une méthode très sensible (2 à 5  $\mu\text{g}$  de protéine), rapide et assez résistante à la plupart des interférents nuisant à la majorité des autres méthodes. Elle est cependant faussée par la présence de certains détergents comme le Triton X-100. Son principal défaut est sa réactivité relativement différente suivant la protéine étudiée, d'où un étalonnage pas toujours fiable.

### 4.3.3 Dosage protéique au BCA

En solution alcaline, les protéines réduisent les ions Cu(II) en Cu(I). Ces derniers forment ensuite avec l'acide bicinchoninique (BCA) un complexe pourpre qui absorbe à 562 nm, façon très similaire à la réaction du biuret ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$  réagissant avec deux liaisons peptidiques consécutives en présence de cuivre en milieu alcalin), développée par Gornall *et al.* (Gornall, A. G. *et al.* 1949). C'est une méthode sensible et rapide qui résiste aux détergents comme le Triton ou le SDS.

## 4.4 Immunoprécipitation

### 4.4.1 Principe

L'immunoprécipitation consiste à précipiter une protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps spécifique. Elle permet de révéler des partenaires protéiques de la protéine étudiée grâce à l'existence d'un réseau protéique entre l'anticorps, la protéine et ses partenaires. Différentes méthodes existent. L'anticorps spécifique de la protéine étudiée interagit avec un support et se lie aux protéines à précipiter (protéine d'intérêt et son(ses) partenaire(s)) qui sont ensuite éluées avec lui. L'anticorps peut également être lié de façon covalente au support : l'éluion permet alors de libérer la protéine et son(ses) partenaire(s) seuls.

### 4.4.2 Protocole expérimental

L'anticorps anti-CopH a été produit par un lapin. Le sérum fourni est purifié au préalable par précipitation au sulfate d'ammonium (Walker, J. M. 1996) et dialysé contre du tampon PBS.

Les essais d'immunoprécipitation ont été menés dans le laboratoire de protéomique et biochimie des protéines, à l'Université de Mons-Hainaut, en Belgique, où j'ai été accueillie pendant deux semaines par Ruddy Wattiez.

La première étape consiste à induire CopH en présence de cuivre (0,2, 0,4 ou 0,8 mM de  $\text{CuCl}_2$ ) en milieu minimum (milieu 284) chez *C. metallidurans* CH34 : préculture de 30 mL à 30°C sur une nuit, ensemencement dans 100 mL à  $A_{600} \approx 0,03\text{-}0,04$ , et arrêt des cultures en phase exponentielle ( $A_{600} \approx 0,5$ ) ou en phase plateau ( $A_{600} \approx 1$ ).

La protéine est alors extraite en présence ou non de Triton 0,1 % jusqu'à la dernière étape utilisant du SDS, selon le kit « Partial Bacterial Proteome Extraction » (CalbioChem). Les extraits sont dosés par la méthode Bradford et la présence de CopH dans ceux-ci est vérifiée par Western-Blot.

Les premiers tests d'immunoprécipitation ont été effectués en utilisant le kit « Seize<sup>®</sup> X Bacterial Immunoprecipitation » (Pierce). Dans ce cas, l'anticorps anti-CopH (400 µg) est lié à la protéine G de façon covalente (traitement au DSS (disuccinimidyl subérate)). Les extraits protéiques sont chargés sur le gel des petites colonnes fournies par le kit, qui est ensuite lavé à pH = 7,4. Après élution, à pH acide, les fractions obtenues sont analysées par spectrométrie de masse à partir d'un gel SDS-PAGE coloré à l'argent. Les échantillons protéiques élués ont été préalablement précipités à l'acétone (ajout de 800 µL d'acétone froide dans chaque fraction de 200 µL) puis placés à -20°C pendant une nuit ; les fractions sont ensuite centrifugées à 16000 g pendant 30 minutes à 4°C et les culots obtenus sont repris dans 20 µL de bleu dénaturant avant d'être chargés sur gel SDS-PAGE.

Une autre méthode a été testée en utilisant le kit « Pro-Found<sup>™</sup> Co-Immunoprecipitation » (Pierce). L'anticorps anti-CopH est retenu sur gel (traitement au cyanoborohydrure de sodium NaCNBH<sub>3</sub>). Les extraits protéiques sont ajoutés sur la colonne, et incubés 1 à 2 heures à 4°C. La colonne est ensuite lavée à pH 7,4, et CopH est éluee avec ses partenaires à pH acide. De la même façon, les fractions d'élution sont concentrées à l'acétone froide pendant une nuit et analysées par spectrométrie de masse à partir d'un gel SDS-PAGE coloré à l'argent.

## **V – Techniques physico-chimiques**

### **A – Techniques relatives à CopH**

#### **A.1 Spectrométrie de masse**

##### **A.1.1 Principe**

La spectrométrie de masse est une technique analytique, très sensible et destructrice, permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Elle permet également de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. La



très faible volatilité des protéines a été, pendant de nombreuses années, un obstacle à son utilisation, barrière contournée par l'introduction des sources electrospray (ESI) et MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation).

Un spectromètre de masse se compose de trois parties principales : la source, permettant de former les ions à partir de l'échantillon, l'analyseur qui filtre chacune des espèces ioniques issues de la source d'ions, en fonction de leur rapport masse/charge  $m/z$  (quadrupole, TOF, Trappe...), et le détecteur mesurant l'intensité du signal pour les différentes valeurs  $m/z$ .

Les sources de type Electrospray permettent la production d'ions en phase gazeuse à partir d'un échantillon en solution (solvant volatil). L'échantillon, préalablement passé sur colonne de chromatographie en phase inverse, est amené jusqu'à la source. L'application d'un champ électrique intense ( $10^6 \text{ V.m}^{-1}$ ) entre l'extrémité du capillaire et une contre-électrode, provoque alors, sous un flux d'azote à haute température, l'évaporation du solvant et la formation d'ions multichargés en phase vapeur (Fig. 36).

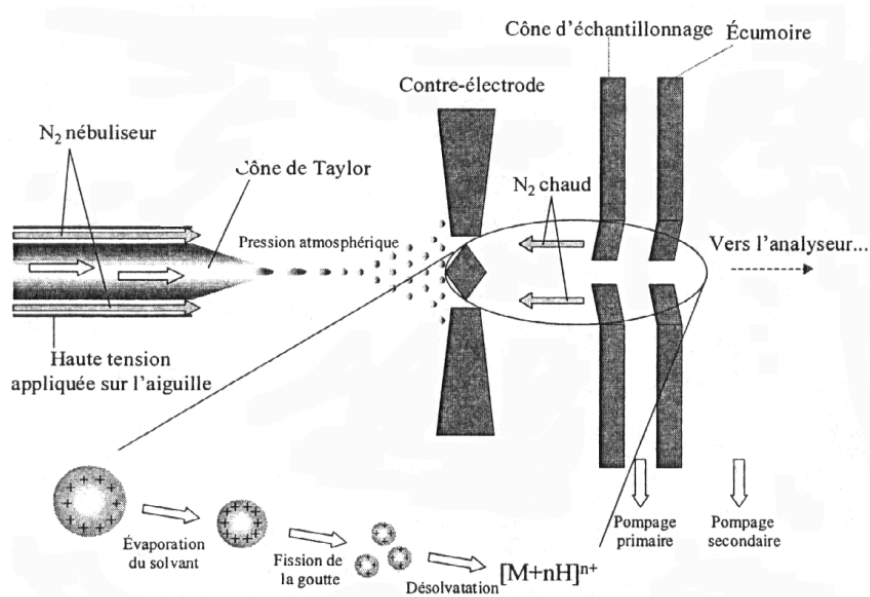


Figure 36 : Représentation du système d'ionisation electrospray

La seconde étape consiste en la séparation des ions générés, en fonction de leur rapport  $m/z$ , dans l'analyseur. Deux techniques sont communément utilisées, faisant intervenir un analyseur temps de vol (TOF : Time Of Flight), ou un analyseur quadripolaire (Q). Sur les spectromètres de dernière génération, ces deux outils sont couplés (Q-TOF). Dans le cas d'un analyseur TOF, les ions, accélérés jusque là par une différence de potentiel, sont analysés en fonction du temps qu'ils mettent pour traverser un tube libre de champ et de longueur variable, avant d'atteindre le détecteur. Le temps de vol est directement proportionnel au

rapport  $m/z$  des ions, ce qui rend cette technique très résolutive. Les analyseurs quadripolaires sont de leur côté constitués de 4 électrodes identiques, couplées deux à deux, permettant de séparer les ions en fonction de leur rapport  $m/z$  et ne laisser passer qu'un type d'ions à la fois.

Les expériences d'analyse protéique ont été effectuées sur un appareil de type ESI-Q-TOF, c'est-à-dire que l'échantillon est ionisé par une source Electrospray, puis analysé avec un spectromètre de masse hybride Q-TOF (Fig. 37).

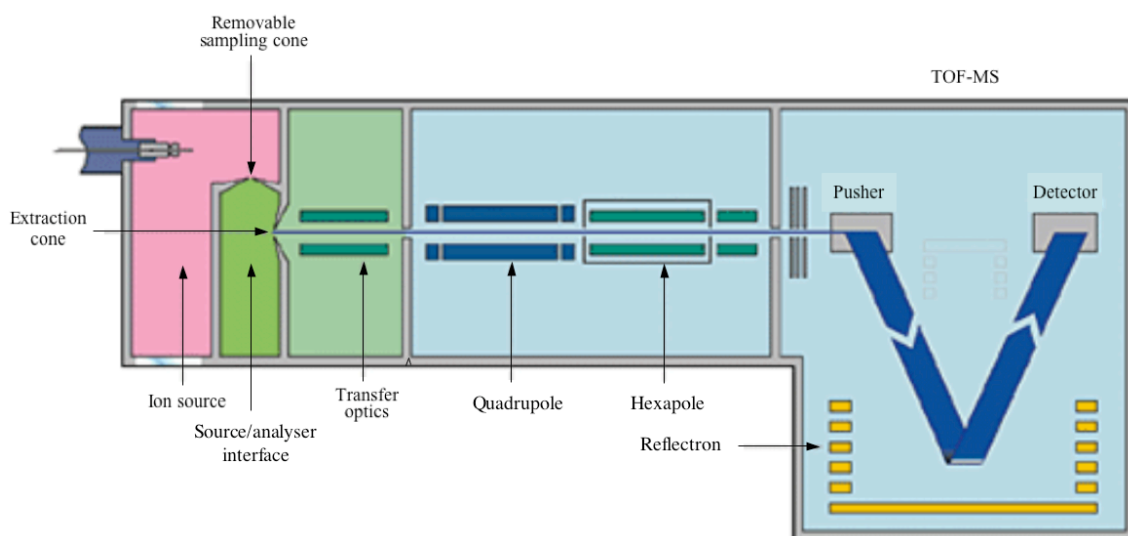


Figure 37 : Schéma du système ESI-Q-TOF

Les expériences effectuées en spectrométrie de masse non dénaturante imposent, au niveau de l'interface source/analyseur, une augmentation de la pression et un ajustement de la tension, afin de diminuer la vitesse des ions et ne pas induire de rupture complète des liaisons non covalentes au sein de la protéine.

### A.1.2 Protocole expérimental

Toutes les expériences de spectrométrie de masse ont été effectuées en collaboration avec David Lascoux du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP/IBS/Grenoble).

Les expériences en mode ESI-Q-TOF ont été faites sur un spectromètre de masse Q-TOF Micro (Micromass, Manchester, UK) équipé d'une source electrospray. Les voltages au niveau de l'électrode de nébulisation, du cône de l'échantillon, et du cône d'extraction sont respectivement de 3000 kV, 150 V et 15 V. La pression Pirani est établie à 10 mbar. Les spectres de masse ont été enregistrés dans une gamme  $m/z$  de 1500 à 3000. L'échantillon protéique est dilué à environ 10  $\mu\text{M}$  dans l'acétate d'ammonium 50 mM pH = 6,9. Les

données sont obtenues en mode positif, la calibration ayant été faite avec une solution de GFP 1  $\mu\text{M}$  dans un mélange acétonitrile/eau/acide formique (50/50/0,2). Les spectres sont traités avec le logiciel MassLynx version 4.0 (Waters). Les spectres sont donnés avec une très légère erreur inférieure à 30 ppm en calibration externe.

La compétition réalisée entre CopH et la glycine dans la liaison aux ions Cu(II) a été réalisée en ajoutant différents équivalents de glycine à une solution de CopH en présence de 2 équivalents d'ions Cu(II).

Dans le cadre de la comparaison des capacités des différents mutants à lier le cuivre, de petites colonnes Micro Bio-Spin<sup>TM</sup> (Bio-Rad), utilisées classiquement pour dessaler des solutions de protéines ou d'anticorps, ont été choisies pour éliminer le cuivre lié de façon non spécifique à la protéine. La solution de protéine (CopH ou ses mutants) (50  $\mu\text{L}$  concentrés à 0,5 mM) est chargée en présence de cuivre (2,5 équivalents) sur le gel des colonnes Micro Bio-Spin<sup>TM</sup> et centrifugée 4 minutes à 4400 rpm (centrifugeuse de paillasse). Les ions cuivre en excès ou liés de manière non spécifique à la protéine sont retenus dans le gel. La protéine est récupérée et analysée par spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes.

## A.2 Spectroscopie UV-visible

### A.2.1 Principe

Une molécule ou un atome peut passer de son état fondamental  $S_0$  à un état excité  $S_1$  après absorption d'un photon d'énergie  $h\nu$  appropriée. En solution, seules les transitions de relativement faible énergie sont observables (bandes d'absorbance dans l'ultraviolet proche et dans le visible). Par conséquent, les molécules contenant des noyaux aromatiques, des doubles liaisons conjuguées ou encore des métaux de transition présentent des spectres d'absorbance caractéristiques. Chaque bande d'absorbance est caractérisée par la longueur d'onde correspondant à son maximum,  $\lambda_{\text{max}}$ , et par son intensité. Cette dernière est définie par la valeur du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  à la longueur d'onde considérée  $\lambda$ . La concentration d'un soluté est directement proportionnelle à son absorbance en solution. Cette relation est définie par la loi de Beer-Lambert :  $A_{(\lambda)} = \epsilon_{(\lambda)} \cdot l \cdot [C]$  où  $A$  est l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire en  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $l$  la longueur du trajet optique en cm et  $C$  la concentration en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . La spectrophotométrie UV-visible peut donc permettre d'identifier

et de quantifier un cofacteur protéique donné, et permettre également de suivre des réactions enzymatiques.

Les spectres obtenus ont également été traités par SVD (Singular Value Decomposition). En algèbre linéaire, la SVD permet de connaître le nombre de composantes dites « linéairement indépendantes » et appelées « pôles ». Dans notre cas, si on acquiert une série de spectres en fonction d'un paramètre (ici la quantité de cuivre ajoutée) et si on admet que l'évolution des spectres observée dans cette série n'est due qu'à des modifications de proportions d'espèces individuelles, il est possible d'utiliser cette méthode mathématique, appelée la SVD. De façon plus générale, la SVD possède de multiples applications dans le traitement du signal et les statistiques.

### **A.2.2 Titration de CopH et ses mutants par $\text{CuCl}_2$**

Les spectres UV-visible ont été enregistrés au laboratoire, à température ambiante, avec un spectrophotomètre Cary 50 Bio (Varian), les échantillons se trouvant dans une cuve en quartz de 1 cm de côté. Les échantillons correspondent à 1 mL de solution protéique (CopH ou ses mutants) concentrée à 0.5 mM en tampon Hepes 50 mM pH = 7.5. Un premier spectre, représentant la forme apo de la protéine, a été enregistré entre 300 et 900 nm. Puis des ajouts successifs de petites quantités (1 ou 2  $\mu\text{L}$ ) de solution de  $\text{CuCl}_2$  dans l'eau (100 mM), fraîchement préparée, ont été effectués. Un spectre est enregistré après homogénéisation de la solution. Les quantités de solution de  $\text{CuCl}_2$  ajoutées ont été calculées afin de considérer la dilution négligeable. En effet, le volume total de  $\text{CuCl}_2$  ajouté est inférieur à 30  $\mu\text{L}$ .

Le traitement des spectres par SVD a été réalisé avec Anthony Getzman, sous la responsabilité de Serge Gambarelli (Laboratoire de Résonance Magnétique (DSM/DRFMC/SCIB/CEA Grenoble)). Le logiciel de programmation utilisé est Labview.

### A.3 La microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC)

#### A.3.1 Principe

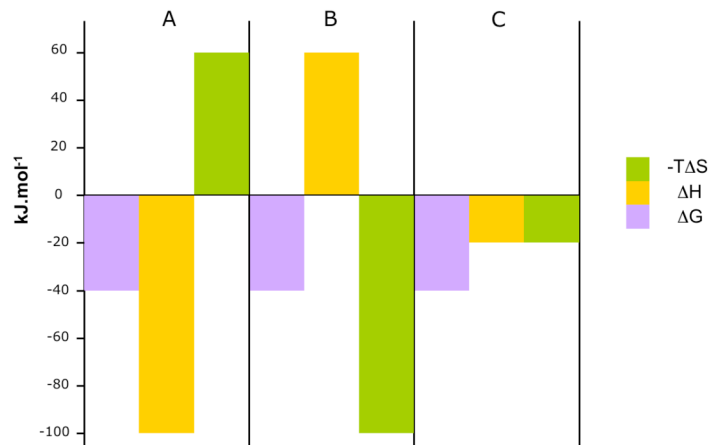
*\* Quelques rappels thermodynamiques*

L'interaction non covalente entre une macromolécule M et son ligand L, donnant lieu à la formation d'un complexe ML, peut s'écrire comme la réaction réversible suivante :



La propension que cette réaction se fasse dans le sens de formation du complexe est définie par la constante d'association ou constante d'affinité  $K_a$ , égale au rapport entre la forme complexée et les formes libres des deux espèces :  $K_a = [ML] / [M][L]$ .

Comme toute interaction moléculaire, celle-ci donne lieu à des échanges d'énergie. D'un point de vue thermodynamique, la constante d'affinité  $K_a$  est fonction de l'énergie libre de l'interaction (énergie de Gibbs  $\Delta G$ ) et s'écrit :  $K_a = e^{-\Delta G / RT}$  où T est la température (exprimée en kelvin) et  $R = 8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ . Plus cette constante est grande, plus l'affinité entre les deux molécules est forte. L'énergie  $\Delta G$  est la résultante des deux contributions énergétiques, l'enthalpie  $\Delta H$  et l'entropie  $\Delta S$  :  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . L'enthalpie reflète la force des interactions entre les deux espèces par rapport à ceux entretenus avec le solvant. Elle rend compte de l'énergie échangée par le système. Tout système ayant tendance à avoir l'énergie la plus basse possible,  $\Delta H$  tend à être négatif. L'entropie fait référence au degré de désordre du système et dépend à la fois du réaménagement du solvant s'opérant autour des molécules lors de la reconnaissance et de la diminution des degrés de liberté des espèces au moment de l'interaction. Dans le cadre des interactions moléculaires, ces deux grandeurs correspondent à des mécanismes d'interactions différents (Fig. 38).



**Figure 38** : Diagramme schématique représentant différents profils thermodynamiques d'interactions moléculaires souvent rencontrés en biologie : (A) fortes liaisons hydrogène accompagnées de changements conformationnels ; (B) liaisons dominées par des interactions hydrophobes ; (C) contributions hydrophobes et faible contribution favorable de liaisons hydrogène (Ladbury, J. E. et Doyle, M. L. 2004).

#### \* La microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC)

Parmi les différentes méthodes qui permettent d'étudier la thermodynamique de la reconnaissance entre deux espèces (protéine-métal, protéine-sucre, protéine-protéine ou autre), la microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC) est la seule permettant d'obtenir, de façon directe et quantitative, tous les paramètres caractérisant l'interaction (constante d'affinité  $K_a$ , stoechiométrie d'interaction  $n$ , contributions enthalpiques  $\Delta H$  et entropiques  $T\Delta S$ ), en une seule expérience, à une température donnée. De plus, contrairement à d'autres méthodes nécessitant l'immobilisation d'une des deux molécules, pouvant parfois gêner l'interaction et par là même l'interprétation des résultats, la microcalorimétrie laisse les molécules libres en solution. Elle permet alors d'accéder à des informations concernant la nature des forces menant à la formation d'un complexe (reconnaissance moléculaire), au maintien d'une structure tridimensionnelle (stabilité moléculaire), à la cinétique et la thermodynamique de réactions enzymatiques...

Le microcalorimètre contient deux cellules isolées de l'environnement externe par une enceinte adiabatique, maintenue à température constante pendant le temps du titrage. Une cellule de référence contient du tampon, uniquement. La même solution, contenant la protéine, est placée dans une deuxième cellule, dite de travail (Fig. 39).

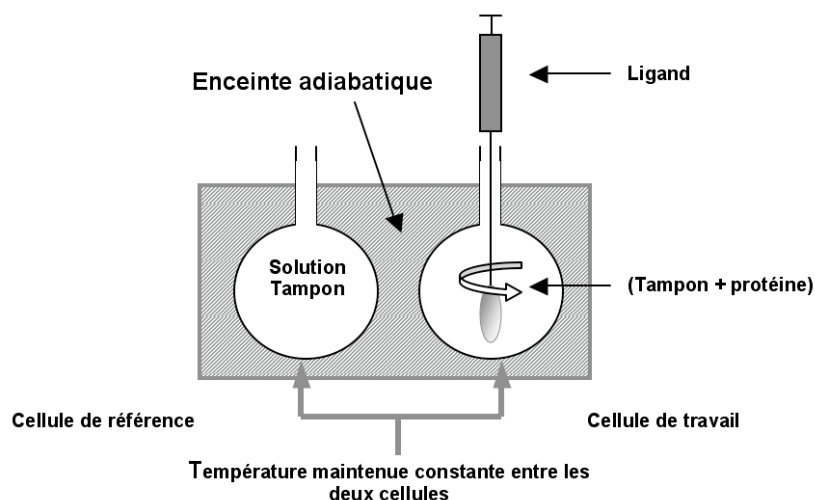


Figure 39 : Microcalorimètre ITC

De petites quantités (environ 5 à 10  $\mu\text{L}$ ) de réactif sont ajoutées à l'aide d'une seringue, à intervalle régulier. A chaque injection, l'interaction entre les deux molécules s'accompagne d'un dégagement ou d'une absorption de chaleur (réaction exothermique ou endothermique) qui entraîne une variation de la température au sein de la cellule de travail. L'appareil applique alors une puissance électrique afin de rééquilibrer la température entre les deux cellules. C'est ce signal qui est mesuré par le microcalorimètre. La puissance fournie est mesurée en fonction du temps, puis intégrée (Fig. 40).

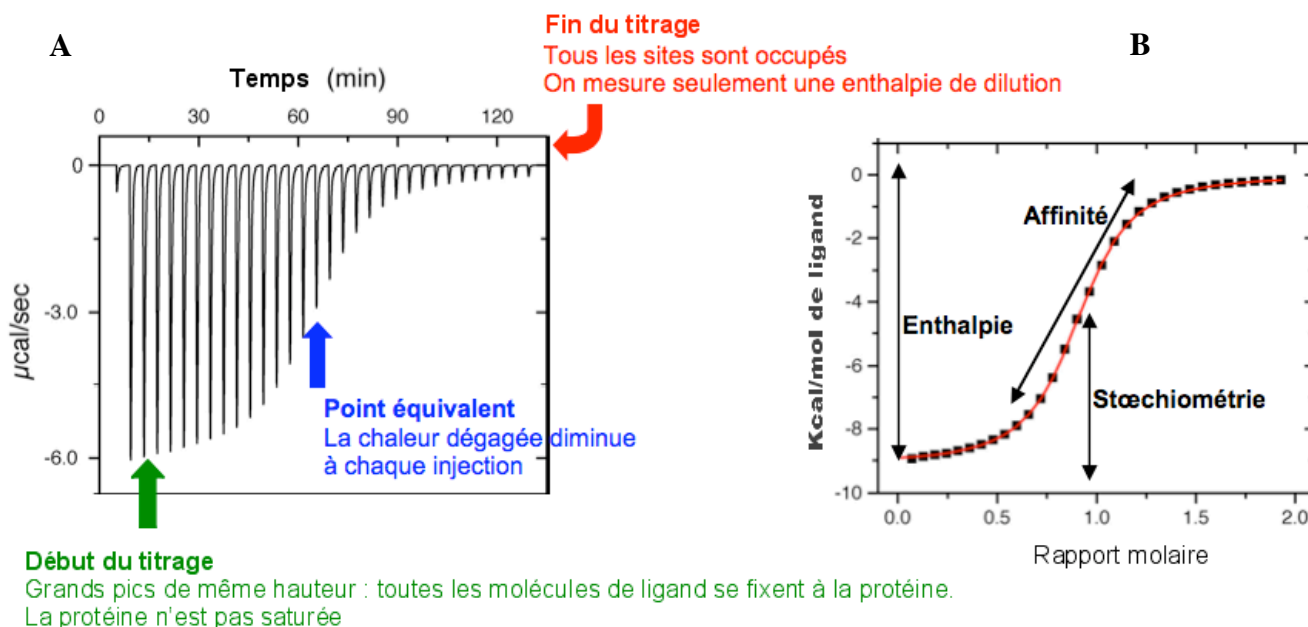
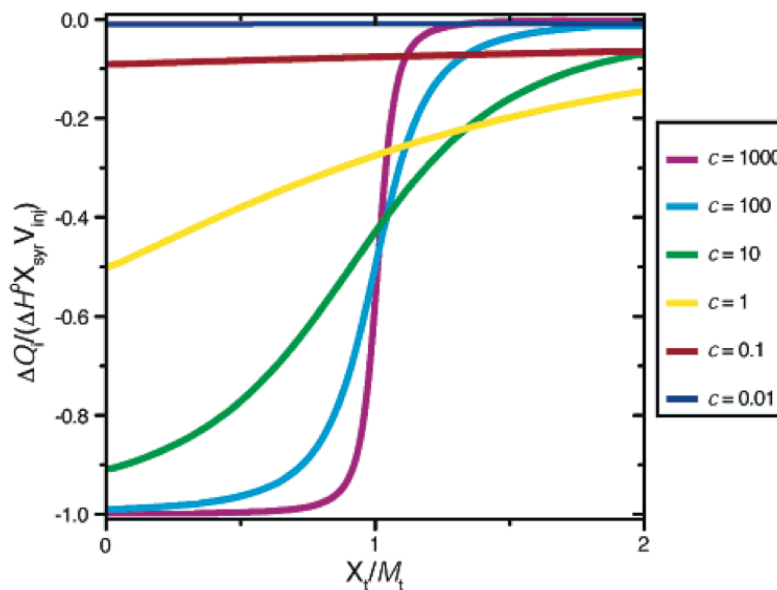


Figure 40 : Données microcalorimétriques. (A) données brutes ( $\mu\text{cal/sec}$  en fonction du temps). Si l'interaction provoque un dégagement de chaleur (phénomène exothermique), la puissance DP (Differential Power) est négative et les pics observés sont orientés vers le bas.  $DP > 0$  si le phénomène est endothermique et les pics sont dirigés vers le haut. (B) Données intégrées (kcal/mol de ligand en fonction du rapport molaire ligand/macromolécule). La courbe sigmoïde théorique est ajustée aux données expérimentales.

A partir des données brutes, la variation d'enthalpie  $\Delta H$ , la constante d'association  $K_a$  et la stœchiométrie  $n$  peuvent être déterminées avec un ajustement de la courbe expérimentale sur le modèle théorique approprié, modèle obtenu par une régression utilisant la méthode des moindres carrés (Wiseman, T. *et al.* 1989). Il est alors possible de calculer la quantité de chaleur  $\Delta Q$  instantanée. Pour un modèle d'interaction dans lequel chaque site est indépendant, la chaleur cumulée au cours de toutes les injections s'écrit :

$$\frac{dQ}{d[L]_t} = \frac{\Delta H^\circ V_0}{2} \left[ 1 + \left( \frac{1 - [L]_t/[M]_t - n / K_a [M]_t}{\sqrt{(1 + [L]_t/[M]_t + n / K_a [M]_t)^2 - 4 [L]_t/[M]_t}} \right) \right]$$

où  $[X]_t$  et  $[M]_t$  sont les concentrations respectives totales du ligand et de la protéine,  $V_0$  le volume effectif de la cellule de mesure et  $dQ$  la variation de la quantité de chaleur échangée, calculée à chaque point de la courbe de titrage. L'enthalpie  $\Delta H$  et la constante d'affinité  $K_a$  permettent de déduire tous les autres paramètres thermodynamiques. L'enthalpie  $\Delta H^\circ$  influence directement l'amplitude de la courbe, tandis que la position du point d'inflexion donne la stœchiométrie  $n$ . En revanche, la forme générale de la courbe dépend du paramètre de Wiseman  $c$  qui est défini comme :  $c = n[M]_0 K_a$  où  $n[M]_0$  représente la concentration initiale de sites de liaison en solution. La détermination des paramètres thermodynamiques est optimale lorsque la courbe se rapproche de la forme sigmoïdale. En pratique, cela correspond à un facteur de Wiseman  $c$  compris entre 10 et 100 (Fig. 41).



**Figure 41** : Variations de la forme des courbes de titrage ITC en fonction de  $c$  (Turnbull, W. B. et Daranas, A. H. 2003)



### A.3.2 Protocole expérimental

Les expériences de microcalorimétrie ont été effectuées dans le laboratoire de glycobiologie moléculaire (CERMAV, Grenoble) où j'ai été accueillie et formée par Anne Imberty et Catherine Gautier.

Les mesures microcalorimétriques de la réaction d'association de CopH ou ses mutants avec les ions Cu(II) ont été réalisées en tampon MOPS 20 mM pH = 7,5, à 25°C, à l'aide d'un calorimètre MicroCal VP-ITC dont la cellule de réaction contient exactement 1.4478 mL.

La solution protéique (2 mL) est préalablement dégazée puis disposée dans la cellule à l'aide d'une seringue, lentement pour éviter l'introduction de bulles d'air. La seringue est remplie avec la solution de CuCl<sub>2</sub> fraîchement préparée et disposée dans la cellule contenant l'échantillon. La protéine CopH, concentrée à 50 µM (soit 100 µM en monomère), en tampon MOPS 20 mM pH = 7.5, est titrée avec la solution CuCl<sub>2</sub> 1,7 mM. La solution de cuivre est ajoutée par incréments de 5 µL, suivant 60 injections espacées de 240 secondes. Le blanc correspond à 60 injections de CuCl<sub>2</sub> concentrée à 1,7 mM dans du tampon MOPS 20 mM pH = 7,5.

Les mutants, concentrés également à 50 µM (soit 100 µM en monomère) en tampon MOPS 20 mM pH = 7,5, sont titrés avec la solution CuCl<sub>2</sub> concentrée à 1 mM. 30 injections de 10 µL sont effectuées, espacées de 300 secondes. Le blanc correspond à 30 injections de CuCl<sub>2</sub> concentré à 1 mM dans du tampon MOPS 20 mM pH = 7.5.

Les constantes  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $K_a$  et la stoechiométrie  $n$  de la réaction sont estimées à partir des isothermes obtenues en utilisant le programme d'analyse calorimétrique Origin® pour ITC.

## A.4 Résonance plasmonique de surface (RPS)

### A.4.1 Principe

Un système de détection utilisant la RPS permet de quantifier l'interaction entre molécules et la formation de complexes. L'un des partenaires est immobilisé sur une surface. Les appareils commercialisés par la marque *Biacore AB* associent une telle détection à un

système d'injection et de transfert de liquide. Ils disposent également de logiciels d'analyse cinétique des interactions mesurées.

Lors de la réflexion totale d'un faisceau laser sur une surface d'un matériau riche en électrons libres, un phénomène de résonance peut apparaître entre les électrons et l'onde évanescente produite près de la surface. Ce phénomène entraîne une chute d'intensité de la lumière réfléchi à un angle donné, variable suivant l'indice de réfraction du milieu situé près de la surface, dans le champ évanescent. Les variations de masse induites par la formation de complexes impliquant des molécules greffées sur la surface modifient cet indice et peuvent donc être mesurées. Le signal de résonance est quantifié en unité de résonance arbitraire (RU). Une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de résonance de  $0.1^\circ$  et à une variation de masse de  $1 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ .

Une courbe de RPS, également appelée « sensorgramme », comprend en général trois phases :

- \* la phase d'association pendant laquelle le partenaire est injecté sur la surface dans un tampon bien choisi. Cette phase se caractérise par un signal croissant si l'interaction a lieu.

- \* à la fin de l'injection, vient la phase de dissociation pendant laquelle le tampon seul est injecté. Le signal décroît.

- \* la phase de régénération permet d'éliminer les reste de partenaires fixés à la surface et qui gêneraient les enregistrements ultérieurs. Cette phase correspond à l'injection de solution de lavage (par exemple du sel, du détergent, un chélateur plus fort que le partenaire en solution, etc...).

#### **A.4.2 Protocole expérimental**

Les expériences de SPR ont été effectuées dans le laboratoire d'enzymologie moléculaire (LEM/IBS-Grenoble), sur un appareil Biacore 1000 équipé d'une surface NTA (acide nitrilotriacétique), à  $20^\circ\text{C}$ . Les courbes ont été traitées avec le logiciel BiaEval.

L'appareil est initialisé en utilisant le tampon de travail (10 mM Hepes pH = 7,4, 150 mM NaCl, 50  $\mu\text{M}$  EDTA et 0,005 % de tensio-actif P20) et la surface NTA est chargée avec 500  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$ .

La solution protéique (CopH ou ses mutants) est diluée dans le tampon de travail (50  $\mu\text{M}$  dans 300  $\mu\text{L}$ ). La surface est tout d'abord chargée en ions  $\text{Ni}^{2+}$ , à un débit de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Lorsque la résonance est stabilisée, la solution protéique (300  $\mu\text{L}$ ) est injectée à un

débit de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  (soit 10 minutes pour atteindre la résonance maximale pour la concentration en protéine donnée à la fin de la phase d'association dans notre cas). Après la phase de dissociation (environ 300 secondes), la surface est régénérée par l'injection d'EDTA (50 mM) à un débit de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Pour chaque expérience, un blanc est effectué en parallèle sur une surface sans métal afin de pouvoir ensuite soustraire les éventuelles associations non spécifiques.

Concernant CopH, plusieurs solutions à différentes concentrations (50, 75, 100, 150, 200, 250, 400  $\mu\text{M}$ ) ont été analysées sur la surface Ni-NTA afin de pouvoir estimer la constante apparente de dissociation  $K_d$ .

Le même type d'expériences a été effectué avec les mutants (25, 50, 75, 100, 150, 200, 400, 800  $\mu\text{M}$ ).

L'étude de l'influence du pH sur l'association et la dissociation de CopH et du double mutant His24-26Ala sur la surface Ni-NTA a été effectuée en injectant des tampons à différents pH au cours de la phase de dissociation : Hepes pH = 7,5 – 7,0, Pipes pH = 6,8 – 6,1 et MES pH = 6,0 – 5,5.

#### **A.5 Chromatographie d'affinité**

Les affinités relatives des protéines CopH, His26Ala, His24Ala et His24-26Ala ont été comparées par chromatographie d'affinité sur colonne HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP (1mL) (GE Healthcare) chargée en cuivre.

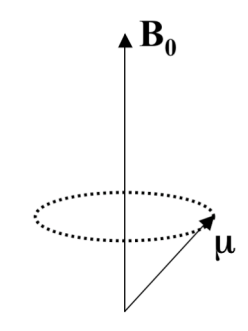
La colonne est lavée en eau, chargée en cuivre (0,5 mL de  $\text{CuCl}_2$  100 mM) et repassée en eau avant d'être équilibrée en tampon 1 (Hepes 0,02 M pH = 7.5, NaCl 0,3 M) avec un débit de 0,5 mL/min. 500  $\mu\text{g}$  de protéine dans 500  $\mu\text{L}$  sont injectés sur la colonne. Cette dernière est lavée avec 3 mL de tampon 1 avant d'éluer la protéine par un gradient linéaire d'imidazole, de 0 à 100 mM, sur 10 mL.

## A.6 Résonance magnétique nucléaire

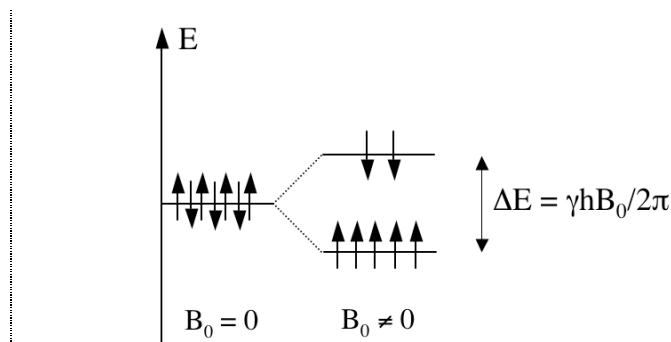
### A.6.1 Principe

La résonance magnétique nucléaire est une technique spectroscopique fondée sur les propriétés magnétiques des noyaux, et en particulier sur leur spin nucléaire  $\mathbf{I}$ . Si  $\mathbf{I} = \mathbf{0}$ , les noyaux correspondants ne peuvent pas être utilisés en RMN.

Prenons l'exemple du proton. Il possède un spin  $I = 1/2$ . Grâce à l'existence de son moment magnétique  $\boldsymbol{\mu}$  associé, le spin peut être considéré comme une aiguille aimantée microscopique dont l'orientation est quelconque sauf si elle est placée dans un champ magnétique statique uniforme  $\mathbf{B}_0$ . Dans ce cas, le moment magnétique défini par  $\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{I}$  (où  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique de l'électron) est animé d'un mouvement de précession autour de  $\mathbf{B}_0$ , appelé précession de Larmor, à la fréquence de Larmor  $\nu_0$  (Fig. 42). D'autre part, l'application du champ  $\mathbf{B}_0$  crée une levée de dégénérescence, faisant apparaître deux niveaux énergétiques  $E_1$  et  $E_2$  avec  $\Delta E = h\gamma B_0/2\pi$  (Fig. 43). Le moment magnétique peut alors s'orienter soit parallèlement à  $\mathbf{B}_0$  (correspondant au niveau de plus basse énergie  $E_1$ ), soit antiparallèlement (niveau de plus grande énergie  $E_2$ ). La répartition de la population des spins sur ces niveaux énergétiques dépend du champ appliqué et suit la loi de Boltzmann  $N_2/N_1 \approx e^{-\Delta E/kT}$  où  $N_1$  est le nombre de spins dans l'état  $E_1$ ,  $N_2$  le nombre de spins dans l'état  $E_2$ ,  $T$  la température en kelvin et  $k$  la constante de Boltzmann ( $k = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ). L'excès de spins orientés parallèlement au champ  $\mathbf{B}_0$  se traduit par l'apparition d'une aimantation nucléaire macroscopique  $\mathbf{M}$ , colinéaire et proportionnelle à  $\mathbf{B}_0$ . Comme pour toute spectroscopie, une transition peut avoir lieu entre les deux niveaux si le système est soumis à une radiation électromagnétique de fréquence  $\nu_0$  obéissant à la loi de Bohr  $\Delta E = h\nu_0 = h\gamma B_0/2\pi$  avec  $\nu_0$  la fréquence de Larmor.

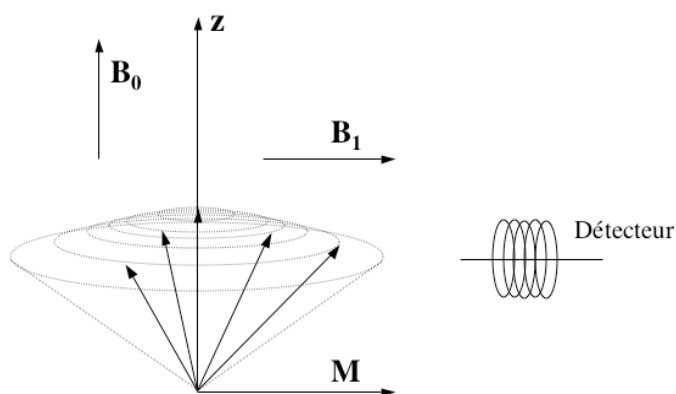


**Figure 42 :** Mouvement de précession du moment magnétique de spin  $\boldsymbol{\mu}$  autour de  $\mathbf{B}_0$ .

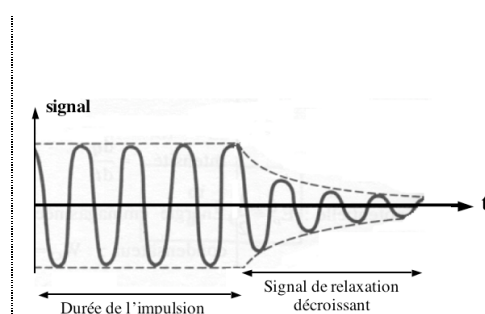


**Figure 43 :** Eclatement des niveaux d'énergie d'un spin 1/2 par application d'un champ magnétique statique  $\mathbf{B}_0$ . L'intensité de la transition qui peut avoir lieu entre ces deux niveaux est proportionnelle à l'excès de population du niveau le plus bas.

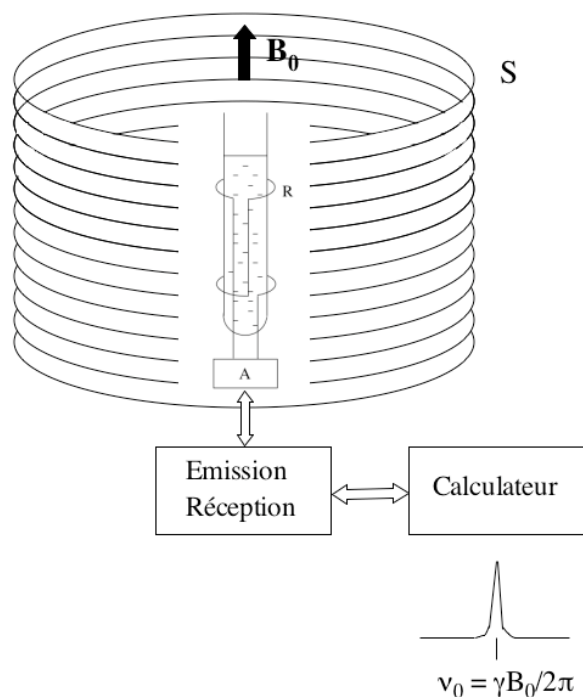
L'aimantation  $\mathbf{M}$  peut être écartée de sa position d'équilibre (parallèle à  $\mathbf{B}_0$ ) par une onde électromagnétique (radiofréquence - 600 à 800 MHz au laboratoire de RMN à l'IBS) générant un champ  $\mathbf{B}_1$ , et envoyée par impulsions très brèves telles que  $\mathbf{B}_1 \perp \mathbf{B}_0$ . Les noyaux absorbent cette énergie et lorsque l'impulsion cesse, l'aimantation  $\mathbf{M}$  est animée d'un mouvement de précession autour de  $\mathbf{B}_0$  (précession de Larmor à la fréquence  $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$ ) (Fig. 44). Sa projection dans le plan orthogonal à  $\mathbf{B}_0$  correspond donc à une sinusoïde amortie de fréquence  $\nu_0$  égale à celle du noyau excité (Fig. 45). Pour une perturbation ayant amené  $\mathbf{M}$  dans un plan orthogonal à  $\mathbf{B}_0$ , un signal électrique d'amplitude maximale et de fréquence  $\nu_0$  est détecté aux bornes d'une bobine dont l'axe est situé dans le plan (Fig. 46).



**Figure 44 :** Une onde électromagnétique (radiofréquences) générant un champ  $\mathbf{B}_1$  est envoyée par impulsions très brèves telles que  $\mathbf{B}_0 \perp \mathbf{B}_1$ . Les noyaux absorbent cette énergie et lorsque l'impulsion cesse, l'aimantation se met à osciller pour reprendre sa position d'équilibre, alignée sur  $\mathbf{B}_0$ . L'oscillation induit aux bornes de la bobine détectrice un signal de relaxation décroissant dont la fréquence est égale à celle du noyau excité.



**Figure 45 :** Après excitation des spins nucléaires par une impulsion radiofréquence, des signaux correspondant à des sinusoïdes amorties en fonction du temps (FID : Free Induction Decay) sont détectés.



**Figure 46** : Un champ magnétique statique  $B_0$  (de l'ordre d'une dizaine de Teslas), créé au moyen d'une bobine supraconductrice S, provoque un éclatement des niveaux d'énergie des spins de l'échantillon placé au centre du dispositif. Une bobine R, accordée à la fréquence de Larmor  $\nu_0$  (circuits électriques représentés par A) permet :

- de créer un champ magnétique alternatif  $B_1$  (émission), orthogonal à  $B_0$ , qui induira la transition entre les deux niveaux énergétiques (Fig. 13)
- de détecter le signal de résonance à cette même fréquence (réception). Le signal est ensuite traité pour obtenir le spectre de l'échantillon.

En réalité, le champ  $B_0$  appliqué extérieurement à un échantillon n'est pas ressenti de la même façon par tous les protons appartenant à une même molécule. En effet, les noyaux se trouvent toujours dans un environnement électronique qui leur constitue un écran magnétique par rapport au champ extérieur. Le champ réellement ressenti par un proton donné dépend donc de cette constante d'écran qui caractérise l'environnement du noyau. Il s'ensuit une différenciation des fréquences de résonance en fonction de l'environnement du noyau considéré, et donc de la nature du groupement chimique auquel il appartient. Cet effet correspond au déplacement chimique, exprimé en ppm (partie par million).

En RMN, le signal obtenu est caractérisé par quatre paramètres :

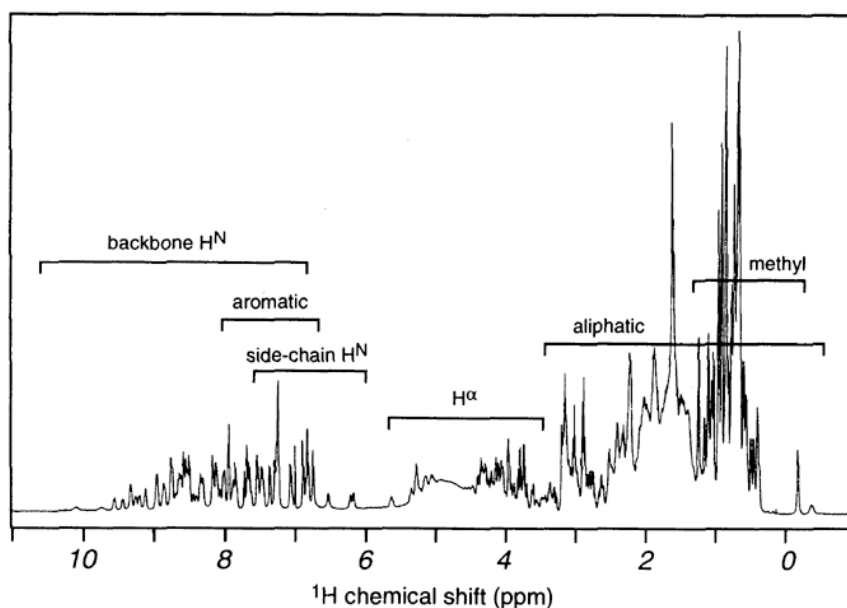
- le déplacement chimique  $\delta$  (ppm) qui correspond à la fréquence de résonance normalisée par une fréquence standard (celle du tétraméthylsilane TMS).

$$\delta = (\nu - \nu_{\text{TMS}}) / \nu_{\text{TMS}}$$

- l'intensité des raies, proportionnelle au nombre de noyaux considérés dans l'échantillon.
- la largeur des raies qui est inversement proportionnelle au temps de relaxation transversal.
- la structure multiraies liée à la constante de couplage spin-spin caractérisant l'interaction entre noyaux. La force de cette interaction est définie par le couplage scalaire J (en Hertz).

De nombreux protons sont présents dans les protéines. Ceci conduit à des recouvrements de pics et rend l'interprétation des données difficile. Pour que les spectres deviennent exploitables, des expériences à 2, 3 ou même 4 dimensions sont réalisées (Sheehan, D. 2000). Ce type d'expérience est obtenu par la corrélation entre des spins de même nature ou de nature différente (par exemple les spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC par lesquels on observe la corrélation entre les protons et les azotes amide). Cela conduit à des spectres multidimensionnels. Les déplacements chimiques des différents noyaux sont édités sur les différentes dimensions, limitant ainsi les recouvrements. Souvent, ces dimensions correspondent aux fréquences de résonance du proton, de l'azote, et du carbone, composants majoritaires des protéines. Cependant, les noyaux  $^{12}\text{C}$  et  $^{14}\text{N}$  ne sont pas exploitables en RMN, contrairement à leurs isotopes  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ . La protéine d'intérêt est par conséquent surexprimée en milieu enrichi en  $^{13}\text{C}$  et ou  $^{15}\text{N}$  pour pouvoir enregistrer les spectres correspondants. La corrélation observée entre les spins peut être de deux sortes : soit à travers les liaisons chimiques (couplage scalaire), soit à travers l'espace (couplage dipolaire).

La RMN permet ainsi, comme la cristallographie des rayons X, d'accéder à la structure des protéines à l'échelle atomique. Une étude RMN exige que la masse de la protéine ne dépasse pas 30 à 40 kDa, que la protéine soit soluble à des concentrations élevées (de l'ordre du millimolaire) et stable dans le temps à température ambiante. Dans ce cas, la protéine est donc sous forme soluble et non pas dans un empilement cristallin. La RMN et la cristallographie imposent une démarche différente. Par RMN, la structure protéique est obtenue en positionnant les résidus les uns par rapport aux autres grâce à des contraintes expérimentales de distances et d'angles (couplages scalaires menant à l'attribution des différents résidus, couplages à travers l'espace, angles dièdres à respecter...) (Fig. 47). Par cristallographie, une carte de densité est enregistrée, carte dans laquelle est introduit un modèle basé sur la séquence primaire. Cela revient à attribuer à chaque atome des coordonnées dans l'espace au sein du cristal. La RMN permet également d'étudier la dynamique de molécules en solution (Sheehan, D. 2000), ce qui est plus difficile en cristallographie. La RMN peut également être une première étape permettant d'estimer la flexibilité d'une protéine en solution et donc la faisabilité d'une étude par cristallographie. Il est également possible d'étudier par RMN les propriétés dynamiques des macromolécules, ainsi que les interactions de type protéine-protéine, protéine-ADN, protéine-métal...



**Figure 47** : Gammes de déplacements chimiques observés pour les différents types de protons d'une protéine.

Différentes idées sont étudiées en méthodologie RMN afin de minimiser le temps total nécessaire pour obtenir des informations structurales sur une protéine. L'une de ces idées est de minimiser le temps entre chaque scan, c'est-à-dire le temps de relaxation longitudinale de l'aimantation après impulsion, en diminuant par exemple l'angle d'impulsion. Une méthode a ainsi été mise au point au laboratoire de RMN (IBS) afin d'obtenir une détermination semiquantitative du repliement d'une protéine, en un temps très court, et appelée  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST-HMQC (Schanda, P. *et al.* 2006).

### A.6.2 Protocole expérimental

Les expériences de RMN ont été effectuées par Beate Bersch du Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire (LRMN/IBS/Grenoble). Les spectres RMN ont été obtenus à 298 K avec un spectromètre Varian INOVA 600 équipé d'un détecteur triple résonance ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ ) incluant les gradients de champ suivant l'axe z.

L'étude de la comparaison des structures de la protéine sauvage et des mutants (en présence ou non de cuivre) a été réalisée à partir de spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Les données ont été traitées par le logiciel NMR Pipe (Delaglio, F. *et al.* 1995) et les spectres visualisés par NMRView (Johnson, B. A. et Blevins, R. A. 1994). Les échantillons ont été préparés avec 0,4 mM de protéine CopH en tampon MES pH = 6,7, en absence ou en présence de 1,8 équivalents de Cu(II).



Afin d'obtenir une détermination semiquantitative du repliement de la protéine, des expériences  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST-HMQC ont été effectuées avec ou sans pulse d'inversion sélectif. 100 points ont été enregistrés dans la dimension indirecte d'où un temps d'acquisition d'environ 10 minutes. Le rapport d'intensité des pics ( $\lambda_{\text{noe}} = I^{\text{sat}}/I^{\text{ref}}$ ) est lié à l'exposition du groupe amide correspondant (Schanda, P. *et al.* 2006).

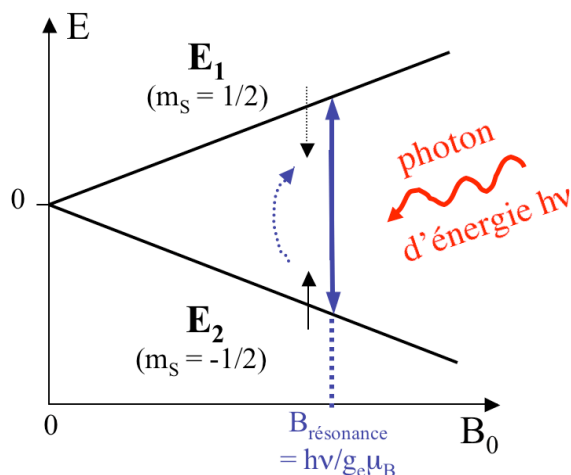
## A.7 Résonance paramagnétique électronique

### A.7.1 Principe

La résonance paramagnétique électronique est une technique spectroscopique très sensible permettant d'étudier les espèces possédant des électrons non appariés. Elle permet de déterminer des détails structuraux, des distances d'interaction, distinguer une molécule particulière dans un mélange... La RPE opère sur les spins des électrons placés dans un champ magnétique, contrairement à la RMN qui agit sur les spins nucléaires.

Soumis à l'action d'un champ magnétique extérieur  $B_0$ , les spins électroniques sont excités par des ondes électromagnétiques à hautes fréquences (hyperfréquences ou micro-ondes), ce qui provoque des transitions entre niveaux énergétiques (voir Fig. 43).

Concernant l'exemple simple d'un électron, isolé, celui-ci possède un moment de spin  $S$  (avec  $S = 1/2$ ), auquel est associé un moment magnétique  $\mu_e = \gamma_e h S = g_e \mu_B S$  (Tab. 15). En présence d'un champ magnétique statique  $\mathbf{B}_0$ , l'interaction entre ce dernier et le moment magnétique de l'électron provoque la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie de l'électron, faisant apparaître deux niveaux  $E_1$  et  $E_2$  (effet zeeman) dont l'expression est modélisée par l'Hamiltonien  $H = g_e \mu_B \mathbf{B}_0 \mathbf{S}$ . On obtient  $E_1 = g_e \mu_B B_0 / 2$  et  $E_2 = -g_e \mu_B B_0 / 2$ , ce qui implique  $\Delta E = E_2 - E_1 = g_e \mu_B B_0$  (Fig. 48). En conséquence, si la radiation envoyée possède une énergie  $h\nu = \Delta E = g_e \mu_B B_0$ , une transition entre les niveaux d'énergie sera observée. C'est le phénomène de résonance paramagnétique électronique. Afin de visualiser toutes les transitions possibles de l'électron, on peut faire varier soit la fréquence  $\nu$ , soit le champ  $B_0$ . Le choix classique, en RPE, est de garder la fréquence  $\nu$  de la radiation constante (dans notre cas, environ 10 GHz – bande X), avec un champ  $B_0$  variable. Dans ce cas, le champ  $B_0$  permettant d'observer le phénomène de transition énergétique sera :  $B_0 = h\nu / g_e \mu_B$ .



**Figure 48** : Diagramme des niveaux d'énergie représentant la transition de l'électron entre les niveaux  $E_1$  et  $E_2$  (avec  $h\nu = \Delta E = g_e \mu_B B_0$ ) par absorption d'un photon d'énergie  $h\nu$ . C'est le phénomène de résonance paramagnétique électronique. Le spin de l'électron se retourne lors de la transition.

Lorsque l'électron se trouve au sein d'une molécule, alors son facteur de Landé  $g$  est différent de  $g_e$ , différence qui traduit le couplage entre les moments de spin et d'orbite. Le facteur  $g$ , dont la valeur est donnée par la formule  $g = h\nu / \mu_B B_{\text{résonance}}$ , est généralement anisotrope et se définit par trois composantes  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$ . Dans notre cas,  $g_x = g_y \neq g_z$ .  $g_z$  sera noté  $g_{//}$  et  $g_x = g_y$  sera noté  $g_{\perp}$ .

Si l'électron est en interaction avec un noyau (dont le dipôle magnétique nucléaire est non nul  $\mu_N \neq 0$ ), il y a couplage entre les dipôles magnétiques électronique  $\mu_e$  et nucléaire  $\mu_N$ . Le couplage hyperfin sera visible si  $\mu_N \neq 0$ , par exemple pour les noyaux  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , pour lesquels  $I = 1/2$ , ou  $^{14}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ , pour lesquels  $I = 1$ . L'Hamiltonien représentant le couplage s'écrit :  $H = g_e \mu_B \mathbf{B}_0 \mathbf{S} - g_N \mu_N \mathbf{B}_0 \mathbf{I} + a \mathbf{I} \mathbf{S}$ . Le premier terme définit l'effet zeeman électronique, le second terme l'effet zeeman du noyau et le troisième l'interaction entre les spins électronique et nucléaire.  $a$  représente la constante de couplage hyperfin isotrope (cas le plus répandu) (Fig. 50). Les transitions RPE observées alors correspondent au retournement du spin de l'électron (soit  $\Delta m_S = \pm 1$ ), sans retournement du spin du noyau (soit  $\Delta m_I = 0$ ) (Fig. 50). Par conséquent, l'écart énergétique, relatif aux transitions permises, s'écrit :  $\Delta E = g \mu_B B_0 \pm a/2$ , dans le cas où  $I = S = 1/2$ , d'où  $B_0 = h\nu / g \mu_B \pm a/2g \mu_B$ .

Deux raies sont alors visibles sur le spectre (Fig. 49), centrées sur  $h\nu/g\mu_B$ , et séparées de  $a/g\mu_B$ . Dans le cas où l'électron est en interaction avec  $n$  noyaux équivalents et de spin  $I$ ,  $2nI+1$  transitions seront observées. En particulier, si  $I = 1/2$ , le nombre et les intensités relatives des raies sont données par les coefficients du triangle de Pascal.

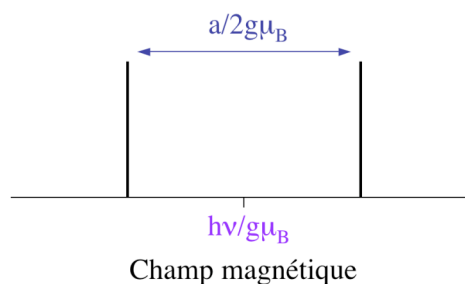


Figure 49 : Spectre RPE représentant les deux raies, résultat de l'interaction entre un électron et un noyau de spin 1/2.

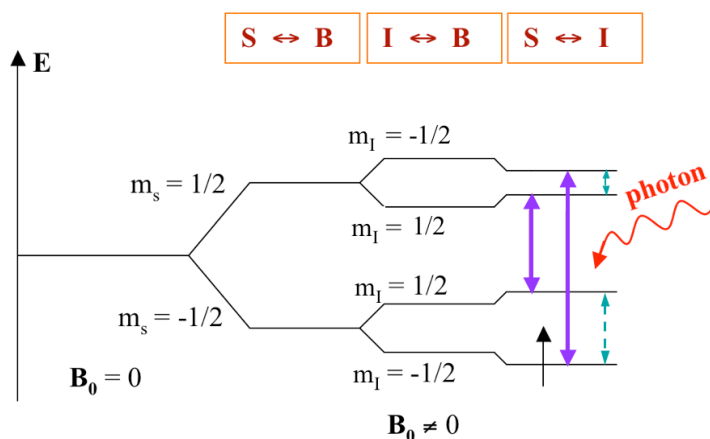


Figure 50 : Diagramme énergétique représentant les transitions RPE possibles. La partie gauche du diagramme prend en compte l'interaction du spin électronique  $S$  avec le champ  $B_0$ , la partie centrale prend en compte l'interaction du spin nucléaire  $I$  ( $\neq 0$ ) avec le champ  $B_0$ , et la partie droite correspond au diagramme complet prenant en compte les interactions précédentes et l'interaction spin électronique  $S$  – spin nucléaire  $I$ . Les transitions énergétiques RPE possibles sont représentées par les flèches violettes. Les flèches pointillées vertes définissent les transitions observées en RPE pulsée, ENDOR et HYSORE par exemple.

Pratiquement, il existe différents types de spectres RPE permettant de réaliser les expériences.

En RPE continue, qui est la plus répandue, on observe les transitions représentées en violet sur la figure 20. Du fait de la largeur des raies, les spectres sont enregistrés en dérivée première, voire seconde. Seuls les couplages hyperfins importants ( $> 30$  MHz) sont visibles. D'autre part, les échantillons sont congelés dans l'azote liquide avant chaque enregistrement RPE afin d'allonger le temps de relaxation de l'électron. Le spectromètre RPE est constitué d'une source haute fréquence (bande X : 10 GHz) jouant le rôle d'un oscillateur haute fréquence (diode Gunn). Un guide d'onde conduit la radiation électromagnétique dans une cavité située entre les pôles d'un électroaimant générant le champ magnétique  $B_0$ .

Pour des couplages plus faibles, il faut recourir à des techniques de RPE plus sophistiquées (RPE pulsée, ENDOR, Hyscore...). Par exemple, l'ENDOR (Electron-Nuclear Double Resonance) correspond à une séquence de pulses déterminée pour mettre en évidence

les couplages de l'ordre de 10-15 MHz, et l'HYSCORE (Hyperfine Sublevel Correlation) les couplages de l'ordre de 1-8 MHz.

Deux types d'expériences peuvent être effectués et apportent des informations complémentaires : la RPE en onde continue (couplages électron – noyau de l'ordre d'une dizaine de MHz), et la RPE pulsée (ENDOR, HYSCORE, ESEEM...) qui permet de voir les couplages plus faibles.

S	Moment de spin électronique
I	Moment de spin nucléaire
$m_S$	Nombre quantique magnétique de spin électronique
$m_I$	Nombre quantique magnétique de spin nucléaire
$\mu_e$	Moment magnétique de l'électron
h	Constante de Planck : $6,626 \times 10^{-34}$ J.s
$g_e$	Facteur de Landé de l'électron : 2,0023
$\mu_B$	Magnéton de Bohr
a	Constante de couplage hyperfin

**Tableau 15** : Signification des différents paramètres utilisés

### A.7.2 Protocole expérimental

Les expériences de RPE ont été effectuées en collaboration avec Serge Gambarelli du Laboratoire de Résonance Magnétique (DSM/DRFMC/SCIB/CEA Grenoble). L'ensemble des expériences a été réalisé à une fréquence  $\nu = 9,65$  MHz. Les spectres RPE en onde continue ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker EMX (bande X) équipé d'un cryostat à flux d'hélium ESR 900 (Oxford Instruments). Les expériences de RPE pulsée (ENDOR et HYSCORE) ont été effectuées avec un spectromètre Bruker Elexsys E580 (bande X), équipé d'un résonateur diélectrique et d'un cryostat à flux continu d'hélium (Oxford Instrument CF935), contrôlé en température par un appareil Oxford Instrument ITC 503.

Les expériences ENDOR ont été réalisées à 15 K. Les spectres ont été enregistrés suivant la séquence de pulses Davies ENDOR ( $\pi$ -T- $\pi/2$ - $\tau$ - $\pi$ -echo) avec une largeur nominale de pulses  $t_{\pi/2} = 32$  ns et  $t_{\pi} = 16$  ns, une valeur fixe T de 13500 ns et un temps  $\tau$  de 204 ns.

Les expériences HYSCORE ont été effectuées à 15 K suivant une séquence de pulses standard ( $\pi/2$ - $\tau$ - $\pi/2$ - $t_1$ - $\pi$ - $t_2$ - $\pi/2$ -echo) avec une largeur nominale de pulses de 16 ns pour les

pulses  $\pi/2$  et  $\pi$ , une valeur  $\tau$  de 128 ns et un taux de répétition de pulses de 2 kHz. Les échos non désirés ont été éliminés par un cycle de phase en quatre étapes. Un ensemble de 128x128 données a été enregistré en faisant varier  $t_1$  et  $t_2$  par incréments de 20 ns à partir de leur valeur initiale de 200 ns. Ce jeu de données a été obtenu à l'aide du logiciel Xepr (Brucker). La ligne de base a été soustraite, dans les deux dimensions, par un 'fit' linéaire suivi d'une apodisation avec une fenêtre de Hamming. 384 zéros ont été enregistrés dans chacune des dimensions pour obtenir une taille de 512x512. Le spectre (intensité obtenue par transformée de Fourier 2D) a été présenté selon des courbes de niveaux.

Concernant la préparation des échantillons, la protéine considérée, en tampon Hepes pH = 7,5 (200  $\mu$ L) et en présence de différents équivalents de Cu(II), a été transférée dans un tube RPE calibré (4 mm de diamètre interne) et congelé dans l'azote liquide. Les échantillons préparés en D<sub>2</sub>O ont été au préalable lyophilisés puis repris dans un volume de D<sub>2</sub>O nécessaire à l'obtention de la concentration voulue en protéine.

## A.8 Dichroïsme circulaire

### A.8.1 Principe

La polarisation de toute onde lumineuse peut se décomposer en deux parties : l'une circulaire droite (PCD), l'autre circulaire gauche (PCG). En présence de dichroïsme circulaire, l'une des deux composantes est absorbée plus rapidement que l'autre. Une molécule présente donc un dichroïsme circulaire lorsqu'elle absorbe différemment la lumière si sa polarisation est circulaire droite ou circulaire gauche. C'est une caractéristique des molécules chirales (c'est-à-dire sans centre ni plan de symétrie), comme la plupart des molécules biologiques.

La différence entre les deux absorptions est définie par :  $\Delta A = A_G - A_D = (\epsilon_G - \epsilon_D).l.C$  où  $\epsilon_G$  et  $\epsilon_D$  correspondent aux absorptivités molaires respectives de la lumière PCG et PCD, C la concentration molaire et le trajet optique.

Le dichroïsme circulaire s'écrit alors :  $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$

L'ellipticité  $\theta$ , mesurée par l'appareil, est un angle correspondant à la forme de la polarisation de la lumière. En général,  $A \ll 1$  et  $\Delta\epsilon \propto \theta/lC$ .

Un spectropolarimètre est classiquement composé de quatre chambres : une source lumineuse, suivie d'un monochromateur. La lumière ainsi générée peut ensuite traverser l'échantillon. La lumière transmise est alors détectée par le photomultiplicateur.

La détermination du dichroïsme circulaire permet d'étudier l'effet de l'environnement (pH, température, détergents, ligands, etc...) sur la structure d'une protéine, la nature des structures secondaires des protéines, les interactions protéine-protéine ou protéine-ADN, la dynamique des protéines (dénaturation-renaturation)...

Généralement, les spectres de protéines enregistrés dans l'UV proche (310-250 nm) apportent des informations sur l'environnement des résidus aromatiques (principalement W et F). Les spectres obtenus dans l'UV lointain (250-190 nm) permettent d'observer l'arrangement de la liaison peptidique, donc la structure secondaire de la protéine. Enfin, les spectres effectués dans le visible permettent d'avoir accès aux changements structuraux dus à la liaison d'un élément métallique par exemple.

### **A.8.2 Protocole expérimental**

Les spectres CD obtenus dans l'UV ont été enregistrés sur un spectropolarimètre Jobin Yvon CD6 à température ambiante. Les spectres dans le visible ont été effectués sur un spectropolarimètre Jasco 810. Une cuve de quartz de 250  $\mu$ L correspondant à un trajet optique de 1 mm a été utilisée.

Pour étudier l'influence du pH sur la conformation de CopH (spectres enregistrés entre 190 et 260 nm), 2  $\mu$ L de solution protéique concentrée à 1,7 mM en tampon Tris-HCl 50 mM (pH = 7,5) ont été ajoutés à 300  $\mu$ L de tampon phosphate 20 mM. Dans ces conditions, la concentration finale de CopH est de 11,3  $\mu$ M. Afin d'enregistrer le spectre de CopH en présence de cuivre, la protéine est d'abord diluée dans l'eau pour amener sa concentration à 11,3  $\mu$ M ; un spectre de référence est alors enregistré. Puis 3 équivalents de cuivre (solution de  $\text{CuCl}_2$  fraîchement préparée) ont été ajoutés pour enregistrer le nouveau spectre.

L'analyse de l'évolution de la structure secondaire de CopH en fonction du pH a été réalisée en préparant des solutions de CopH dans différents tampons : imidazole pH = 6,5, MES pH = 5,6, acétate de sodium pH = 4,6, glycine pH = 3,4, et glycine pH = 2,4.

Pour étudier l'effet de différentes quantités de cuivre sur la conformation de CopH, dans le visible, différentes solutions de CopH en présence de quantités croissantes de Cu(II)

ont été préparées. 67.2  $\mu\text{L}$  de solution protéique concentrée à 930  $\mu\text{M}$  en tampon Hepes 20 mM (pH = 7.5) ont été dilués dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 20 mM avec 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuCl}_2$  de concentration appropriée. La concentration finale en protéine est de 250  $\mu\text{M}$  en présence de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, ou 6 équivalents de Cu(II). Les spectres ont été enregistrés entre 800 et 250 nm, en continu, à 100 nm/min et avec un temps de réponse de 1 seconde. Une seule accumulation a été effectuée à chaque fois.

## **A.9 Thermal shift assay**

### **A.9.1 Principe**

Le développement de diverses méthodes à haut débit appliquées à l'expression, la purification et la cristallisation de protéines contraste avec le peu d'informations disponibles concernant le contrôle qualité des préparations protéiques. La stabilité des protéines a été étudiée par une variété de techniques comme la calorimétrie ou par des instruments optiques mesurant, en fonction de la température, les changements en absorbance, en fluorescence ou par dichroïsme circulaire. Parmi ces dernières, seul le contrôle par fluorescence/absorbance est développé aujourd'hui à haut débit, dans le but, en particulier, d'optimiser les conditions de cristallisation d'une protéine. Un premier appareil miniaturisé, utilisant la fluorescence d'échantillons, a été décrit en 2001 (Pantoliano, M. W. *et al.* 2001). Il se basait sur la stabilisation conformationnelle protéique induite par un ligand, afin de tester à haut débit une banque de composés placés dans des plaques de 384 puits. La technique a ensuite été adaptée aux appareils de PCR en temps réel disponibles commercialement.

La méthode « thermal shift assay » est basée sur l'utilisation d'un fluorophore utilisé comme indicateur de l'état de la protéine étudiée (stabilité, changements conformationnels et autres processus modifiant l'environnement hydrophobe de la sonde). L'une des sondes les plus utilisées est le SYPRO Orange (Molecular Probes, Eugene, OR) fournie en solution (concentrée 5000x) dans le DMSO. Les fluorophores utilisés possèdent une fluorescence faible dans les solvants de haute constante diélectrique (comme l'eau), et une grande fluorescence dans les solvants de faible constante diélectrique (comme les solvants organiques). Du fait de cette propriété, ils constituent une sonde extrinsèque de l'état d'une protéine. En effet, les régions hydrophobes d'une protéine sont généralement plus exposées lors du processus de dénaturation. Les protéines dénaturées possèdent donc de faibles

propriétés diélectriques. Ainsi, la répartition du fluorophore autour de la protéine native, en fusion ou dénaturée, fournira un taux de fluorescence caractéristique de l'état de la protéine. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du SYPRO Orange sont respectivement de 470 nm et 570 nm.

La fluorescence détectée (Rfu : unité arbitraire de fluorescence) est représentée en fonction de la température  $T$ . Afin de déterminer le point d'inflexion de la transition de phase thermique vers la dénaturation de la protéine ( $T_m$ ), les résultats sont présentés sous la forme de la dérivée première des données brutes. La modification de la valeur de  $T_m$  dans différentes conditions est indicative d'un changement dans la stabilité de la protéine. Un déplacement de  $T_m$  vers les températures plus hautes indique une stabilisation de la protéine par augmentation de sa structuration, concomitante à une réduction de sa flexibilité conformationnelle. A l'inverse,  $T_m$  sera plus basse dans le cas d'une déstabilisation de la protéine (Geerlof, A. *et al.* 2006) (Fig. 51).

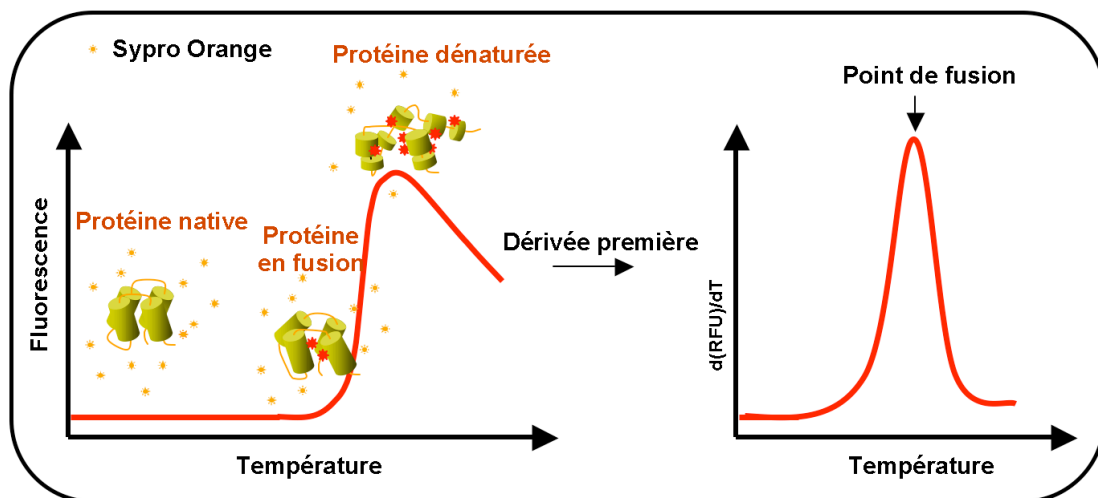


Figure 51 : Détection de la fluorescence lors de transitions de phases thermiques chez les protéines

### A.9.2 Protocole expérimental

Les essais par 'thermal shift assay' ont été menés au Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules (LIM/IBS-Grenoble) sur un Thermocycler iQ5 (Bio-Rad). Le système contient un dispositif de chauffage/refroidissement pour jouer sur la température et un détecteur permettant de visualiser les changements de fluorescence.

Des solutions de CopH et ses mutants (5 mg/mL) en tampon Hepes 50 mM pH = 7,5 ont été étudiées en présence de différents équivalents de cuivre (0,5, 1, 1.5, 2, 3, 4 équivalents) avec du SYPRO Orange (2  $\mu$ L de solution stock concentrée 5000x et diluée au

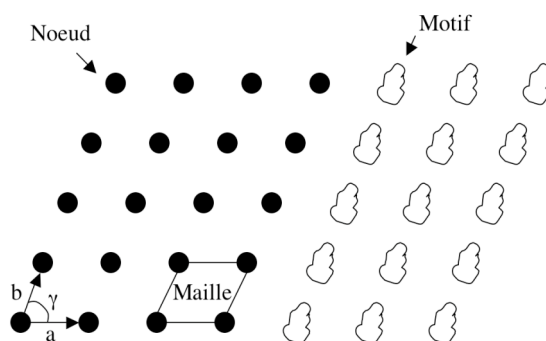


1/50° dans l'eau) dans un volume total de 25 µL. Comme le SYPRO Orange est relativement instable dans l'eau, la solution est préparée juste avant l'analyse. Chaque puits de la plaque (96 puits) est rempli avec 23 L d'échantillon en présence de cuivre. La plaque est disposée dans l'appareil et l'analyse est effectuée entre 293 K et 368 K (équilibration de la température à 293 K pendant 10 minutes avant l'analyse), suivant une évolution de la température de 1 K/min. Une expérience sur une plaque de 96 puits dure environ 1 heure 30.

## A.10 Cristallogénèse et cristallographie

### A.10.1 Principe

La cristallogénèse correspond à l'obtention d'un cristal de la protéine d'intérêt. La cristallographie est fondée sur la diffraction des rayons X par ce cristal, ce qui permet l'obtention des informations concernant l'arrangement des molécules dans le cristal analysé et la structure de la molécule, à l'échelle atomique. Un cristal est formé par l'arrangement périodique d'un motif constitué d'atomes, de molécules, ou d'un assemblage de molécules. Au sein du cristal, le motif (la maille cristalline) se répète par translation dans l'espace à deux, ou trois dimensions (Fig. 52)

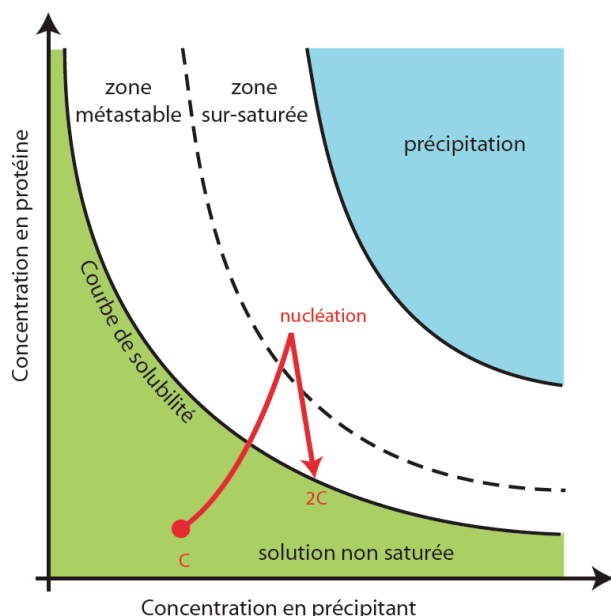


**Figure 52** : Représentation schématique d'une maille cristalline en deux dimensions. Une maille est définie par les paramètres  $a$ ,  $b$  et l'angle  $\gamma$ .

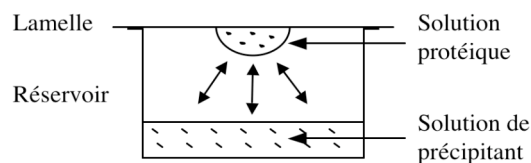
La cristallisation d'une protéine nécessite de passer d'une solution, dans laquelle la protéine est soluble, à un état solide et ordonné. Ce phénomène physique correspond à une séparation de phases, contrôlée par des paramètres cinétiques et thermodynamiques, comme la température, la pression, la diffusion... L'augmentation progressive de la concentration de la protéine permet d'atteindre un état de sursaturation, qui conduit à la formation des cristaux. La solubilité, et donc la cristallisation (Fig. 53), d'une protéine est influencée par divers

facteurs comme la pureté et la stabilité de la protéine, sa concentration, la nature et la concentration de l'agent précipitant, la température, le pH, les additifs...

La méthode de cristallisation la plus courante se fait par diffusion de vapeur, en goutte suspendue (Fig. 54) ou en goutte assise.



**Figure 53 :** Digramme de solubilité d'une protéine, dans la goutte, en fonction de la concentration en agent précipitant. Par diffusion de vapeur de la goutte vers le réservoir, on se déplace de  $c$  vers  $2c$ .



**Figure 54 :** Principe de la méthode par diffusion de vapeur, en goutte suspendue.

Une solution protéique est diluée dans la solution de cristallisation (tampon, agent précipitant, additifs) pour former une goutte de faible volume (environ  $2 \mu\text{L}$  dans le cas des gouttes faites manuellement). La lamelle sur laquelle est déposée la goutte est retournée au-dessus d'un réservoir composé de la solution de cristallisation. La goutte s'équilibre dans cette enceinte scellée. Le volume du réservoir est environ 500 fois plus important que celui de la goutte. La sursaturation est atteinte par diffusion des espèces volatiles (l'eau principalement) du milieu le moins concentré (la goutte) vers le milieu le plus concentré (le réservoir). Le volume de la goutte diminuant, la protéine se concentre et s'organise, dans le meilleur des cas, en cristaux, lorsque l'équilibre est atteint. Ensuite, si les cristaux sont de bonne qualité, ils sont étudiés par diffraction des rayons X.

Les rayons X envoyés sur le cristal interagissent avec les électrons de valence des atomes constituant la protéine et sont diffractés. L'analyse de la figure de diffraction obtenue permet d'accéder à la structure tridimensionnelle de la protéine.

### A.10.2 Protocole expérimental

La cristallogenèse de CopH a été faite par le robot de cristallisation de l'IBS (goutte assise). Plusieurs concentrations de protéine (20, 30, 40 mg/mL) en présence de 2 équivalents de cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) et plusieurs kits ont été testés : The Classics, The pH Clear, The Pegs. (Qiagen), The Pact et Index (Hampton). Le même type d'essais a été effectué en présence d'un complexe de lanthanide (utilisé en méthodologie de cristallisation au laboratoire), le tris-dipicolinate d'euprium, concentré à 20 mM dans la goutte.

## B – Techniques relatives à CusA et CzcA

### B.1 Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)

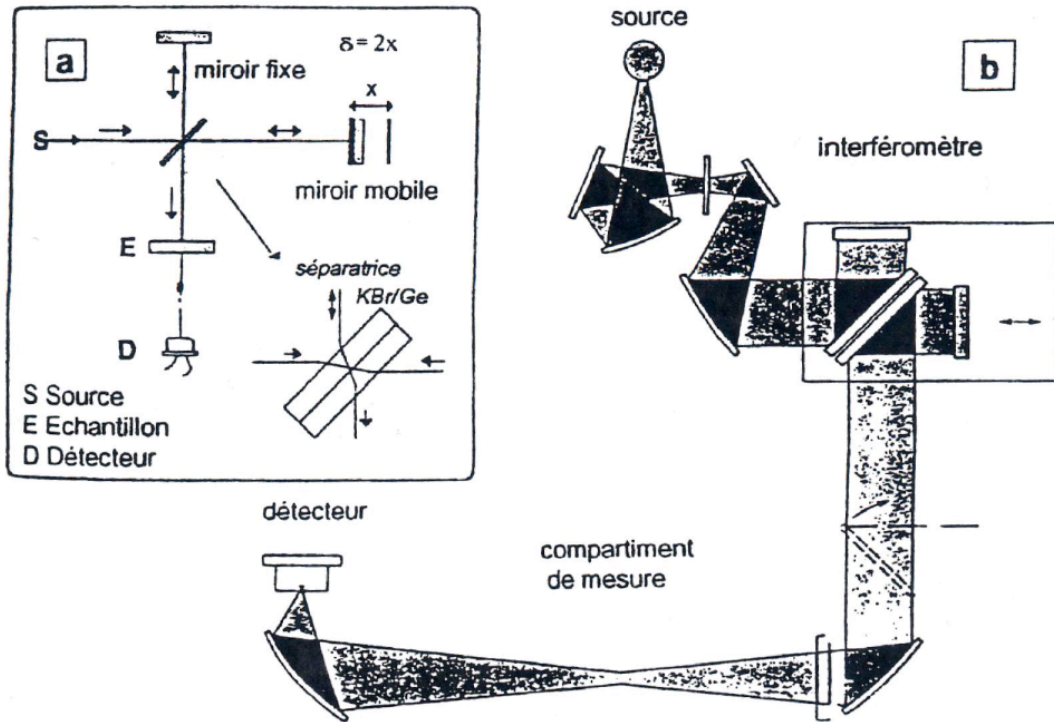
#### B.1.1 Principe

##### *\* Généralités*

La spectroscopie d'absorbance infra-rouge est une méthode basée sur la mesure de l'absorbance d'une onde située dans l'infra-rouge ( $400$  à  $4000\text{ cm}^{-1}$  soit  $10^{12}$  à  $10^{14}$  Hz) par un échantillon. Les radiations envoyées provoquent des modifications des mouvements vibrationnels des liaisons. La spectroscopie infra-rouge permet alors de détecter la présence, dans la molécule étudiée, de groupements fonctionnels ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}\dots$ ), dont la fréquence de vibration est connue. Certaines caractéristiques structurales de la molécule peuvent ensuite être déterminées.

Le montage optique de l'appareil comprend une source, un interféromètre de Michelson, un compartiment de mesure et un détecteur (Fig. 55b). L'interféromètre est quant à lui constitué d'une lentille séparatrice formée d'un film de germanium supporté sur une lame de bromure de potassium KBr, d'un miroir mobile et d'un miroir fixe (Fig. 55a). Les radiations issues de la source de lumière continue viennent frapper la lentille séparatrice qui permet de générer deux faisceaux dont l'un est réfléchi vers le miroir fixe et l'autre vers le miroir mobile dont on fait varier la distance à la lentille séparatrice. Ces deux faisceaux, recombinaés ensuite sur le même trajet, traverse l'échantillon avant de venir frapper le détecteur qui fournit une mesure globale de l'intensité lumineuse reçue. Le signal transmis au cours du temps par le détecteur est traduit par un interférogramme,  $I = f(\delta)$  (où  $\delta$  représente la

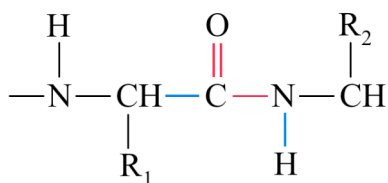
différence de trajet optique entre les deux voies), restitué sous la forme  $I = f(\lambda)$  ou  $I = f(\sigma)$ , par transformée de Fourier ( $\lambda$  représentant la longueur d'onde et  $\sigma$  le nombre d'onde).



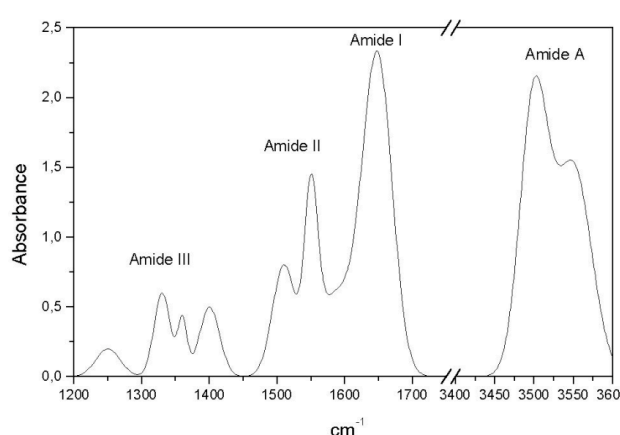
**Figure 55** : Montage optique d'un appareil à transformée de Fourier. a – interféromètre de Michelson ; b – diagramme optique d'un spectromètre simple faisceau à transformée de Fourier.

\* Le cas des peptides et protéines

Dans le cas où la molécule étudiée est un peptide ou une protéine (Fig. 56), l'examen des spectres IR se base sur l'observation des modes vibrationnels des groupes amide (amide I et amide II). La bande amide I, entre  $1700$  et  $1600\text{ cm}^{-1}$ , est la plus intense (Fig. 57). Elle est principalement générée par la vibration de valence de la liaison  $\text{C}=\text{O}$  avec quelques contributions de la vibration d'élongation de la liaison  $\text{C}-\text{N}$ . La bande amide II, entre  $1600$  et  $1500\text{ cm}^{-1}$  est plus complexe. Elle est produite en majorité par la vibration de déformation angulaire de la liaison  $\text{N}-\text{H}$  et voit quelques contributions de la vibration de valence des liaisons  $\text{C}-\text{N}$  et  $\text{C}-\text{C}$ .



**Figure 56** : Représentation de la liaison peptidique. La bande amide I est générée par les liaisons en rouge, la bande amide II par les liaisons en bleu.



**Figure 57** : Spectre IR représentant la forme classique des bandes d'absorbance amide I et amide II.

Connaissant la zone d'absorbance d'une molécule (détergent, lipide...), il est possible de déterminer sa concentration. La méthode IRTF constitue une méthode de dosage du détergent et des lipides associés à une protéine (daCosta. C. J. et Baenziger, J. E. 2003), méthode sensible (environ 5 % d'erreur) et peu consommatrice de protéine.

### B.1.2 Protocole expérimental

Les expériences de spectroscopie IRTF ont été d'abord effectuées sur un spectromètre Equinox 55 (Bruker) selon une méthode ATR – STDXPM, dans le laboratoire d'ingénierie des systèmes macromoléculaires, à Marseille où j'ai été accueillie par James Sturgis. J'y ai effectué les premières expériences de spectroscopie IRTF, puis les ai reproduites sur un

spectromètre AVATAR 330 (Thermo), dans le laboratoire d'études dynamiques et structurales de la sélectivité (LEDSS), sur le campus de Grenoble.

Les échantillons de protéine (CusA) ont été analysés après purification. Une goutte (5  $\mu\text{L}$ ) d'échantillon concentré à 5 mg/mL est déposée sur la petite surface de diamant et laissée sous flux d'azote afin d'éliminer la contribution de l'eau en l'évaporant. Plusieurs spectres sont enregistrés. Lorsque la contribution de l'eau est négligeable, les spectres sont superposables et l'examen des bandes d'absorbance devient possible.

Le principe repose sur le repérage des bandes caractéristiques de chaque détergent - DDM (liaisons C-O absorbant entre 1180 et 1150  $\text{cm}^{-1}$ ) et SDS (liaisons C-O absorbant entre 1250 et 1190  $\text{cm}^{-1}$ ) - et du tampon - Tris-HCl (liaisons C-O absorbant entre 1170 et 1100  $\text{cm}^{-1}$ ). L'enregistrement de spectres correspondant à différentes concentrations de Tris-HCl, de DDM, et de SDS permet de déterminer une gamme étalon pour chaque composant du mélange.

La soustraction du spectre de la protéine et de celui d'un détergent à une concentration connue  $\alpha_1$ , affecté d'un certain coefficient  $\alpha_2$ , permet de rendre nulle la contribution du détergent choisi et d'en déduire la concentration de détergent présent dans la solution protéique ( $\alpha_1\alpha_2$ ). Une approximation de la concentration de détergent lié est obtenue en enlevant la valeur de sa concentration micellaire critique (cmc).

La détermination de la quantité de lipides dans la solution protéique se base sur le rapport entre l'absorbance de la liaison C=O du groupe amide à 1755  $\text{cm}^{-1}$  (correspondant à la protéine) et celle de la liaison C=O du groupe ester (correspondant aux lipides) à 1740  $\text{cm}^{-1}$ .

## **B.2 Ultracentrifugation analytique**

### **B.2.1 Principe**

L'ultracentrifugation analytique est une méthode de choix pour l'analyse de la distribution de taille de molécules en solution. Dans le cas de l'étude de complexes membranaires en solution, elle permet d'en déterminer le rayon hydrodynamique et la masse, ainsi qu'estimer la quantité de détergents associés à la protéine.

Les échantillons sont disposés dans une cellule (Fig. 58A) placée dans un rotor adapté pour une lecture optique en cours de centrifugation (Fig. 58B). L'évolution de deux

paramètres, l'absorbance, et un signal d'interférence relatif à la variation d'indice de réfraction du milieu, est suivie en fonction du temps (t) sur toute la longueur de la cellule (mesuré en r : distance à l'axe du rotation du rotor). Si l'absorbance (à 280 nm) permet dans notre cas de suivre en particulier la protéine, le signal d'interférence est sensible à toute particule affectant l'indice de réfraction au sein de la cellule de mesure.

La collecte de données en vitesse de sédimentation aboutit à l'obtention d'une série de profils de sédimentation (Fig. 59). Le traitement d'une série de profils permet d'obtenir la vitesse de sédimentation de chacun des composants du système étudié et d'en déduire leurs coefficients de sédimentation  $s$  respectifs.

L'équation (1) relie la valeur du coefficient de sédimentation expérimental  $s$  à celle de la masse flottante du complexe  $M_b$  et son rayon de Stoke  $R_s$  (ou rayon hydrodynamique) :

$$M_b = sN_A 6\pi\eta R_s \quad (1)$$

$N_A$  représente le nombre d'Avogadro et  $\eta$  la viscosité.

Dans le cas des complexes de protéines membranaires en solution micellaire de détergent, la masse flottante de la particule dépend de la densité du solvant ( $\delta$ ), de la masse moléculaire du complexe ( $M_c$ ) et du volume spécifique partiel de ce complexe  $\bar{V}_c$  (équation 2). On peut alors développer la contribution de chaque élément du complexe : de la protéine, de masse ( $M_p$ ) et de volume spécifique partiel  $\bar{V}_p$  ; du détergent associé en quantité ( $\gamma_D$ ) (en g/g) et de  $\bar{V}_D$  connu ; des lipides en quantité ( $\gamma_L$ ) et  $\bar{V}_L$  connu ; et du solvant ( $\gamma_w$ ) et de  $\bar{V}_w$  connu (mais la contribution du solvant est négligée dans notre cas):

$$M_b = M_c (1-\delta \bar{V}_c) = M_p [(1-\delta \bar{V}_p) + \gamma_D (1-\delta \bar{V}_D) + \gamma_L (1-\delta \bar{V}_L) + \gamma_w (1-\delta \bar{V}_w)] \quad (2)$$

Le rayon hydrodynamique  $R_s$  peut être estimé par rapport au rayon  $R_0$  d'une sphère compacte représentant la particule de densité  $1/\bar{V}_p$ , de masse moléculaire  $M_p$  et corrigée par le facteur de forme  $f/f_0$  (dont la valeur est d'environ 1,25 pour une particule globulaire compacte) :

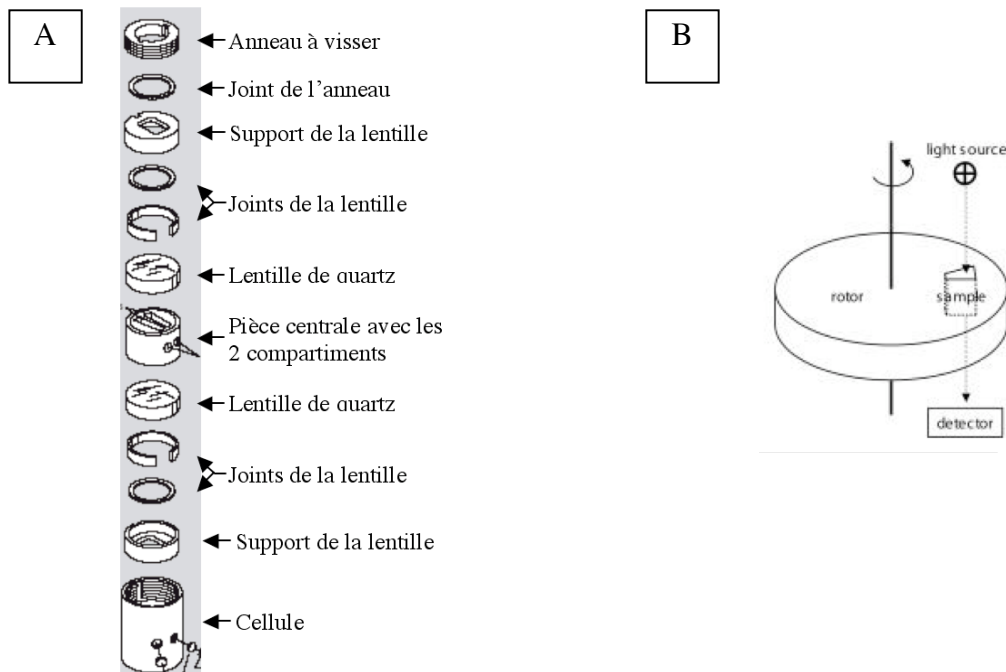
$$R_s = R_0 f/f_0 = f/f_0 \cdot \sqrt[3]{(3 \cdot M_p \cdot \bar{V}_p / (4 \cdot \pi \cdot N_a))} \quad (3)$$

Les particules ne contribuant qu'au signal d'interférence, comme par exemple les molécules de détergent, peuvent être quantifiées en mesurant leur nombre de franges d'interférence  $J$ , lui-même proportionnel à la concentration en molécules par l'équation suivante :

$$J = (dn/dc) \cdot c \cdot l / \lambda \cdot K \quad (4)$$

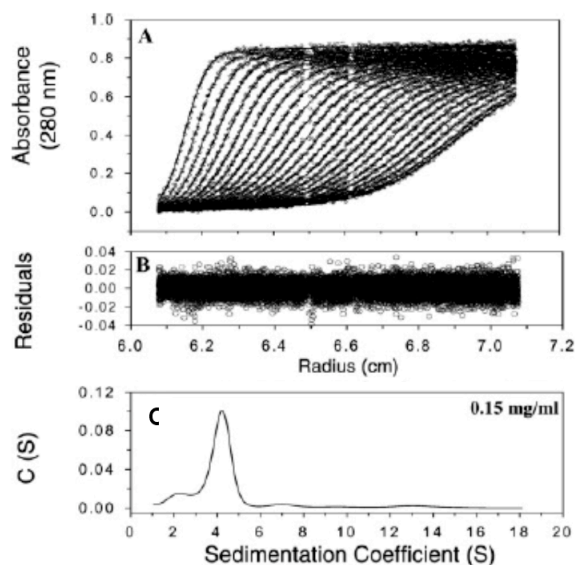
Dans cette expression,  $c$  est la concentration de la particule,  $l$  le trajet optique,  $\lambda$  la longueur d'onde ( $\lambda = 675 \text{ nm}$ ),  $K$  une constante égale à 1,013,  $dn/dc$  la contribution en interférence de la particule : 0,186 mL/g pour une protéine ( $J/c = 2,76$ ) et 0,133 mL/g pour les deux détergents DDM et fos-choline 14. Si on considère que le détergent est l'élément majoritaire associée à la protéine, la quantité de détergent associée,  $\gamma_D$ , est estimée par comparaison quantitative des analyses  $c(s)$  (coefficients de sédimentation apparents) en absorbance et en interférence :

$$(J\epsilon/A_{280} - J/c) \cdot c/J = \gamma_D \quad (5)$$



**Figure 58** : Description d'une cellule d'ultracentrifugation analytique et mécanisme de fonctionnement.  
**A.** composition et montage d'une cellule.  
**B.** Fonctionnement du système optique dans la centrifugeuse.





**Figure 59 :** Exemple d'expérience de vitesse de sédimentation.

A. Profil typique de l'absorbance à 280nm d'une protéine pendant l'expérience de vitesse de sédimentation. Les symboles sont les points expérimentaux et les courbes sont le résultat du fit des données brutes par le programme Sedfit.

B. Distribution des résidus du fit.

C. Distribution continue du coefficient de sédimentation de la protéine.

### B.2.2 Protocole expérimental

Les expériences d'ultracentrifugation analytiques ont été menées avec David Stroebel, alors post-doc au laboratoire. Nous avons utilisé la centrifugeuse Beckman XL-I (rotors Beckman de 4 ou 8 trous), du laboratoire de biophysique moléculaire de l'IBS. Les études ont été effectuées à 42000 rpm, à 4 ou 6°C.

Les échantillons ont été analysés directement après purification et concentration sur membrane. Dans ce cas, une simple dilution a permis l'étude de plusieurs paramètres comme la concentration de protéine et la concentration de détergent. L'influence du pH (entre 5,6 et 8) a été étudiée, ainsi que la force ionique (0 à 500 mM NaCl). Les expériences ont été effectuées à 42 000 rpm, sur des échantillons de 100 ou 400  $\mu$ L, chargés dans des cellules à deux canaux correspondant à un trajet optique de 0,3 ou 1,2 cm respectivement. Le tampon contenu dans la chambre de référence est identique à celui de l'échantillon, sans détergent. Les variations d'interférence et d'absorbance ont été enregistrées pendant une nuit et analysées suivant la distribution de taille du programme Sedfit (version 9.4b) développé par P. Schuck et disponible sur [www.analyticalultracentrifugation.com](http://www.analyticalultracentrifugation.com). Une distribution continue du coefficient de sédimentation apparent  $c(s)$  est obtenue, permettant de déconvoluer la contribution des différentes espèces du mélange (P. Schuck, 2000 ; Brown, P. H. et Schuck, P. 2006). L'analyse  $c(s)$  a été effectuée en considérant 200 particules sur une grille de 300 points calculés avec un rapport de friction  $f/f_0$  de 1,25 et un coefficient de sédimentation compris entre 1 et 50 s. La densité  $\rho$  et la viscosité  $\eta$  de chaque solution sont

estimées avec le programme Sedentrp (disponible sur [www.jphilo.mailway.com/download.html](http://www.jphilo.mailway.com/download.html)). La masse molaire, le coefficient d'extinction molaire et le volume spécifique de CusA et AcrB ont été déduits de la composition en acides aminés par le même programme : CusA : 115,597 g.mol<sup>-1</sup>, 16 0000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> et  $\bar{V}$  0,7456 ml.g<sup>-1</sup> (pI = 5,92) ; AcrB : 114,654 g.mol<sup>-1</sup>, 90 100 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> et  $\bar{V}$  0,7394 ml.g<sup>-1</sup> (pI = 6,22). Les volumes partiels spécifiques des détergents  $\bar{V}_D$  utilisés sont : 0,824 mL.g<sup>-1</sup> pour le DDM et 0,94 mL.g<sup>-1</sup> pour la fos-choline 14 (considérée identique à la fos-choline 12) (le Maire, M. *et al.* 2000). Le volume partiel spécifique pour le complexe protéine-détergent  $\bar{V}_{PDC}$  a d'abord été considéré égale à 0,79 mL.g<sup>-1</sup> en DDM et 0,87 mL.g<sup>-1</sup> en fos-choline 14.

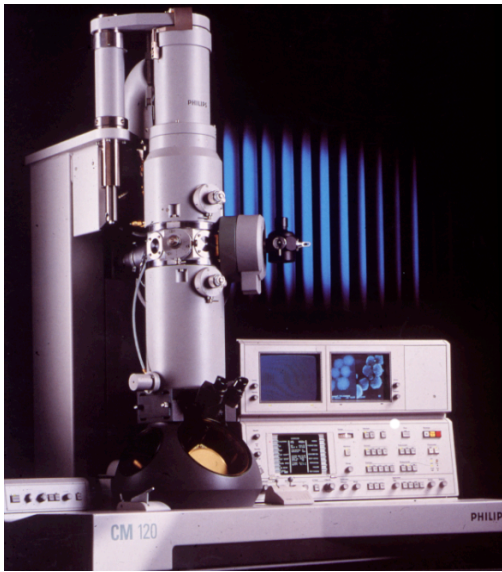
### B.3 Microscopie électronique à transmission (MET)

#### B.3.1 Principe

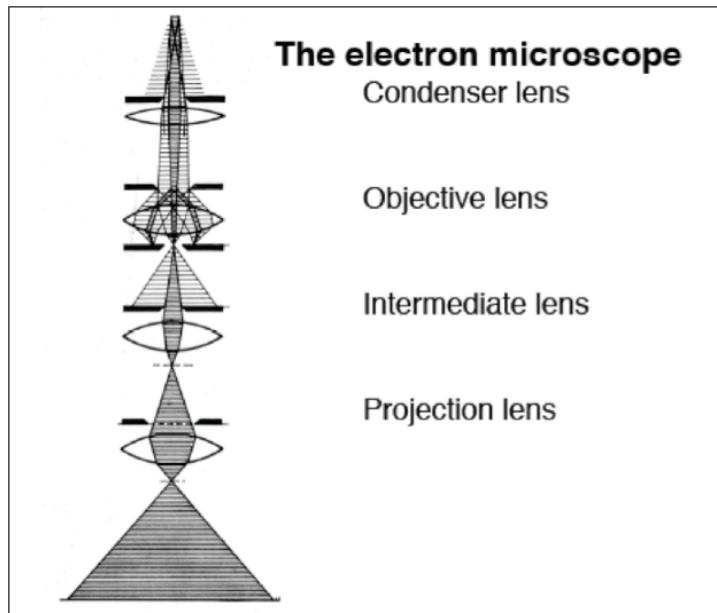
La microscopie électronique est basée sur le principe de transmission des électrons à travers un échantillon et peut permettre un grossissement de x5000000. Elle consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau d'électrons utilisé en faisceau cohérent et de visualiser soit la figure de diffraction dans le plan focal de l'objectif, soit d'utiliser une autre lentille pour obtenir la figure transformée de Fourier de la figure de diffraction observable par l'impact des électrons sur un écran fluorescent ou de l'enregistrer sur une plaque photo. La limite de résolution dépend de la longueur d'onde des électrons donc de leur tension d'accélération, de l'ordre de quelques picomètres dans un cas idéal, et de l'ordre de quelques Angstroms en réalité.

Un microscope électronique à transmission se compose :

- d'un système de pompe à vide
- d'un système de refroidissement à l'azote
- d'un canon à électrons constitué d'une source d'électrons, d'un système de focalisation et d'un accélérateur d'électrons, le tout constituant la source de rayonnement
- d'une colonne optique contenant les lentilles magnétiques et les diaphragmes permettant de focaliser le rayon d'électrons sur un échantillon extrêmement fin
- d'un porte échantillon
- d'un détecteur d'électrons (Fig. 60 et 61).



**Figure 60 :** Microscope électronique à transmission



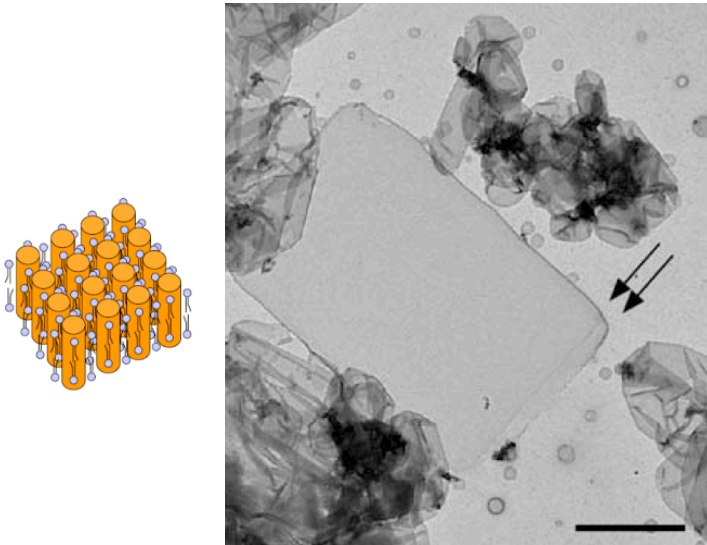
**Figure 61 :** Schéma de fonctionnement du microscope électronique à transmission

La préparation des échantillons est une phase très importante. Comme le faisceau d'électrons doit traverser l'échantillon, l'épaisseur de ce dernier doit être idéalement de quelques nanomètres. L'échantillon est adsorbé sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone fin (quelques nanomètres). Une solution contenant un agent contrastant tel que l'acétate d'uranyle est ajoutée sur la grille pendant quelques secondes puis l'excès est absorbé. Celui-ci va se fixer préférentiellement au bord des particules adsorbées. De par sa forte masse atomique, le contrastant dévie les électrons dans le diaphragme de l'objectif. Ainsi, l'échantillon paraît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative. L'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre sur les photographies.

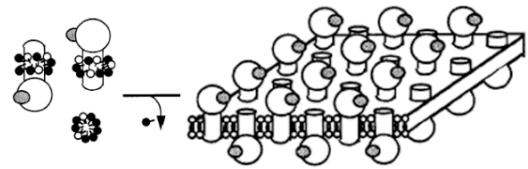
La microscopie électronique, ou plus précisément la reconstitution de protéines membranaires en cristaux 2 D résolus par microscopie électronique, peut représenter un outil alternatif et une discipline complémentaire à la cristallographie 3 D dans la détermination de leurs structures. Bien que la cristallisation en deux dimensions soit un domaine purement empirique, des progrès importants ont permis le développement et l'amélioration de nouvelles stratégies facilitant la formation de cristaux. Trois principales méthodes sont généralement utilisées pour la reconstitution en cristaux 2 D (Fig. 62 et 65) :

- la cristallisation par élimination du détergent. C'est la stratégie la plus utilisée. Elle est basée sur la méthode générale de reconstitution en protéoliposomes : l'ajout de lipides suivant un rapport massique  $m_{\text{prot}}/m_{\text{lipides}}$  voisin de 1, et l'élimination progressive du détergent (par dialyse ou par l'utilisation de Bio beads) de la solution protéique permet

la formation de bicouches lipidiques dans lesquelles la protéine s'introduit et cristallise. Ces cristaux 2 D peuvent être caractérisés par une orientation 'up and down' des protéines (Fig. 63).

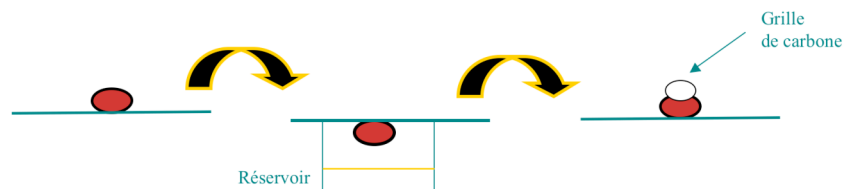


**Figure 62** : Crystallisation en deux dimensions de l'O-aquaporine. L'échelle en trait noir représente 1  $\mu\text{m}$  (Gonen, T. *et al.* 2004).

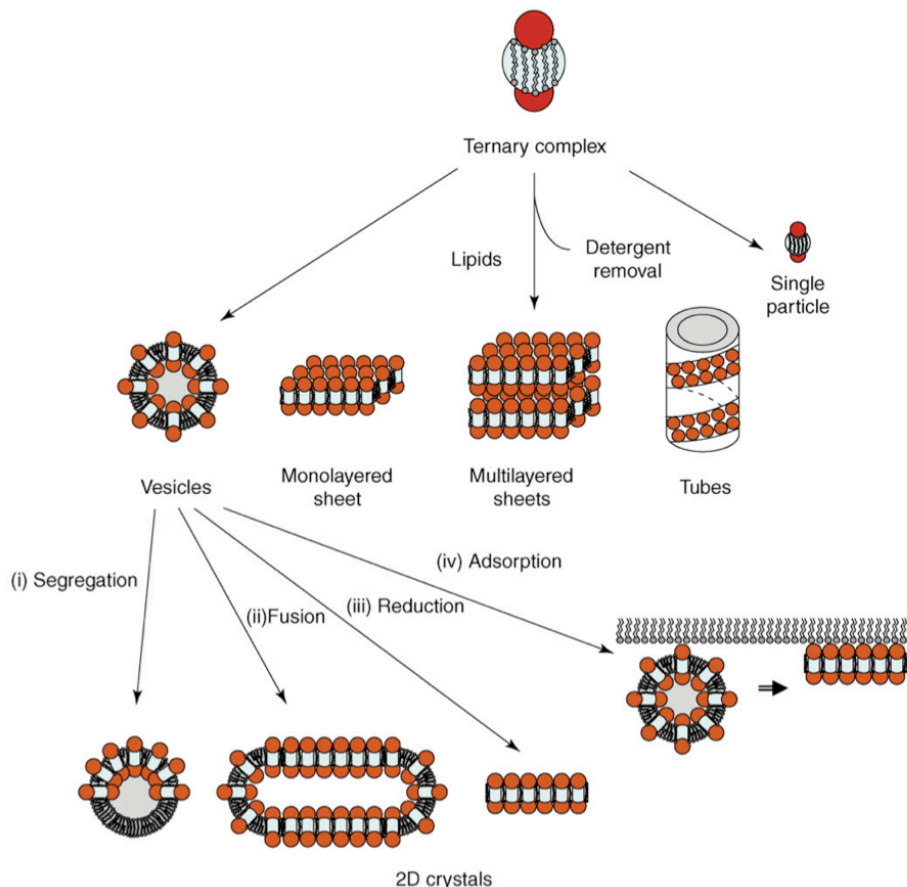


**Figure 63** : Orientation « up and down » dans les cristaux 2 D (Rigaud, J. L. 2002)

- la cristallisation sur bicouches lipidiques fonctionnalisées (Lévy, D. *et al.* 2001). Elle se base sur des interactions spécifiques entre la protéine (possédant par exemple une queue histidine) et un ligand (par exemple un lipide lié à un ion nickel). Cette méthode est peu consommatrice en matériel protéique (1  $\mu\text{g}$  par essai contre 25-50  $\mu\text{g}$  par la méthode classique) et fournit des cristaux au sein desquels les protéines ont une orientation unidirectionnelle.
- la cristallisation sur film de carbone. Les premières étapes consistent à préparer des gouttes selon la méthode de cristallisation par diffusion de vapeur en goutte suspendue (Fig. 64). Les protéines solubilisées dans la goutte diffuse à la surface et forme des couches de micelles-détergent bloquant les molécules de la couche précédente selon une orientation fixe. Une grille est alors disposée sur la goutte, les molécules adsorbées et l'échantillon peut alors être analysé par microscopie électronique.



**Figure 64** : Méthode de cristallisation sur film de carbone



**Figure 65 :** Différents cristaux 2D peuvent croître à partir de micelles ternaires en ajustant la quantité de lipides. Les cristaux 2D peuvent aussi être obtenus à partir de vésicules en forçant les interactions protéine-protéine par divers protocoles : (i) ajout d’agents cristallins permettant la ségrégation des protéines, (ii) fusion de vésicules, (iii) diminution du rapport massique lipides/protéine, ou (iv) adsorption sur monocouches de lipides (Lacapère, J-J. *et al.* 2007).

### B.3.2 Essais de reconstitution de CusA et CzcA en cristaux 2 D

Les essais de reconstitution en cristaux 2 D, ont été effectués à l’Institut Curie, à Paris, où j’ai été accueillie pendant une semaine par Jean-Louis Rigaud.

Un faible volume de solution protéique (environ 30 µg de protéine dans 30 µL) sont agités, pendant deux heures en présence de lipides ( $0,25 < \text{rapport massique lipides/protéine} < 1$ ), puis pendant 2 fois 1 heure en présence de Biobeads (5 mg - deux ajouts espacés d’une heure).

Les échantillons sont alors préparés comme décrit plus haut. Plusieurs grilles sont disposées sur une lame de verre, face carbonée vers le haut, puis passées au ‘Glow-discharge’, appareil permettant, sous vide, de charger les grilles de carbone négativement pour faciliter la l’adsorption des protéines membranaires sur la grille de carbone. Une goutte de solution protéique (CusA ou CzcA, purifiées en DDM 0,05 % ou fos-choline 14 (FC14) 0,025 %, en

tampon Tris-HCl 50 mM NaCl 200 mM) est déposée sur une grille (5  $\mu$ L) puis séchée délicatement avec un papier filtre. De la même façon, une goutte de colorant (1 % d'acétate d'uranyle filtré sur membrane 0,2  $\mu$ m) est ajoutée et séchée, étape répétée trois fois.

Des échantillons de CusA purifiée en DDM 0,05% ou FC14 0,025% et CzcA purifiée en DDM 0.05%, et reconstitués en présence de lipides d'*E. coli*, sont préparés et analysés en particules isolées. Concernant le rapport lipides/protéine (w/w), plusieurs ratios sont explorés : 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2. Plusieurs clichés de MET sont pris en fonction du temps. Plusieurs autres types de lipides sont également testés : DMPC, DMPC/DMPG 9/1, DMPC/DMPE 5/5, EPC, EPC/EPE 9/1, lipides de levure, asolectine.

Les essais de reconstitution en cristaux 2 D ont nécessité l'exploration de différents paramètres. Tout d'abord, l'influence de la température (température ambiante et 4°C) et de la présence ou non de glycérol (10 %) est étudiée sur des échantillons protéiques de CusA et CzcA purifiées en DDM 0,05 % et reconstituées en présence de lipides d'*E. coli* 0,75 (rapport massique), le détergent étant éliminé par Biobeads.

Des tests de reconstitution ont été également effectués sur des échantillons de CusA purifiée en DDM 0,05 % ou FC14 0,025 %, et reconstituées en présence de lipides d'*E. coli* (0,5 et 0,75 (rapports massiques)), en éliminant le détergent par dialyse (élimination plus lente). Plusieurs clichés de MET sont pris jusqu'à 10 jours de dialyse.

Les échantillons de protéine ont été analysés par microscopie électronique à transmission à l'aide d'un microscope Philips E208. Les photos ont été prises sur un microscope Philips CM120.

## **B.4 Reconstitution en protéoliposomes et mesure d'activité**

### **B.4.1 Principe**

La reconstitution d'une protéine membranaire en protéoliposomes est une méthode visant à introduire la protéine dans des membranes lipidiques formant des vésicules. La protéine se trouve alors dans une structure proche de son environnement natif où il est possible d'étudier son activité. Dans notre cas, les tests d'activité se sont basés sur la fonction de transporteur de Zn<sup>2+</sup> de CzcA.

### B.4.2 Protocole expérimental

La reconstitution en protéoliposomes et les tests d'activité ont été effectués sur la protéine CzcA dont le transport des ions  $Zn^{2+}$  est plus facile à mettre en œuvre que le transport des ions  $Cu^+$  chez CusA, en évitant de manipuler en boîte à gants. La purification, la reconstitution et les tests d'activité ont été menés à l'institut de microbiologie, de l'Université de Halle, en Allemagne. J'y ai été accueillie pendant deux semaines par le Professeur D.H. Nies.

La protéine CzcA est purifiée comme décrit précédemment, en DDM, juste avant la reconstitution en protéoliposomes.

#### *\* Préparation des protéoliposomes de CzcA*

15  $\mu$ g de lipides (lipides polaires d'*E. coli*) sont ajoutés dans 300  $\mu$ L de tampon I (BisTris-HCl 20 mM pH = 6,8) avec trois petites billes dans un ballon de 250 mL. L'ensemble est soumis à ultra sons dans un bain à 40°C pendant 15 minutes, agité avec un vortex puis soumis à nouveau aux ultra sons pendant 10 minutes. 200  $\mu$ L d'octylglucoside 5 % sont ajoutés afin de faciliter l'insertion de la protéine dans les membranes lipidiques. 0,5 mg de CzcA sont agités quelques minutes en présence de 60  $\mu$ L d'octylglycoside 5 % avant de les ajouter à la solution lipidique. Le détergent est éliminé par chromatographie (colonne : Amberlite XAD16, équilibrée en tampon I, débit : 0,5 mL/min). Les protéoliposomes sont récupérés en sortie de colonne et centrifugés à 40000 rpm pendant 1h30 à 4°C. Les protéoliposomes sont ainsi lavés et concentrés. Le culot est resolubilisé dans 600  $\mu$ L de tampon I et 40  $\mu$ L du fluorophore NG 2 mM dans le DMSO (New Port Green DCF) puis introduit dans un extrudeur (LiposoFast<sup>TM</sup> (Avestin)). Une membrane (200 nm) est disposée, entre les deux seringues de l'extrudeur, au centre du système. Ce dernier permet, par une dizaine d'allers et retours, d'obtenir des protéoliposomes de taille homogène en cassant ceux dont la taille dépasse 200 nm. Les protéoliposomes obtenus sont purifiés par gravité sur colonne (Sephadex G-25 équilibrée en tampon II : Tris-HCl 70 mM pH = 7.8) permettant de les séparer des autres molécules telles que les lipides, les molécules de protéine, les petits protéoliposomes... Les deuxième, troisième, et quatrième fractions de 1 mL sont collectées, rassemblées et centrifugées à 40000 rpm pendant 1 h 30 à 4°C. Le culot est resuspendu dans 200  $\mu$ L de tampon II et gardé au froid et à l'abri de la lumière.

*\* Tests d'activité par fluorescence*

Les tests ont été menés sur un spectrofluorimètre SFM25 à 25°C. 30 µL de protéoliposomes dans 960 µL de tampon II sont utilisés pour définir une ligne de base. A une solution constituée de 960 µL de tampon II et 20 µL de protéoliposomes fraîchement préparés, sont ajoutés rapidement 10 µL de zinc(II) à une concentration connue (0,6, 0,8, 0,9, 1, 2, 4, 6, 8, 9 mM soit une concentration finale de 6 à 90 µM). L'ajout de NaOH 0,1 M (10 µL) permet de vérifier l'activité d'antiport proton-cation de CzcA. Les spectres sont enregistrés tout de suite après l'ajout de zinc.

## **B.5 Cristallogénèse**

Les essais de cristallogénèse de CusA ont été effectués au robot (goutte assise), à une concentration protéique de 8 mg/mL, en utilisant les kits Hampton disponibles à l'IBS (comme les kits Crystal Screen Peg-ion, Crystal Screen MembFac...).



# *La protéine CopH*



## Résultats

L'étude de la protéine CopH a fait l'objet de mon second projet de thèse. Comme décrit en introduction, le gène *copH* fait partie du cluster *cop*, composé de 19 ORFs, et transcrit, à la suite d'un stress cuivre, par la souche bactérienne *C. metallidurans* CH34. L'analyse de la nature du cluster *cop* et de la séquence du gène *copH* nous ont permis d'appréhender la protéine CopH comme une protéine a priori périplasmique, impliquée dans l'homéostasie du cuivre et dans le phénomène de résistance de la souche *C. metallidurans* CH34 à ce métal.

Ce second projet a débuté sur un terrain vierge de toute expérience dans le domaine des protéines à cuivre au sein du laboratoire et de toute information bibliographique concernant les protéines du cluster *cop*. Le cluster *cop* ayant été récemment découvert et étudié par transcriptomique (Monchy, S. *et al.* 2006), très peu de protéines codées par les gènes de ce cluster n'ont encore été étudiées. Seule l'étude de la protéine CopK a commencé par les travaux de Jacques Covès et Beate Bersch à l'IBS.

Les travaux de caractérisation de la protéine CopH se sont étalés sur un peu plus d'un an. Les travaux préliminaires concernant CopH ont été décrits dans un premier article publié en mars 2006 dans *Biochemistry* (Sendra, V. *et al.* 2006). La caractérisation plus approfondie de la protéine s'est avérée plus délicate, comme une histoire pleine de rebondissements que j'ai d'ailleurs choisi de vous présenter sous cet angle. Les derniers résultats de cette caractérisation font d'autre part l'objet d'un prochain article en préparation.

Nous nous sommes ainsi appliqués à étudier la protéine CopH, en particulier la nature de ses interactions avec le cuivre, afin de vérifier la spécificité métallique de la protéine et chercher à déterminer la stoechiométrie, la nature des ligands, la géométrie du site métallique, l'affinité relative à ces interactions... Connaître la force de l'interaction entre la protéine CopH et le cuivre constitue en effet un élément de base à la compréhension des mécanismes de transferts des métaux *in vivo*. Cette information est par ailleurs essentielle afin de nous aiguiller vers une ou plusieurs hypothèses solides quant à la fonction de la protéine, toujours inconnue à ce jour.

## I – La protéine CopH : étude préliminaire

### 1.1 Surexpression et purification de CopH

La construction du plasmide d'expression a été réalisée par clonage du gène *copH*, à partir de l'ADN génomique de *C. metallidurans* CH34, dans le vecteur d'expression pET-28a. Une première construction a d'abord été conçue en prenant en compte la séquence codante du gène *copH* dans sa totalité. La protéine correspondante a été surexprimée dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli* après une induction de 4 heures à 37°C, par 250 µM d'IPTG. Le gel obtenu alors par électrophorèse SDS-PAGE nous a révélé la surproduction d'une protéine de masse légèrement plus faible que celle attendue (13201 Da). Afin d'éclaircir cette observation, nous nous sommes tournés vers les différents outils de protéomique disponibles sur ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>). Ils nous ont permis de prédire les modifications subies par la protéine après l'étape de traduction. Un site de clivage potentiel séparant la séquence d'un peptide signal de la séquence propre de la protéine a été identifié entre la sérine 26 et l'alanine 27, suggérant que CopH est une protéine périplasmique (Fig. 66).

---

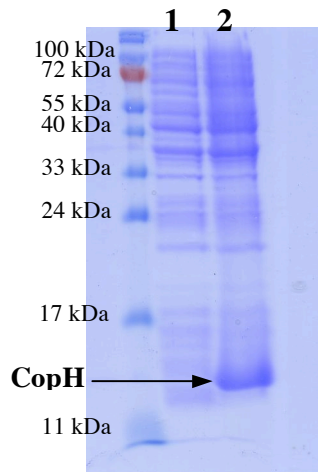
MTSQKPSIASFMLGVAALLATSVAWSADKLESTNPAGWSQQAQIQVAAQHDHGARAG  
LSSLSAIKPGPEASLFGSEAPAGSTSRVVDVAPGLKYVNVDSGETVTFKSGASEITFAFAQ  
LDRNKAVALNVLPPELPGGQGVWVYIEQSELYIGG

---

**Figure 66** : Séquence de la protéine CopH dans sa totalité. La séquence du peptide signal est écrite en bleu.

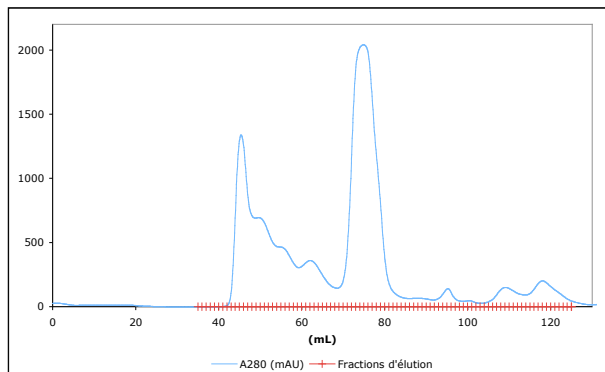
---

En conséquence, pour obtenir une expression cytoplasmique de la protéine, permettant d'augmenter le taux de surexpression de la protéine et de faciliter ensuite les étapes d'extraction et de purification, nous avons effectué une nouvelle construction du plasmide d'expression, permettant la surproduction cytoplasmique de CopH. Dans ce cas, la surexpression est optimale après une induction de 20 heures à 20°C. Le séquençage N-terminal nous a fourni la séquence ADKLEST, correspondant exactement à celle débutant juste après le site de coupure. La protéine est donc surexprimée dans le cytoplasme sous sa forme maturée. Elle est obtenue avec un excellent rendement, dans la fraction soluble (environ 25 à 30 % des protéines solubles totales) (Fig. 67).

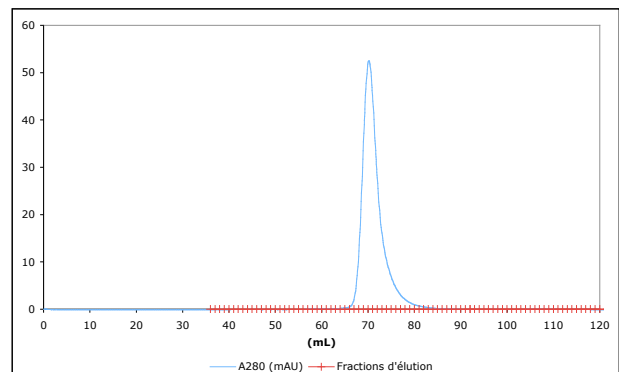


**Figure 67 :** Gel (15%) SDS-PAGE de surexpression de CopH. (1) avant induction ; (2) après induction.

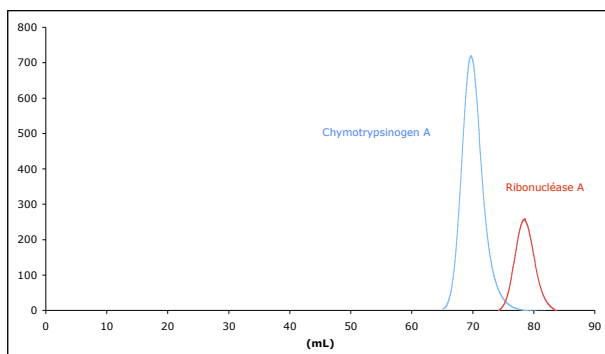
L'excellente surexpression de CopH ainsi que sa solubilité nous ont alors permis de mettre au point un protocole de purification simple et rapide, réalisé en deux étapes. Les extraits solubles sont d'abord précipités au sulfate d'ammonium (saturation finale de 50 %). Cette première étape s'avère très efficace en termes de purification. CopH est contenue, à ce stade, dans le culot obtenu après centrifugation. Elle est ensuite purifiée par filtration sur gel sur colonne préparative Superdex-75 (Fig. 68). Le contenu des différents pics est analysé par électrophorèse SDS-PAGE. Le rendement final est d'environ 150 mg de protéine CopH par litre de culture.



**Figure 68 :** Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel (colonne Superdex-75) du précipité au sulfate d'ammonium ( $V_{\text{élution}} = 68-80$  mL)



**Figure 69 :** Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de la protéine CopH après purification. ( $V_{\text{élution}} = 69,5$  mL)



**Figure 70 :** Chromatogrammes ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) du chymotrypsinogène A ( $V_{\text{élution}} = 69,7$  mL) et de la ribonucléase A ( $V_{\text{élution}} = 78,7$  mL)

Afin de déterminer l'homogénéité et l'état oligomérique de CopH, la protéine pure a été chargée sur une colonne analytique Superdex-75 calibrée (Fig. 69). Son volume d'élution a en particulier été comparé à celui du chymotrypsinogène A (25 kDa) et à celui de la ribonucléase A (13,7 kDa). CopH et le chymotrypsinogène A sont élués au même volume (69,5 mL), tandis que la ribonucléase A est élue à 78,7 mL (Fig. 70). CopH ayant une masse moléculaire théorique de 13201,67 Da, *nous pouvons penser que la protéine est un dimère en solution.*

Une première approche de la stabilité de CopH, contrôlée par électrophorèse SDS-PAGE, a révélé la faible sensibilité de la protéine aux protéases et à la température. En effet, la purification, effectuée sans antiprotéases, fournit la protéine en même quantité et avec la même qualité. La protéine reste stable une semaine à 4°C. L'analyse par séquençage N-terminal confirme ce résultat. CopH reste d'autre part stable plusieurs heures (au moins 6 heures) à 30°C. L'étude de la protéine, par RMN, va également dans le même sens.

Détenant, à ce stade, la protéine CopH, pure et soluble, nous nous sommes tournés vers différentes méthodes physicochimiques pour caractériser la protéine et étudier sa capacité à lier les métaux.

## 1.2 Capacité de CopH à lier les métaux

### 1.2.1 Discrimination des différents métaux par chromatographie d'affinité

Le gène *copH* se situant au sein du cluster *cop*, il est raisonnable de penser que la protéine correspondante possède des propriétés lui permettant d'interagir avec certains métaux, en particulier avec le cuivre. La capacité de CopH à lier les métaux divalents a d'abord été explorée par chromatographie d'affinité. La protéine a ainsi été déposée sur colonne HiTrap™ Chelating HP (1 mL) chargée au préalable en ions Cu(II), Zn(II), ou Ni(II). Elle a ensuite été éluée en tampon Hepes-EDTA, après s'être fixée au métal. Sur colonne de cobalt, en revanche, aucune liaison n'a été observée. Une autre protéine, CopK (Tricot, C. *et al.* 2005), dont les propriétés de liaison aux métaux ont été étudiées au laboratoire, a été utilisée afin de contrôler ce résultat. Nous savons que CopK se lie spécifiquement au cuivre. Comme attendu, la protéine s'est fixée exclusivement sur colonne de cuivre et a été éluée en EDTA.

***Ceci suggère fortement que CopH est une protéine liant les métaux.***

Nous avons alors étudié la séquence de la protéine afin de déterminer les ligands potentiels des ions métalliques. La figure 71 montre que CopH ne possède ni cystéine, ni méthionine mais seulement deux histidines, en positions 24 et 26, et plusieurs carboxylates, susceptibles de jouer le rôle de ligands métalliques.

---

1 ADKLESTNPA GWSQQAQIQV AAQH**HD**HGARA GLSSLSAIKP GPEASLFGSE 50  
61 APAGSTSRVV DVAPGLKYVN VDSGETVTFK SGASEITFAF AQLDRNKAVA 100  
101 LNVLPPELPG GQGVVYIEQ SELYIGG 127

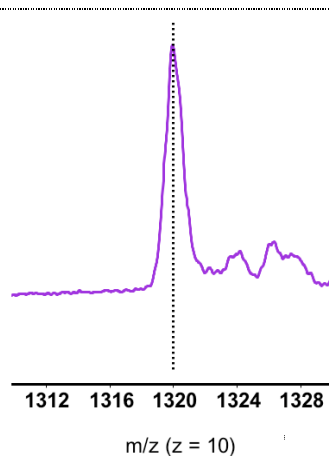
---

**Figure 71** : Séquence de la protéine CopH après maturation. Les deux **histidines** en positions 24 et 26, ligands potentiels du cuivre, sont écrites en **rouge**.

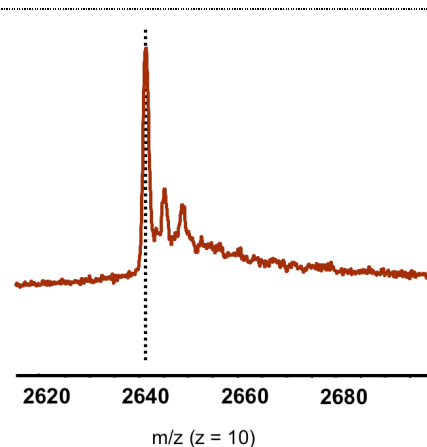
---

### 1.2.2 Analyse par spectrométrie de masse

Nous avons ensuite utilisé la spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes afin d'analyser plus précisément les capacités de la protéine à lier les ions métalliques. Pour cela, CopH, diluée à 10  $\mu\text{M}$  (concentration calculée en protéine dimérique) dans l'acétate d'ammonium 50 mM, a été mise en présence de quantités croissantes de différents ions métalliques ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ) avant analyse. Deux premiers résultats ont pu être mis en évidence à partir de ces expériences. La spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes permettant la détection des formes oligomériques de la protéine au cours du même enregistrement, nous avons pu détecter la forme native dimérique de CopH, ainsi que sa forme monomérique (Fig. 72 et 73), ce qui permet de confirmer **la structure dimérique de la protéine**. De là, nous pouvons également affirmer que **les deux sous-unités ne sont pas liées de façon covalente**. D'autre part, la masse moléculaire déterminée expérimentalement correspond exactement à la masse attendue pour l'apoprotéine dimérique (protéine sans métal), soit 26404 Da. Ceci révèle que **la protéine ne contient pas de traces d'éléments métalliques**.

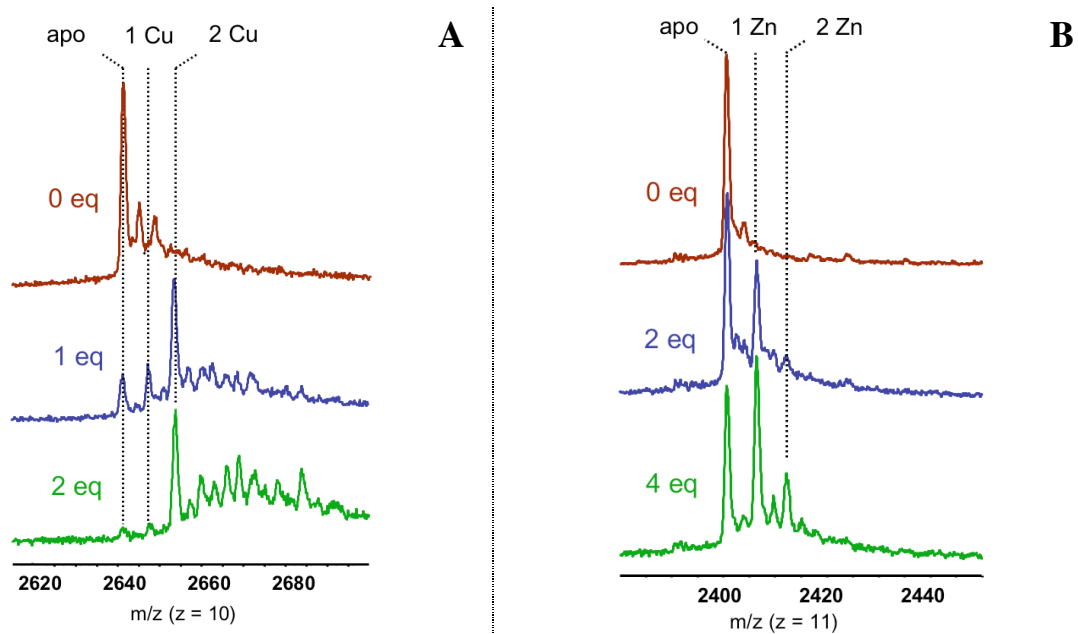


**Figure 72** : Pic caractéristique de la forme monomérique de CopH pour un état de charge  $z = 10$  (spectre de masse en conditions non dénaturantes)



**Figure 73** : Pic caractéristique de la forme dimérique de CopH pour un état de charge  $z = 10$  (spectre de masse en conditions non dénaturantes)

Nous avons continué à exploiter ces expériences pour étudier l'évolution du spectre de masse de la protéine en fonction de la quantité de cuivre en présence. La figure 74A montre d'abord le spectre de masse des ions correspondant à l'apoprotéine CopH dimérique pour un rapport  $m/z = 2641$  avec  $z = 10$ .



**Figure 74** : Titrages de CopH par  $\text{CuCl}_2$  et  $\text{ZnCl}_2$  contrôlés par ES-MS en conditions non dénaturantes. Seule la zone du spectre correspondant au dimère est représentée. Dans le cas de  $\text{CuCl}_2$  (A), l'état de charge est  $z = 10$ . Dans le cas de  $\text{ZnCl}_2$  (B), l'état de charge est  $z = 11$ . Les pics correspondant à l'apoprotéine et aux formes liant 1 et 2 équivalents de métal sont indiqués. Les conditions expérimentales sont décrites dans 'Matériels et Méthodes'.

Après l'ajout d'un équivalent de cuivre (soit  $10 \mu\text{M CuCl}_2$ ), deux pics supplémentaires apparaissent, caractérisés par une différence de rapport  $m/z$  d'environ 6 ou 12, par rapport à la masse de CopH native, pour l'état de charge  $z = 10$ . Sachant que la masse molaire du cuivre est de  $63,5 \text{ g.mol}^{-1}$ , il est facile de conclure que les pics observés correspondent exactement à l'ajout d'un ou deux atomes de cuivre, respectivement, sur le dimère CopH. De façon concomitante, la proportion de protéine sans métal décroît considérablement, et la conversion complète en protéine métallée est observée pour 2 équivalents de cuivre ajoutés (soit  $20 \mu\text{M CuCl}_2$ ). Dans ces conditions, les pics définissant l'apoprotéine et la protéine liant un atome de cuivre sont quasi inexistantes. Le pic correspondant à la liaison de deux ions cuivre est très majoritaire (Fig. 74).

Comme décrit précédemment, bien que les expériences aient été réalisées en conditions non dénaturantes, il est possible de repérer sur les spectres les pics correspondants à la forme monomérique. La liaison du cuivre est ainsi également observée pour la forme monomérique, avec des résultats similaires : après l'ajout de 0,2 équivalent de cuivre, un autre pic apparaît à



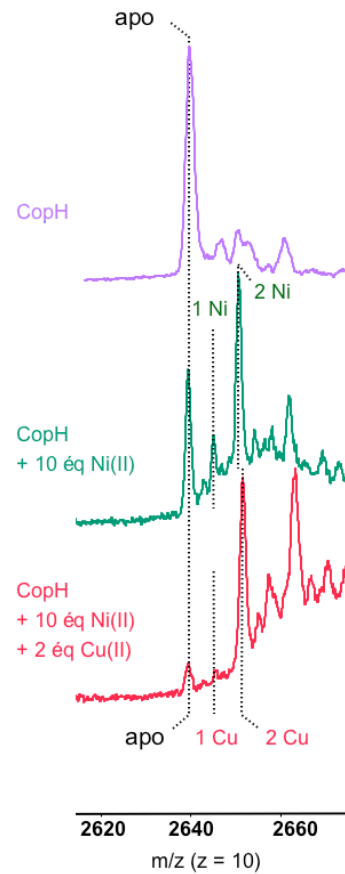
côté de celui définissant l'apoprotéine monomérique (Fig. 72). Pour des ajouts de cuivre supplémentaires, la proportion de protéine liant un ion cuivre croît jusqu'à la complète conversion observée pour 2 équivalents, ce qui correspond à un ion cuivre par sous-unité protéique. Chaque sous-unité contient donc son propre site métallique.

***Ces résultats laissent penser que CopH contient deux sites de liaison du cuivre distincts, un par monomère, non localisés à l'interface du dimère.***

Le même type de spectres a été enregistré afin de comparer la liaison d'autres ions métalliques (zinc et nickel) sur la protéine. La figure 74B montre les spectres de masse enregistrés après ajouts de différents équivalents molaires de  $ZnCl_2$ . Un, puis deux pics supplémentaires apparaissent après addition de 2, puis 4 équivalents de zinc, respectivement. Ils se caractérisent par une différence de rapport  $m/z$  d'environ 6 ou 12 par rapport au pic représentant la protéine CopH. Nous pouvons appliquer le même raisonnement que précédemment : en tenant compte de la masse molaire du zinc ( $65 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et de l'état de charge  $z = 11$ , il est clair que le premier pic définit la protéine apo ( $m = 2400 \times 11 = 26400 \text{ Da}$ ). Le second pic correspond à la liaison d'un atome de zinc ( $m = 2406 \times 11 = 26400 + 2 \times 65$ ), puis le troisième à la liaison de deux atomes de zinc ( $m = 2412 \times 12 = 26400 + 4 \times 65$ ). D'autre part, même en présence de 4 équivalents de zinc, les spectres révèlent que la solution protéique contient toujours un mélange d'apoprotéine, de protéine liant un ion zinc, et de protéine liant deux ions zinc. Le même type d'expériences a été effectué avec  $NiCl_2$  : des spectres similaires à ceux enregistrés en présence de zinc ont été obtenus. ***Ceci suggère une différence significative entre les constantes de dissociation du cuivre, du zinc, et du nickel pour la protéine CopH.***

Une compétition entre les différents ions a alors été mise en oeuvre afin d'asseoir définitivement cette idée. CopH, chargée tout d'abord en nickel, par ajout de 10 équivalents de NiCl<sub>2</sub>, est mise en présence de 2 équivalents de cuivre. Le spectre de masse enregistré montre seulement les pics caractéristiques de la protéine CopH liant le cuivre (Fig. 75). Les ions cuivre prennent ainsi la place des ions nickel au sein de la protéine.

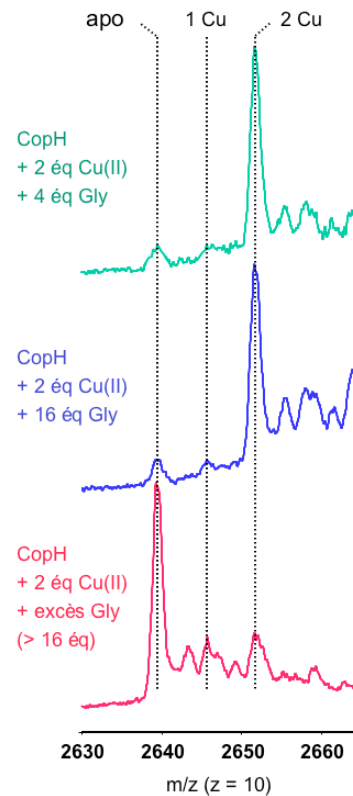
***Il est donc net que, parmi tous les métaux testés, CopH possède une grande affinité pour le cuivre par rapport aux autres métaux testés.***



**Figure 75 :** Compétition entre les ions Ni<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup> pour la protéine CopH, contrôlée par ES-MS en conditions non dénaturantes. Seule la région du spectre correspondant au dimère est représentée.

L'observation des pics définissant la forme monomérique montre que cette dernière est également capable de lier le zinc et le nickel. Ce comportement similaire des formes monomérique et dimérique pour les ions Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> et Ni<sup>2+</sup> suggère que ces ions se fixent au niveau du même site de liaison au sein de la protéine.

Une dernière expérience - compétition entre la glycine et CopH pour le cuivre - a été effectuée afin d'estimer la valeur de la constante d'association de la liaison CopH-Cu par rapport à celle de la liaison glycine-Cu. Pour cela, il est à noter que deux résidus glycine sont nécessaires pour lier un atome de cuivre avec une constante de dissociation d'environ 500 nM à pH = 7.5 (Dawson, R. M. C. *et al.* 1986). Cependant, dans notre cas, la glycine ajoutée en excès (16 équivalents) à une solution protéique de CopH métallée en cuivre n'est pas en mesure d'entrer en compétition avec la protéine. Il faut ajouter un large excès, supérieur à 16 équivalents de glycine, pour observer la diminution du pic définissant la protéine CopH liant 2 ions Cu(II) (Fig. 76).



**Figure 76** : Compétition de CopH et de la glycine pour les ions Cu(II), contrôlée par ES-MS en conditions non dénaturantes. Seule la région du spectre correspondant au dimère est représenté.

***La constante de dissociation de CopH pour le cuivre est donc significativement plus faible que 500 nM.***

Les premières études visant à caractériser CopH en tant que métalloprotéine se sont révélées riches en informations. Nous savons que CopH, protéine dimérique, est capable de lier plusieurs ions métalliques divalents comme la cuivre, le nickel ou le zinc, tout en possédant une affinité nettement plus grande pour le cuivre, affinité estimée inférieure à 500 nM. La protéine posséderait deux sites de liaison du Cu(II) non localisés à l'interface du dimère. A partir de là, nous avons cherché à approfondir les propriétés de liaison CopH-Cu.

### 1.3 Propriétés de la liaison CopH-Cu : approches physicochimiques et structurales

#### 1.3.1 La spectroscopie UV-visible

Tout d'abord, il est facile de remarquer que la solution protéique de CopH additionnée de cuivre devient instantanément bleue. Les changements correspondants, en termes de caractéristiques spectrales, ont été analysés entre 300 et 900 nm, en fonction de quantités croissantes de cuivre ajoutées à la protéine en tampon Hepes. Les spectres sont représentés sur la figure 12. Une bande d'absorbance apparaît tout d'abord à 610 nm. Elle augmente ensuite de façon linéaire jusqu'à 2 équivalents de cuivre (Fig. 77 - pointillés rouges) par rapport à la quantité de protéine CopH (protéine dimérique). Pour des ajouts de cuivre supplémentaires, l'absorbance continue à augmenter, les bandes d'absorbance étant toutefois décalées vers les longueurs d'onde plus grandes. De là, nous pouvons penser que **la protéine lierait d'abord deux ions cuivre**. Le cuivre supplémentaire ajouté se fixerait ensuite probablement de façon non spécifique à la protéine, formant ainsi au moins une nouvelle espèce, responsable du déplacement bathochromique observé. D'autre part, à partir du spectre de la protéine en présence de 2 équivalents de cuivre, nous pouvons déduire un coefficient d'extinction molaire assez faible de  $150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 610 nm, pour la protéine dimérique, caractéristique d'une transition électronique entre orbitales d (transition d-d) d'un **ion cuivre de type II** (Solomon, E. I. *et al.* 2004) (voir le chapitre « Introduction ») (Fig. 78).

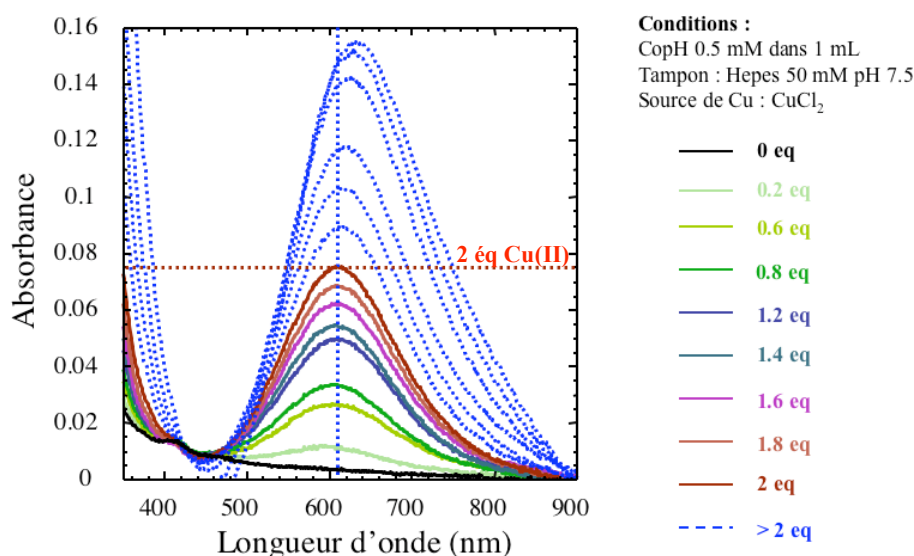


Figure 77 : Spectres UV-visible obtenus par titrage de CopH par des quantités croissantes de CuCl<sub>2</sub>.

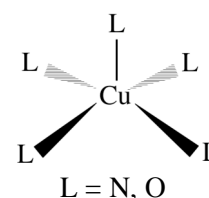
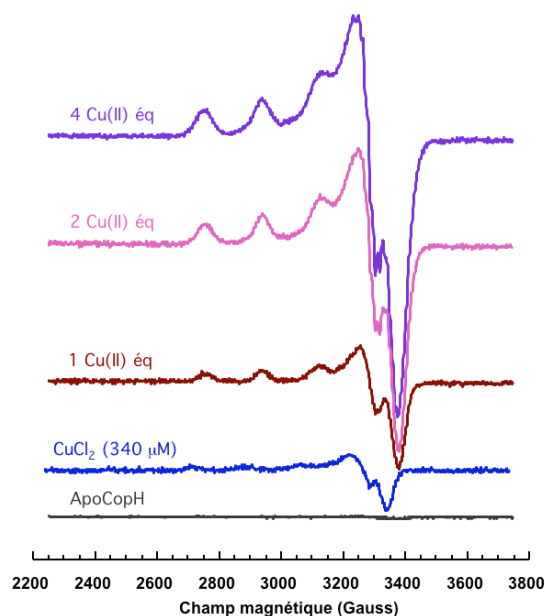


Figure 78 : Représentation d'un ion cuivre de type II

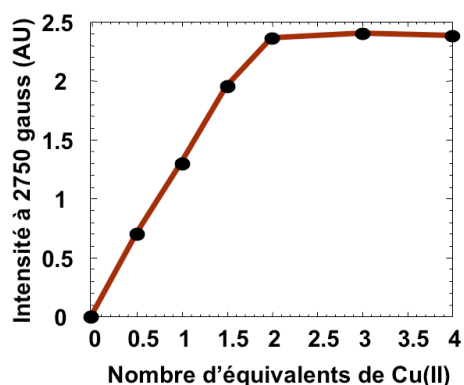
### 1.3.2 Caractérisation du site de liaison des ions Cu(II) par RPE

Les mesures RPE (bande X) nous ont permis de confirmer la stoechiométrie de liaison des ions Cu(II) ainsi que la caractérisation de la liaison du cuivre à la protéine et la géométrie des sites de liaison.



**Figure 79** : Analyse RPE de la liaison CopH-Cu.  $\text{CuCl}_2$  est ajouté à une solution de CopH 170  $\mu\text{M}$  en tampon Hepes 50 mM. Les spectres de l'apoprotéine CopH et du chlorure de cuivre seul à une concentration correspondant à 2 équivalents de Cu(II) ont également été enregistrés en tant que contrôles. ( $T = 20 \text{ K}$ ,  $P = 0,101 \text{ mW}$ ,  $\nu = 100 \text{ kHz}$ , modulation d'amplitude : 10 G)

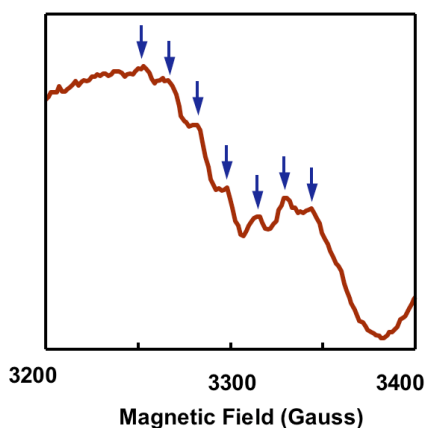
La protéine CopH pure ne possède aucun signal RPE (spectre noir) (Fig. 79), confirmant que la protéine se trouve sous sa forme apo. CopH a ensuite été titrée par des quantités croissantes de  $\text{CuCl}_2$ . L'intensité du signal augmente en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajouté. Le spectre RPE du cuivre libre, à une concentration de 340  $\mu\text{M}$  correspondant à 2 équivalents par rapport à la concentration en protéine, a également été enregistré comme contrôle (spectre bleu). Les ions Cu(II) dans l'Hepes fournissent un très léger signal, les raies sont larges, en comparaison des ions Cu(II) liés à la protéine. Il est par conséquent aisé de distinguer les ions liés à CopH des ions libres dans le tampon, phénomène très utile au cours du titrage de la protéine par le cuivre. Les caractéristiques spectrales ont été extraites du spectre obtenu pour 2 équivalents de cuivre ajoutés. *Les paramètres RPE du signal ( $g_{\parallel} = 2,231$  ;  $g_{\perp} = 2,055$  ; constante de couplage hyperfin  $a = 555 \text{ MHz}$ ) sont compatibles avec le modèle d'un ion cuivre de type II, se situant au sein d'une géométrie plan-carré, avec une sphère de coordination constituée d'atomes d'oxygène ou d'azote.*



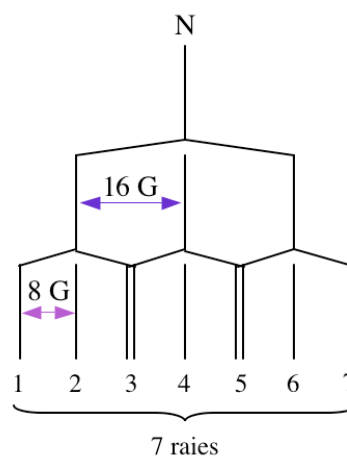
**Figure 80** : Double intégration de la résonance à bas champ (2750 G) en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajoutés à la protéine CopH. L'intensité du signal augmente linéairement jusqu'à 2 équivalents de cuivre.

D'autre part, l'observation de la région  $g_{\perp}$  montre une structure super-hyperfine complexe (Fig. 81), constituée au minimum de 7 transitions. Ces raies révèlent l'interaction du spin du cuivre avec des noyaux (voir « Matériels et Méthodes »). A ce stade de l'étude, une hypothèse de travail (utilisée dans l'article Sendra, V. *et al.* 2006) s'est construite en pensant que cette structure serait due à l'interaction du spin du cuivre avec les spin de deux atomes d'azote ( $I = 1$ ) (Fig. 82). En effet, plusieurs paramètres concourent, de façon complémentaire, à l'implication de deux azotes en interaction avec le cuivre : le nombre de raies décomptées ( $N = 7$ ), les valeurs des constantes de couplage hyperfines apparentes calculées (constante de couplage isotrope  $a_1 = 16$  G et constante de couplage anisotrope  $a_2 = 8$  G).

Afin d'estimer la stoechiométrie de la fixation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  sur la protéine, la double intégration de la résonance à bas champ (2750 G) a été tracée en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajouté au cours du titrage. La figure 80 montre que *l'intensité du signal augmente linéairement jusqu'à 2 équivalents de cuivre par dimère*. Des ajouts supplémentaires de métal ne résultent qu'en la formation d'un plateau. Ce résultat confirme la stoechiométrie de liaison CopH-Cu obtenue par spectrométrie de masse et spectroscopie UV-visible.



**Figure 81** : Structure hyperfine de la bande à haut champ. Sept résonances sont a priori visibles.



**Figure 82** : Schéma représentant les raies de l'azote par couplage isotrope de 16 G et couplage anisotrope de 8 G avec le cuivre.

*A partir de ces données, nous avons alors pensé que les deux résidus histidine en position 24 et 26 (seuls résidus azotés susceptibles de jouer le rôle de ligands du cuivre a priori) étaient impliqués dans la liaison du cuivre, suivant une coordination distincte en termes de distance Cu-N et/ou d'orientation du plan du cycle imidazole des histidines.*

Nous nous sommes alors tournés vers la résonance plasmonique de surface (Biacore) pour étudier l'association de la protéine au métal, et discriminer, en fonction du pH, les ligands potentiels du cuivre au sein de la protéine.

### 1.3.3 La résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (RPS) a été utilisée pour éclaircir les propriétés de liaison CopH-Cu. Cependant, toutes les expériences ont été effectuées avec NiCl<sub>2</sub>, métal recommandé par le fournisseur afin d'obtenir la meilleure interaction avec la membrane NTA. En effet, il est impossible de saturer la surface en cuivre de manière reproductible, plusieurs injections d'une même quantité de cuivre ne fournissant pas la même valeur de résonance. D'autre part, le signal est extrêmement instable. Il n'est alors pas possible d'obtenir des données fiables.

La figure 83 montre l'association de la protéine sur la surface Ni-NTA en fonction du pH.

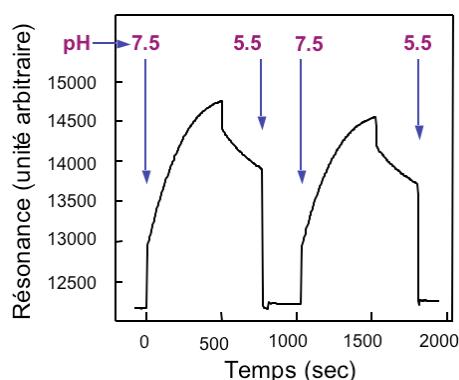


Figure 83 : Influence du pH sur la fixation de CopH à la surface Ni-NTA.

La phase d'association observée à pH = 7,5 confirme que CopH se lie aux ions Ni<sup>2+</sup>. Durant la phase de dissociation, le pH est ajusté à 5,5 en remplaçant le tampon Hepes par du MES tamponné à ce pH. CopH se dissocie alors immédiatement et complètement. Après

équilibration de la surface à pH = 7,5, CopH s'y associe de nouveau. Ceci démontre que la surface n'a pas été affectée par le changement de pH et que la dissociation de la protéine n'est pas due à celle du nickel.

**Le  $pK_a$  d'une histidine libre étant voisin de 6,05 (Dawson, R. M. C. et al. 1986), ce résultat laisse raisonnablement penser :**

**\* à la protonation des histidines à bas pH, provoquant alors la dissociation de la protéine**

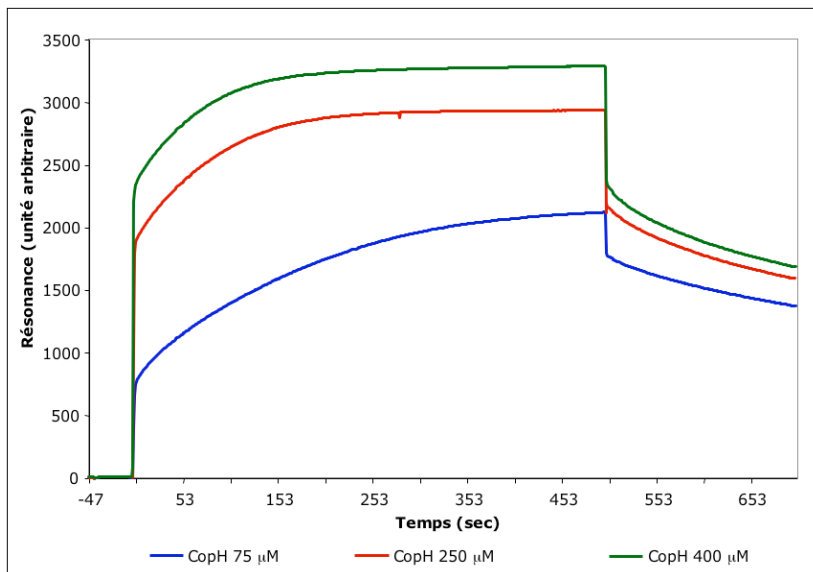
**\* et donc à l'implication de ces deux résidus dans la liaison au cuivre.**

Un titrage entre pH 7,5 et 5,5 a été réalisé pour affiner la valeur du pH menant à la dissociation de CopH. Ce phénomène, mis en évidence en injectant les tampons Hepes (pH = 7,5 – 7,0), Pipes (pH = 6,8 – 6,1) ou MES (pH = 6,0 – 5,5), commence dès pH = 6,5 et est quasi complet à pH = 5,8. La dissociation de la protéine étant provoquée par une gamme relativement large en pH, nous pouvons suggérer que les deux histidines 24 et 26 sont impliquées dans la liaison au cuivre, **chacune étant située dans un environnement différent**. Ceci corrobore l'hypothèse énoncée précédemment, à partir de l'analyse des couplages super-hyperfins visibles en RPE, entre 3200 et 3400 G, et proposant des distances ou des géométries distinctes pour les deux résidus histidines.

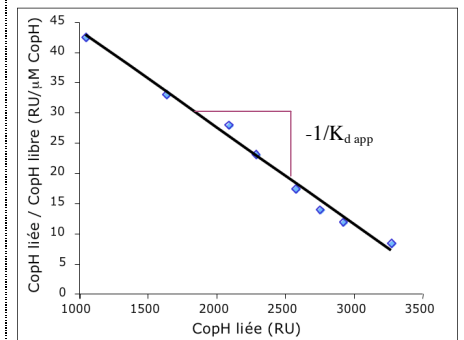
La proximité des carboxylates est également susceptibles d'être un facteur contribuant à augmenter légèrement la valeur du  $pK_a$  des histidines, menant ainsi à une protonation des ces dernières à un pH légèrement supérieur à 6,05.

La RPS a également été utilisée afin d'estimer la constante apparente de dissociation de CopH et des ions  $Ni^{2+}$ . Des quantités croissantes de protéine ont été injectées sur la surface Ni-NTA. Pour chaque concentration protéique, l'évolution du signal de résonance est enregistrée pendant le temps de l'injection jusqu'à atteindre la résonance maximale à la fin de la phase d'association. La figure 84 montre les résultats obtenus. Entre chaque injection de protéine, la surface est régénérée par de l'EDTA et chargée à nouveau en nickel.





**Figure 84** : Evolution du signal de résonance en fonction du temps pour différentes quantités de protéine CopH injectées sur la surface Ni-NTA. Seuls trois graphes sont représentés pour une meilleure lisibilité de la figure. En revanche, l'ensemble des données a été utilisé pour le tracé du graphe de Scatchard montré sur la figure 85.



**Figure 85** : Graphe de Scatchard pour la détermination de la constante apparente de dissociation de CopH pour le nickel immobilisé. L'équation de la droite s'écrit :  $y = -0,016x + 60$ .

Les sensorgrammes se caractérisent par une croissance brutale de la résonance suivie d'une phase d'équilibre menant à la résonance maximale pour chaque concentration de protéine injectée. La phase de dissociation commence également par une diminution brutale de la résonance dont l'amplitude est différente de celle correspondant à l'augmentation observée en début de cycle. D'autre part, l'amplitude de ces deux phases dépend de la concentration en protéine. En raison de ces augmentations et diminution brutales du signal de résonance, il n'a pas été possible de modéliser les différentes courbes enregistrées comme un simple modèle d'association/dissociation. En conséquence, aucune constante cinétique n'a pu être déterminée. Cependant, sous certaines conditions, nous pouvons supposer que la concentration de CopH libre correspond à la concentration de protéine dans le tampon en mouvement. Ainsi, l'obtention du signal maximal exprimé en unités de résonance (RU) correspond à la liaison de toutes les molécules de protéine aux ions nickel de la surface. Ces différentes valeurs nous ont permis de tracer le graphe de Scatchard associé (Fig. 85). Il représente le rapport des concentrations  $[\text{CopH liée à la surface}] / [\text{CopH libre}]$  en fonction de la concentration en CopH liée. Dans ce cas, la pente de la droite obtenue est égale à :  $-1/K_{d \text{ app}}$  où  $K_d$  représente la constante de dissociation de la liaison CopH-Ni. A partir du graphe que nous avons tracé (Fig. 85), nous avons pu déterminer une constante apparente de dissociation pour le nickel d'environ  $16 \mu\text{M}$ .

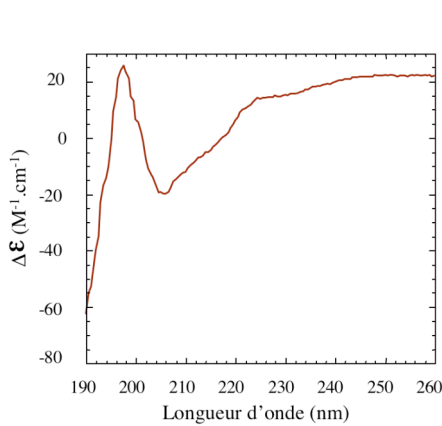
### 1.3.4 Caractérisation structurale par dichroïsme circulaire

Les études de dichroïsme circulaire (CD) ont été effectuées dans la région UV, entre 190 et 260 nm, afin d'explorer les propriétés structurales de CopH en fonction du pH ou de la présence de cuivre. Les spectres enregistrés restent inchangés quelque soit le pH entre 7,5 et 2,5. De même, en l'absence ou en présence de cuivre (jusqu'à 3 équivalents) à pH = 7,5, les spectres sont similaires. Par exemple, la figure 86 montre le résultat obtenu à pH 7,5 en l'absence de cuivre. L'analyse de ce spectre a été réalisée à l'aide du programme Selcon3 sur Dichroweb (Lobley, A. et Wallace, B. A. 2001 ; Lobley, A. *et al.* 2002). Le résultat obtenu suggère que CopH est composée de 21 % d'hélices et 24,6 % de brins. Cela correspond exactement à la prédiction de structure secondaire, effectuée en utilisant les outils disponibles sur ExPASy, et montrée en figure 87. Selon l'analyse Selcon3, la protéine devrait également contenir 38% de régions peu structurées et 20,2 % de coudes. Aucun changement majeur n'apparaît lorsque le pH passe de 7,5 à 2,5.

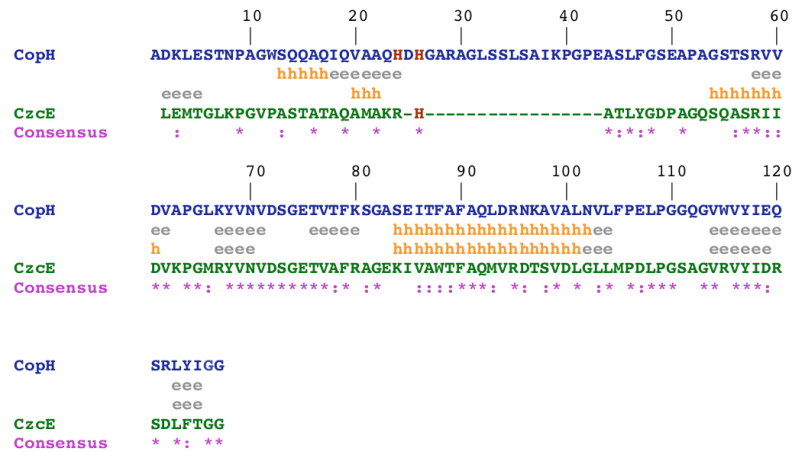
***L'analyse par CD nous permet de conclure qu'une proportion importante de la protéine est constituée de régions peu structurées (38 %). D'autre part, il est clair qu'aucun changement majeur n'est induit lorsque le pH passe de 7,5 à 2,5 et que la fixation du cuivre n'affecte pas de façon significative la structure secondaire de CopH.***

Dans ce cas, la dissociation de CopH, observée précédemment par résonance plasmonique de surface, n'est donc pas due à une réorganisation structurale de la protéine

La protéine CopH ne possède qu'un seul paralogue dans les bases de données, représenté par la protéine CzcE. Cette dernière est codée par un gène appartenant au cluster *czc*, responsable de la résistance aux ions  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (voir les chapitres « Introduction » et « Discussion »). Comparée à la protéine CzcE, CopH contient, en amont de l'histidine 26, l'insertion d'une chaîne non structurée de 17 acides aminés (Fig. 87).



**Figure 86** : Spectre de dichroïsme circulaire de la protéine CopH à pH = 7,5. Les spectres enregistrés restent inchangés quelque soit le pH entre 7,5 et 2,5, et l'absence ou la présence de cuivre (jusqu'à 3 équivalents).

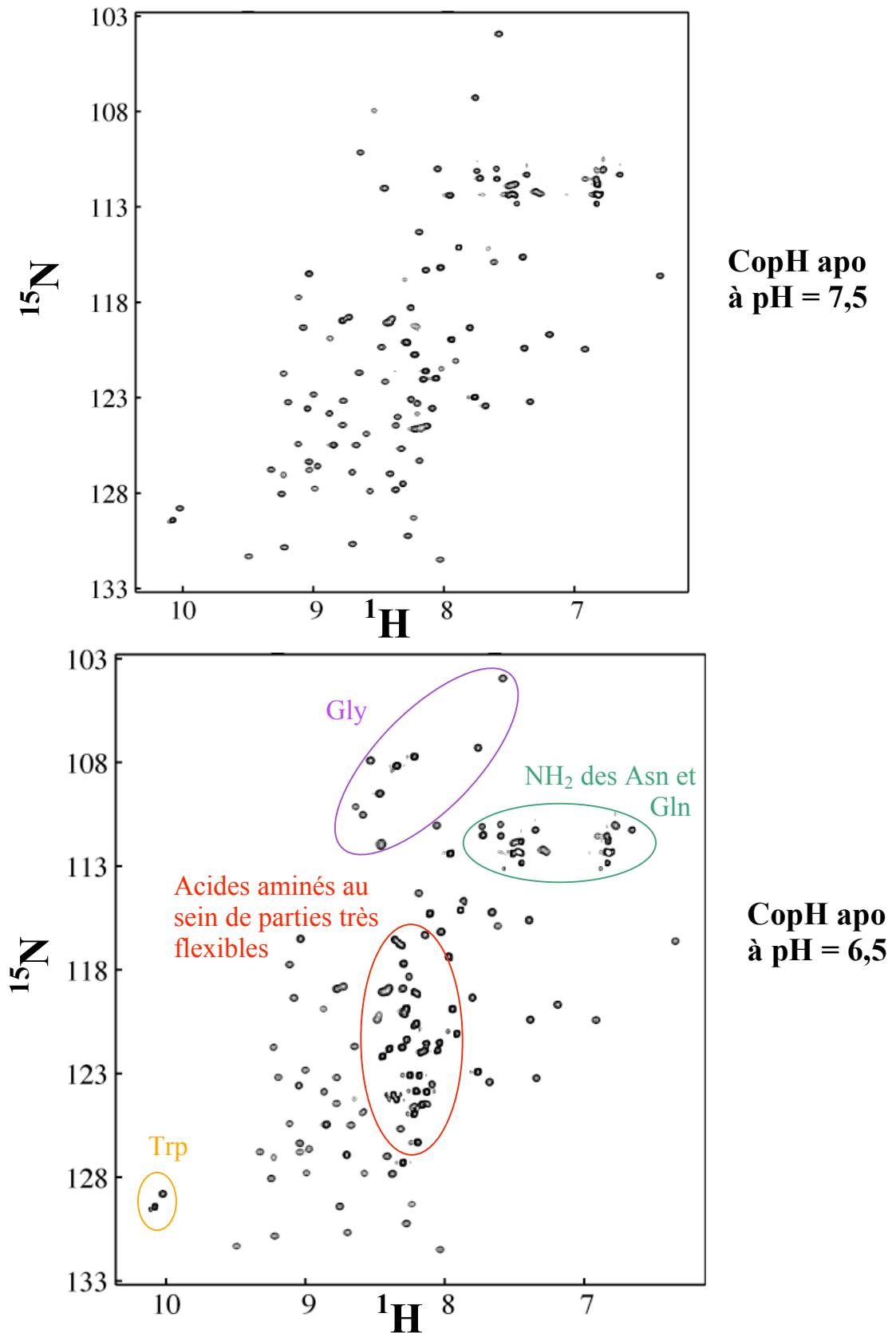


**Figure 87** : Prédiction de structures secondaires au sein des protéines CopH et CzcE d'après les outils disponibles sur ExPASy. **h** signifie hélice et **e** signifie brin. La protéine CopH est composée de 21% d'hélices, 24,6% de brins, 38% de régions peu structurées et 20,2% de coudes.

### 1.3.5 La spectroscopie RMN

Comme vu dans la partie « Matériel et Méthodes » (paragraphe A.4), un spectre HSQC est un spectre 2D représentant la corrélation entre des noyaux de nature différente. Dans notre cas, notre étude s'est appuyée sur la corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (couplage scalaire du proton amide d'un résidu avec l'azote amide du résidu voisin), au sein de la protéine CopH. Pour cela, la protéine a été surexprimée en milieu enrichi en  $^{15}\text{N}$ . Sur le spectre enregistré (Fig. 88), les fréquences RMN des différentes résonances sont largement distribuées dans le plan des déplacements chimiques  $\delta(^1\text{H})$  et  $\delta(^{15}\text{N})$ , ce qui est caractéristique des protéines correctement repliées. En effet, au sein d'une structure globulaire, bien structurée et peu flexible, chaque proton amide se trouve dans un environnement électronique qui lui est propre. Chacun est caractérisé par un déplacement chimique  $\delta$  différent de celui de son voisin, d'où une large distribution de ces valeurs dans le plan  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . Au contraire, les acides aminés, situés dans une région plus flexible, sont exposés au solvant et se trouvent donc tous dans un environnement chimique similaire. L'environnement électronique est donc semblable d'un résidu à l'autre, d'où l'observation de raies fines et intenses, qui se superposent, dans une zone au centre du spectre  $\delta_{\text{H}} = 8,2\text{-}8,4$  ppm. Le spectre de CopH présente une large distribution des résonances. On remarque cependant de nombreuses résonances, caractérisées par une intensité plus forte, au centre du spectre. Nous pouvons conclure que la protéine

présente des zones bien structurées mais aussi une partie très flexible, pauvre en structures secondaires. D'autre part, seulement 85 à 90 pics sur les 119 résonances attendues (127 résidus auxquels sont enlevés les 7 prolines et le groupement amino-terminal) sont visibles. Cette absence de pics peut avoir deux raisons : l'existence d'échanges conformationnels lents (menant à l'élargissement des raies qui deviennent donc moins intenses et disparaissent dans le bruit de fond), et/ou l'existence des protons amide en échanges rapides avec le solvant. Cet échange est catalysé par les ions hydroxydes  $\text{OH}^-$ . A  $\text{pH} = 7,5$ , l'échange des protons amide non protégés est suffisamment rapide pour que la résonance ne soit plus visible. Ainsi, pour minimiser l'effet de ces échanges avec le solvant, nous avons abaissé le  $\text{pH}$  à 6,5 : plusieurs résonances nettes et intenses apparaissent au centre du spectre et 110 pics peuvent alors être décomptés (Fig. 88). Les résonances qui réapparaissent à  $\text{pH} = 6,5$  se situent au centre du spectre, et font donc certainement partie de régions flexibles de la protéine. Par conséquent, l'absence d'un grand nombre de résonances à  $\text{pH} = 7,5$ , et la visualisation de certains d'entre eux à plus bas  $\text{pH}$ , au centre du spectre, révèle l'existence de nombreux protons échangeables avec l'eau au sein de parties flexibles, et donc la nature de la structure, pauvre en structures secondaires, aux alentours des résidus correspondants. D'autre part, les différentes résonances n'étant pas dédoublées, nous pouvons penser que CopH se présente sous la forme d'un dimère symétrique en solution.



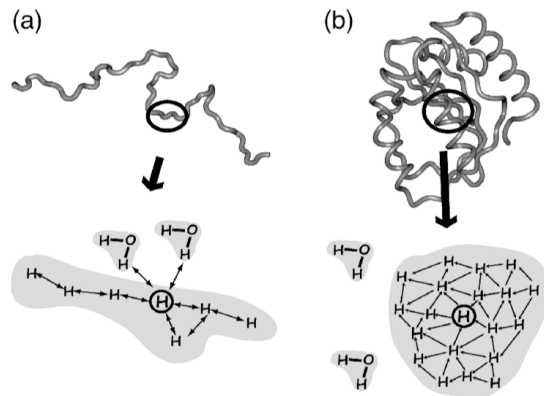
**Figure 88** : Spectre RMN de la protéine sauvage CopH à pH = 7,5 puis pH = 6,5. Les résonances sont largement distribuées dans le plan des déplacements chimiques mais nombre d'entre elles sont rassemblées au centre du spectre, zone correspondant aux protons amide situées au sein de régions très flexibles de la protéine. A pH = 6,5, plusieurs résonances nettes et intenses apparaissent au centre du spectre, en comparaison du spectre enregistré à pH = 7,5, et 110 pics peuvent alors être décomptés.

Une preuve supplémentaire de la nature pauvre en structures secondaires de la protéine a été donnée par l'analyse d'expériences de corrélation HET-SOFAST  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (Schanda, P. *et al.* 2006) (voir le chapitre « Matériels et Méthodes » – paragraphe A.4). Ces dernières sont issues de l'application de différentes idées, étudiées en méthodologie RMN, afin de minimiser le temps total nécessaire pour obtenir des informations structurales sur une protéine. L'une de ces idées est de minimiser le temps entre chaque scan, c'est-à-dire le temps de relaxation longitudinale de l'aimantation après impulsion, en diminuant par exemple l'angle d'impulsion. Une méthode, appelée  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST-HMQC (Schanda, P. *et al.* 2006), a ainsi été mise au point au laboratoire de RMN (IBS) afin d'obtenir une détermination semiquantitative du repliement d'une protéine, en un temps très court. Dans les expériences nommées SOFAST-HMQC, une séquence de pulses mène à l'inclinaison sélective de l'aimantation d'un type de protons, par exemple les protons amide, d'un angle de  $60^\circ$  ( $120^\circ$  puis  $180^\circ$ )  $< 90^\circ$ . D'autre part, l'énergie envoyée est transférée à travers le réseau de spins  $^1\text{H}$  *via* les couplages dipolaires NOE  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , les protons aliphatiques, non excités par la séquence de pulses participant à la relaxation en servant de « réservoir » d'énergie. La relaxation longitudinale des protons amide se produit donc en un temps plus court. Les pulses visant les protons amide sont centrés à 9,5 ppm sur une largeur d'environ 4 ppm. Dans les expériences HET-SOFAST-HMQC, un pulse d'inversion sélectif ( $180^\circ$ ) est ajouté en début de séquence. L'expérience se passe en deux temps :

\* elle consiste d'abord en une SOFAST-HMQC, qui constitue l'expérience de référence. Une séquence de pulses permet ainsi d'exciter sélectivement les protons amide. L'énergie est alors transférée à travers le réseau de spins  $^1\text{H}$  *via* les couplages dipolaires NOE  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , et évacuée vers les spins  $^1\text{H}$  situés au sein des parties flexibles de la protéine. On mesure alors  $I^{\text{réf}}$ , correspondant à la vitesse de relaxation de chaque proton, à travers le réseau de spins  $^1\text{H}$ . Si le proton se trouve au sein d'une région bien repliée de la protéine, alors le transfert d'énergie à travers le réseau de spins  $^1\text{H}$  sera efficace et  $I^{\text{réf}}$  sera grand. Au contraire, si le proton se situe dans une zone plus flexible, il aura plus de mal à transférer son énergie de polarisation *via* le réseau de spins  $^1\text{H}$  peu dense, et  $I^{\text{réf}}$  sera petit (Fig. 89).

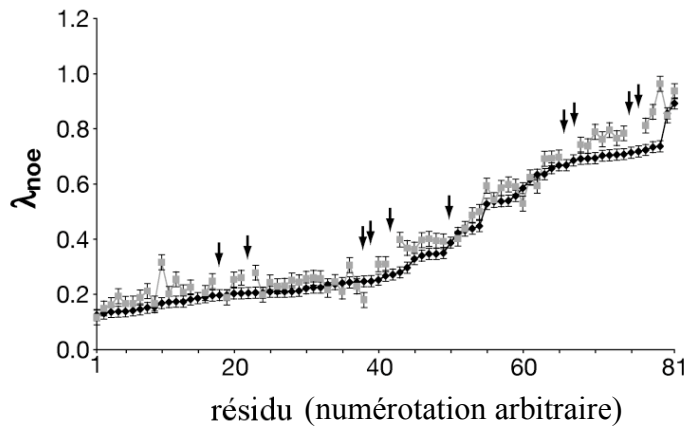
\* dans un deuxième temps, une impulsion de  $180^\circ$ , appliquée aux protons aliphatiques, est ajoutée en début de séquence. Cela correspond à une  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST-HMQC. Dans ce cas, les protons aliphatiques possèdent une énergie de polarisation et ne peuvent plus jouer le rôle de 'réservoir' d'énergie. Ainsi, l'efficacité de la diffusion énergétique d'un proton amide particulier, à travers le réseau de couplages dipolaires de spins  $^1\text{H}$ , sera réduite et dépendra de son environnement en protons aliphatiques. On mesure alors  $I^{\text{sat}}$ , vitesse de

relaxation des protons amide dans le cas où les protons aliphatiques ont été également excités. Le rapport  $I^{\text{sat}}/I^{\text{réf}} = \lambda_{\text{NOE}}$  nous renseigne sur les interactions existant entre les protons amide et les protons aliphatiques. Dans le cas d'un proton situé dans une zone bien repliée de la protéine, la diffusion de l'aimantation auprès des autres protons du réseau est efficace et  $I^{\text{sat}} < I^{\text{réf}}$  d'où  $\lambda_{\text{NOE}} < 1$ . Dans le cas d'un proton situé dans une région flexible,  $I^{\text{sat}} \approx I^{\text{réf}}$  et  $\lambda_{\text{NOE}} \approx 1$  (Fig. 89).



**Figure 89** : Illustration de la diffusion des spins  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  dans le cas (a) d'une chaîne polypeptidique allongée, flexible, caractérisée par un réseau de spins  $^1\text{H}$  de faible densité ( $\lambda_{\text{NOE}} \approx 1$ ), et dans le cas (b) d'une protéine globulaire bien repliée caractérisée par un réseau de spins  $^1\text{H}$  rigide, de forte densité ( $\lambda_{\text{NOE}} < 1$ ) (Schanda, P. *et al.* 2006).

Cette méthode a été utilisée dans notre cas pour la détermination semiquantitative de la structure globulaire et de l'hétérogénéité de la protéine CopH en solution à partir de l'étude de la densité en protons aliphatiques au niveau des protons de la liaison amide. La figure 90 montre la distribution des valeurs  $\lambda_{\text{noe}}$  calculées pour les 81 pics de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  pour lesquels l'intensité a pu être mesurée de façon fiable. De faibles valeurs  $\lambda_{\text{noe}}$  indiquent ainsi une haute densité en protons aliphatiques, autour du proton de la liaison amide. Cette information est reliée à la localisation du proton au sein de la région structurée de la protéine. La distribution des valeurs  $\lambda_{\text{noe}}$  montre que CopH est une protéine dont la structure est très ***hétérogène***, structure constituées à la fois de régions structurées et de régions plus flexibles (Schanda, P. *et al.* 2006). D'autre part, il apparaît que ***seulement 50 résidus approximativement sont situés dans une région bien structurée ( $\lambda_{\text{noe}} < 0,35$ ), ce qui est en accord avec la prédiction de structure secondaire.***

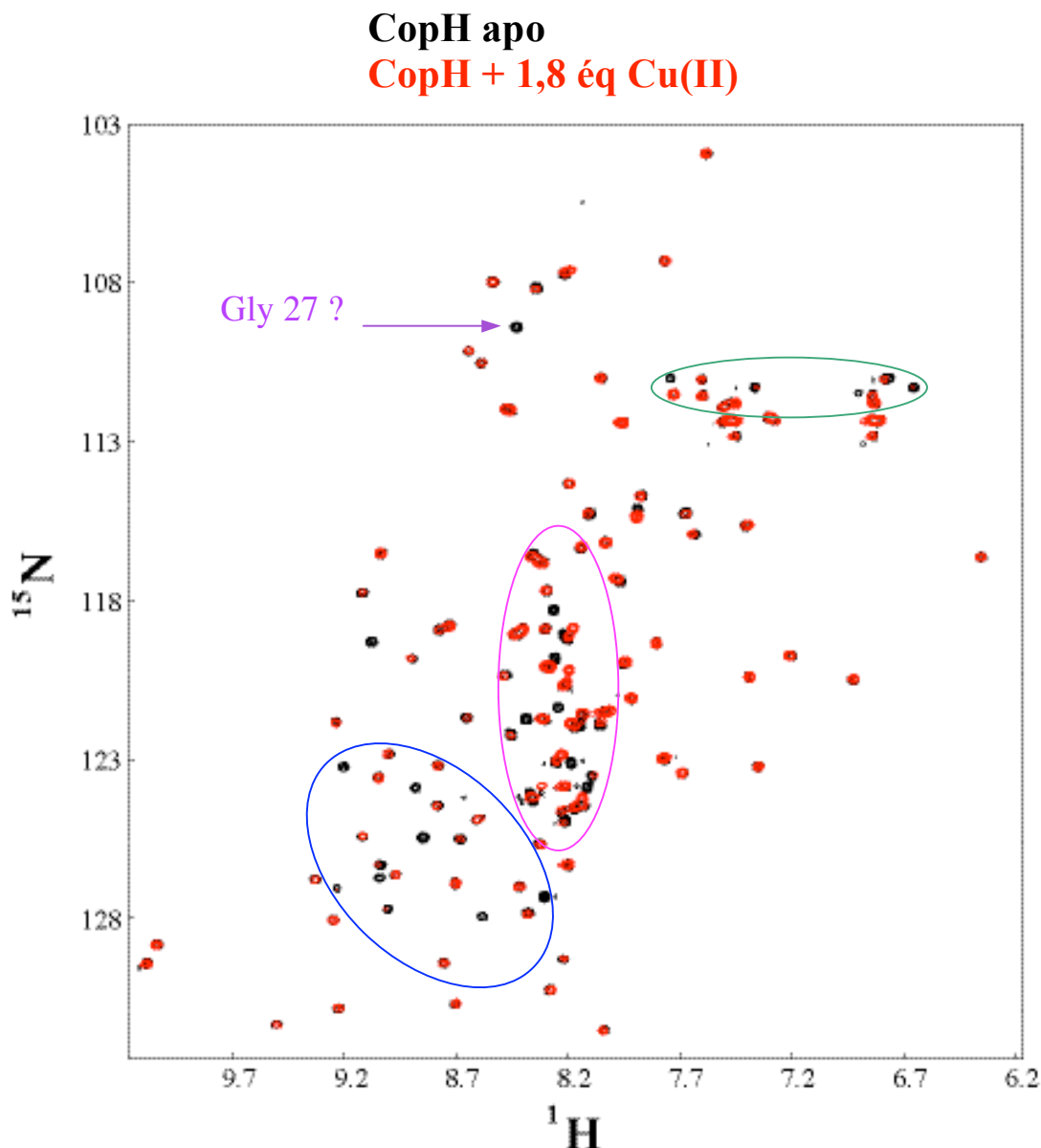


**Figure 90** :  $\lambda_{\text{noe}}$  tracés pour chaque résidu au sein de CopH apo (points noirs) et CopH métallée (points gris).  $\lambda_{\text{noe}} < 0.35$  caractérise les groupes amides encombrés dans la partie bien structurée de la protéine.  $\lambda_{\text{noe}} > 0.35$  indique une exposition plus importante au solvant.

D'autre part, le Cu(II) étant paramagnétique, le moment magnétique de son électron non apparié affecte les résonances des noyaux aux alentours en induisant une élévation de leur temps de relaxation (Bertini, I. et Pierrattelli, R. 2004). Les pics des noyaux correspondants sont alors plus larges et difficiles à distinguer. Des expériences HET-SOFAST  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (Fig. 90) et HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (Fig. 91) ont alors été réalisées pour suivre les variations spectrales et structurales dues à la fixation de cuivre. Pour cela, du cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) a été ajouté petit à petit, jusqu'à 0,9 équivalents molaires, à une solution de protéine (dimérique) concentrée à 0,4 mM à pH = 6,5. La figure 91 montre la superposition des spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de l'apo-protéine et de la protéine fixant le cuivre. L'ajout de cuivre sur CopH n'induit pas de changements majeurs au niveau des déplacements chimiques, confirmant encore une fois que **la fixation du cuivre n'induit pas de changements conformationnels significatifs**. Comme attendu, plusieurs pics disparaissent du spectre, pics correspondant aux résidus proches du cuivre. Les résidus correspondant se situent à la fois dans la région structurée (en particulier un résidu glycine, quelques résidus situés dans la région des chaînes latérales des asparagines et glutamines, et plusieurs résidus dans le quart inférieur gauche du spectre), et dans la partie plus flexible de la protéine (au centre du spectre), comme le montrent le spectre de la figure 23 et les valeurs  $\lambda_{\text{noe}}$  mesurées pour les mêmes pics sur le spectre de l'apo-protéine. La comparaison des valeurs  $\lambda_{\text{noe}}$  de la forme apo et de la forme métallée (Fig. 90) démontre également que **la fixation du cuivre n'induit pas de structuration au sein de la protéine**, résultats concordant avec ceux obtenus par CD.

Partant de l'idée que le site cuivre se situerait du côté N-terminal, proche des histidines, il est raisonnable de penser que la résonance disparaissant dans la région propre aux glycines, lors de l'ajout de cuivre, est la glycine 27.





**Figure 91** : Superposition des spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CopH (0.4 mM) en absence (en noir) et en présence de 1,8 équivalents de Cu(II) (en rouge). Les deux spectres ont été enregistrés à pH = 6,5 à 25°C. La fixation de cuivre n'induit pas de changements conformationnels significatifs. Plusieurs résonances disparaissent cependant du spectre : par exemple, un résidu glycine (peut-être la glycine 27 ?), quelques résidus dans la zone des arginines et glutamines (en vert) et plusieurs résidus dans le quart inférieur gauche du spectre (en bleu), puis plusieurs résidus dans la partie plus flexible de la protéine (au centre du spectre) (en rose).

Enfin, d'autres enregistrements RMN visant à attribuer les différentes résonances à chaque résidu ont été réalisés. L'attribution est en cours mais s'avère difficile pour deux principales raisons : le grand nombre de superpositions des résonances au centre du spectre, et la forte intensité des pics situés dans cette même région et masquant alors les voisins (Fig. 88).

### 1.3.6 La cristallogénèse

Plusieurs kits de cristallogénèse ont été testés afin de déterminer les conditions menant à la cristallisation de CopH. Cependant, aucune condition essayée n'a pu mener à l'obtention de cristaux, qui nous auraient permis d'aller plus avant dans la caractérisation de la protéine, de sa liaison au cuivre et peut-être de sa fonction.

En conclusion, considérant tous les résultats obtenus jusque là concernant la caractérisation physicochimique de la protéine CopH sauvage, celle-ci apparaît sous la forme d'un dimère symétrique, possédant un pourcentage élevé (38 %) de régions peu structurées. relativement peu de zones fortement structurées par rapport aux régions plus flexibles. Elle lie les ions Cu(II), avec une grande sélectivité et une forte affinité, sans que la fixation de ces ions métalliques n'induisent de changements conformationnels majeurs. Les différentes expériences nous ont amenés à penser que la protéine fixait deux ions Cu(II) par dimère, soit un par monomère, de façon spécifique, au niveau d'un site possédant les caractéristiques spectrales d'un site cuivre de type II. Seuls résidus susceptibles de lier les métaux au sein de la séquence de la protéine, nous pensions que les deux histidines 24 et 26 et les carboxylates étaient vraisemblablement impliqués dans la liaison des ions cuivre. L'ensemble de ces résultats ont été expliqués dans un premier article publié en mars 2006 dans *Biochemistry* (Sendra, V. *et al.* 2006).

Ensuite, afin d'examiner plus précisément le rôle des histidines en position 24 et 26 dans la fixation des ions Cu<sup>2+</sup>, ainsi que leur rôle relatif, nous avons produit les mutants His24Ala, His26Ala et His24-26Ala, à partir desquels nous avons mené le même type d'étude, en comparaison des résultats concernant la protéine sauvage.

## II – CopH à la lumière de ses mutants

### 2.1 Mutagenèse dirigée, surexpression et purification des mutants His24Ala, His26Ala et His24-26Ala

Les simples mutants His24Ala, His26Ala dans lesquels l’histidine 24 ou l’histidine 26 est remplacée par une alanine, et le double mutant, ne possédant plus d’histidine, ont été produits par mutagenèse dirigée à partir du gène codant pour la protéine sauvage. Leur expression sous leur forme maturée, dans le cytoplasme, puis leur purification, en présence d’anti-protéases, se sont déroulées de la même manière que celles de la protéine CopH : induction sur la nuit à 20°C, puis précipitation au sulfate d’ammonium (50 % de saturation finale) et filtration sur gel. Le rendement est similaire à celui de CopH : environ 150 mg de protéine par litre de culture. En l’absence d’anti-protéases et en tampon Hepes, les mutants, en particulier His24Ala, apparaissent plus sensibles aux protéases. His24Ala est en effet dans ce cas protéolysé entre l’arginine 29 et l’alanine 30 (Fig. 92) et purifié sous cette forme, ne contenant plus la région N-terminale, ni bien entendu les deux résidus histidine. Cette forme sera appelée par la suite « protéine tronquée ».

ADKLESTNPAGWSQQAQIQVAAQHDHGAR ↓ AGLSSLSAIKPGPEASLFGSEAPAGST  
 SRVVDVAPGLKYVNVDSETVTFKSGASEITFAFAQLDRNKAVLNVLFPPELPGGQGV  
 WVYIEQSELYIGG

**Figure 92** : Représentation du site de coupure ↓ entre l’arginine 29 et l’alanine 30, menant à la formation de la protéine CopH tronquée.

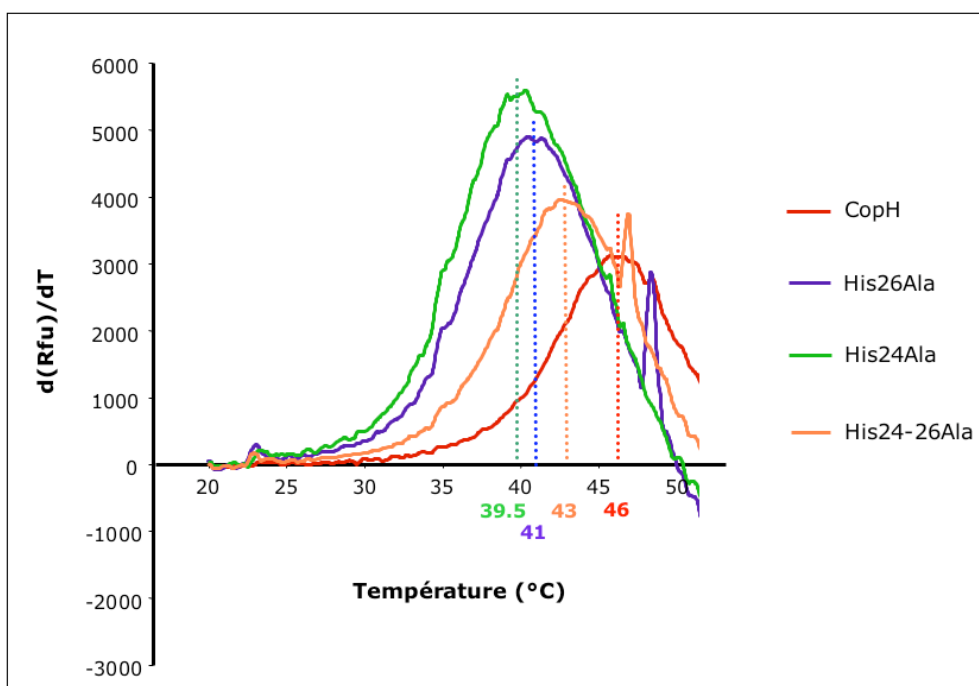
Il est important de noter que les trois mutants possèdent un volume d’élution, sur colonne analytique Superdex-75, égal à celui de la protéine sauvage, ce qui nous permet de conclure sur leur état dimérique en solution. La protéine tronquée est également caractérisée par un volume d’élution correspondant à la forme dimérique.

*Il est alors raisonnable de penser que la partie N-terminale contenant les histidines n’est pas impliquée dans la dimérisation ni dans le maintien de la forme dimérique.*

### 2.2 Stabilité en fonction de la température

La méthode « Thermal Shift Assay » ou « ThermoFluor » est une méthode biophysique capable de déterminer les conditions de stabilité d’une protéine. L’analyse de la courbe de dénaturation fournit la température  $T_m$ , température de dénaturation de la protéine.

La figure 93 montre la stabilité de CopH et ses mutants, en fonction la température.



**Figure 93** : Etude de la stabilité de CopH et ses mutants en fonction de la température : détermination de leurs températures de dénaturation  $T_m$ .

Les résultats sont obtenus suivant les changements de fluorescence de la sonde SYPRO Orange. Cette dernière possède une fluorescence faible dans les environnements à haute constante diélectrique et une fluorescence forte dans les milieux de faible constante diélectrique. Or les protéines dénaturées ont des propriétés diélectriques faibles de part leur désorganisation structurale menant à l'exposition de leurs régions plus hydrophobes au solvant. Ainsi, les régions hydrophobes de CopH ou ses mutants sont plus exposées au fluorophore lors du processus de dénaturation et la fluorescence mesurée augmente. Cependant, après avoir atteint son maximum, l'intensité de fluorescence décroît, probablement à cause de l'agrégation des complexes sonde-protéine dénaturée. Afin de déterminer de façon plus précise la température de dénaturation  $T_m$  (point d'inflexion de la courbe  $R_{fu} = f(T)$ ), les résultats ont été observés suivant la dérivée première des données brutes. Les expériences ont été reproduites quatre fois afin de vérifier la reproductibilité de la méthode et minimiser l'erreur expérimentale.

La protéine sauvage CopH possède une température de dénaturation  $T_m = 46^\circ\text{C}$ , les simples mutants His26Ala et His24Ala des températures  $T_m$  proches l'une de l'autre ( $41^\circ\text{C}$  et  $39,5^\circ\text{C}$  respectivement), et le double mutant une température  $T_m$  intermédiaire de  $43^\circ\text{C}$ . Ces valeurs nous permettent de comparer la structuration relative des différents mutants par rapports à CopH. Ainsi, la mutation simple d'une histidine induit une désorganisation structurale telle que la température de dénaturation se trouve abaissée de plusieurs degrés

( $\Delta T_m = 6-7^\circ\text{C}$ ). En outre, *la mutation de l'histidine 24 provoquerait un changement structural légèrement plus important que ceux induits par la mutation de l'histidine 26*. L'histidine en position 24 paraît ainsi jouer un plus grand rôle que sa voisine dans la structuration de la protéine. Sur la base de la comparaison des valeurs  $T_m$  des simples et double mutants, une remarque plutôt surprenante s'impose : *la double mutation mènerait à une désorganisation moins importante que chacune des simples mutations*.

De la même façon, la stabilité thermique des différentes protéines a été étudiée en fonction de la quantité de cuivre présent (Tab. 16).

	CopH	His26Ala	His24Ala	His24-26Ala
0 éq Cu(II)	46°C	41°C	39.5°C	43°C
0.5 éq Cu(II)	35°C	41°C	39.5°C	43°C
1 éq Cu(II)	37°C	39°C (2 pics)	37°C (2 pics)	40.5°C (2 pics)
1.5 éq Cu(II)	37°C (2 pics)	37°C (2 pics)	38°C (large pic)	39°C (2 pics)
2 éq Cu(II)	36°C (2 pics)	39°C (large pic)	38°C (large pic)	38°C (2 pics)
3 éq Cu(II)	39°C (large pic)	39°C (large pic)	41°C (large pic)	36°C (2 pics)
4 éq Cu(II)	40°C (large pic)	35°C (2 pics)	36°C (large pic)	36°C (large pic)

**Tableau 16** : Températures de dénaturation  $T_m$  de CopH et ses mutants en présence de différents équivalents de cuivre. Dans le cas où deux pics sont présents, seule la température correspondant au premier est inscrite.

L'intensité du signal de fluorescence décroît en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajoutés, probablement à cause d'interactions. Cette observation est récurrente, à notre connaissance, dans la plupart des expériences effectuées en présence de métal (cuivre, nickel, manganèse, fer...) à l'Institut. La méthode de « Thermal Shift Assay » est récente et la littérature à son propos est encore très réduite. Nous ne disposons ainsi que de peu de recul sur cette technique. Outre un artéfact dû à la méthode, nous pouvons penser à l'existence d'interactions non contrôlées entre les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et le fluorophore.

Il apparaît cependant que la présence de cuivre provoque une désorganisation structurale de la protéine sauvage. L'ajout de 1,5 ou 2 équivalents de cuivre, fait apparaître deux pics, se rassemblant ensuite en un pic large. Là encore, le peu de recul dont nous disposons sur cette méthode freine notre interprétation. Nous pouvons simplement formuler l'idée que l'ajout de cuivre provoquerait la formation de deux populations, à partir de 1,5 équivalents de cuivre ajoutés. Une autre hypothèse consisterait à penser que la fixation du

cuivre induirait la différenciation de la protéine en deux domaines, en termes de structuration et donc de stabilité thermique : un premier domaine se dénaturant d'abord à 37°C, et l'autre, se dénaturant ensuite, à 42°C. Pour des quantités de cuivre supérieures à 3 équivalents, la dénaturation des deux domaines se dérouleraient de façon concomitante, un seul large pic étant visible à une température intermédiaire ( $T_m = 40^\circ\text{C}$ ).

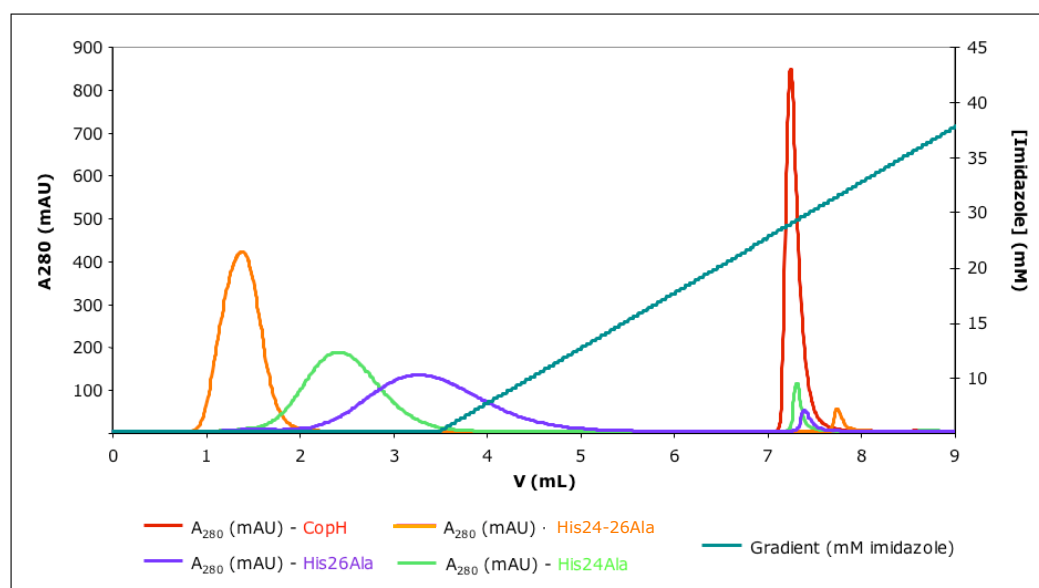
Le même type de profil caractérise les mutants avec toutefois quelques différences. La présence de 0,5 équivalents de cuivre ne modifie en rien la température  $T_m$ . La structure des mutants ne serait alors pas modifiée. Dès un équivalent de cuivre ajouté, la température  $T_m$  diminue et deux pics apparaissent, d'où deux populations d'après l'interprétation précédente.

Par conséquent, *la présence de cuivre paraît désorganiser la structure de CopH et de ses mutants par rapport à leurs formes non métallées.*

## 2.3 Comparaison d'affinité

### 2.3.1 Affinités comparées par chromatographie d'affinité

Les affinités relatives de la protéine sauvage et des mutants histidine pour les ions Cu(II) ont pu être comparées assez rapidement par chromatographie d'affinité sur colonne HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP (1 mL) chargée en cuivre. La protéine a été éluée par un gradient linéaire d'imidazole (Fig. 94).



**Figure 94** : Chromatogrammes d'élué de CopH et ses mutants sur colonne HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP (1 mL) suivant un gradient d'imidazole.

La protéine sauvage est éluée par 39 mM d'imidazole ( $V_{\text{élution}} = 7,3$  mL). Les mutants le sont quant à eux avant même que le gradient d'imidazole ne commence. Une légère différence entre eux est toutefois visible, His26Ala étant élué à  $V_1 = 3,4$  mL, His24Ala à  $V_2 = 2,5$  mL et le double mutant à  $V_3 = 1,5$  mL  $< V_2 < V_1$ . Le double mutant est élué juste après le volume mort de la colonne. Nous pouvons conclure que la protéine sauvage possède une affinité bien plus grande que les mutants pour le cuivre, sur colonne de métal immobilisé. ***De-là, il est clair que les histidines jouent un rôle essentiel dans l'affinité pour les ions Cu(II), l'histidine en position 24 jouant un rôle plus important que sa voisine***, résultat déjà suggéré, en termes de structuration de la protéine, par la méthode du « Thermal Shift Assay ».

### 2.3.2 Etude par spectrométrie de masse

Les trois mutants sont tout d'abord analysés par spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes, en l'absence cuivre. Comme dans le cas de la protéine sauvage, nous avons pu détecter les formes natives dimériques des deux simples mutants et du double mutant. La protéine tronquée apparaît aussi sous la forme d'un dimère. ***Ces résultats confirment la structure dimérique des différents mutants et permettent de négliger le rôle de la partie N-terminale dans le maintien du dimère***. Les deux sous-unités des mutants restent liées de façon non covalente.

Nous avons alors essayé de comparer les capacités des différents mutants à lier le cuivre. La solution de protéine (CopH ou ses mutants) est séparée du cuivre non spécifique par filtration sur colonne Micro Bio-Spin<sup>TM</sup>. La protéine récupérée est analysée par spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes.

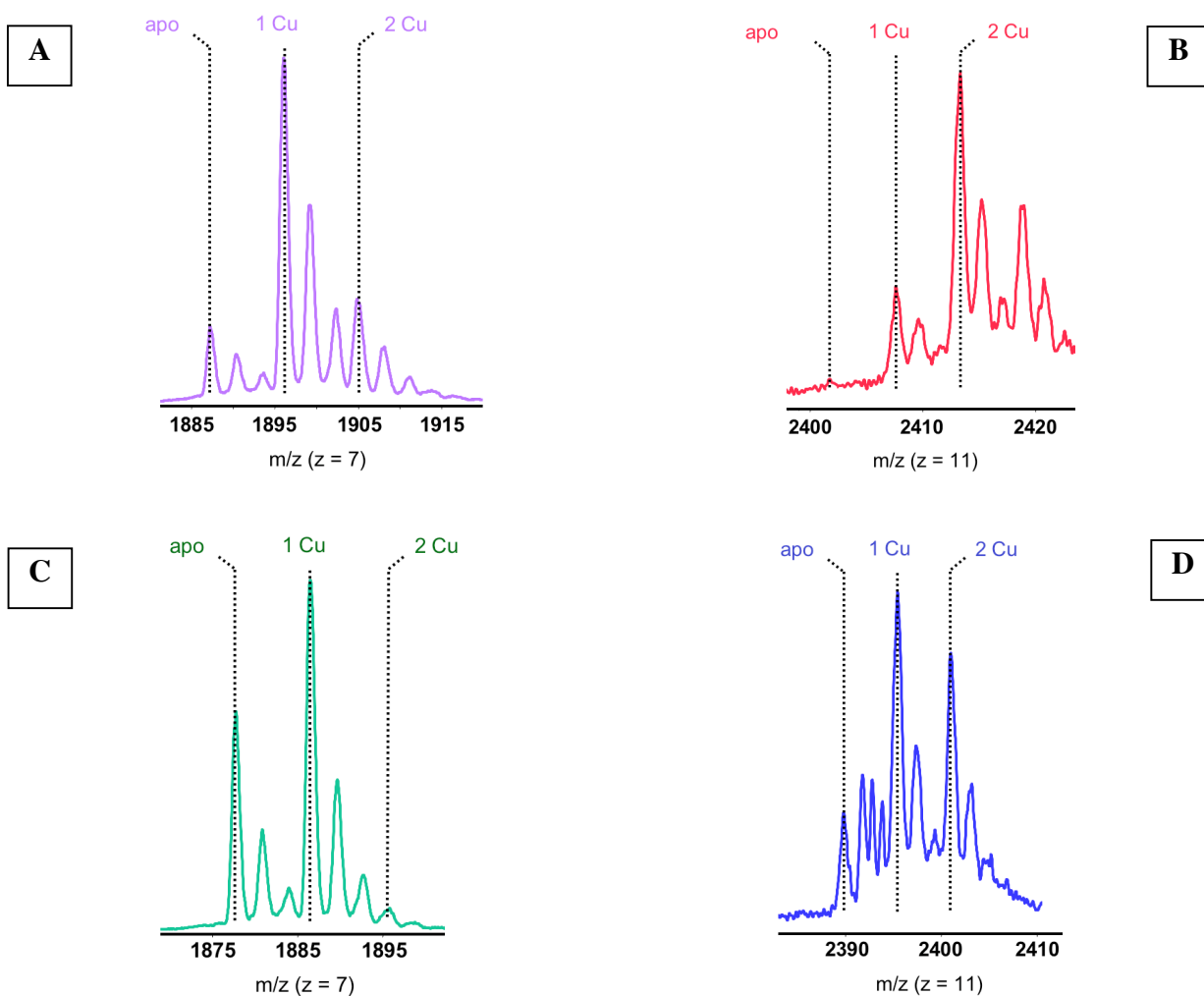
Le spectre enregistré pour la protéine sauvage (Fig. 95 A et 95B), confirme le fait que la protéine dimérique lie 2 ions Cu(II). Les conditions permettent également de distinguer un léger pic correspondant au dimère fixant 1 ion Cu(II) et représentant seulement 15 % environ de la quantité de protéine métallée. Sur les mêmes spectres, un pic, définissant le monomère fixant 1 ion Cu(II), est visible à côté d'un autre pic, largement minoritaire, représentant l'apo-protéine.

Les spectres enregistrés après passage des trois mutants sur colonne Micro Bio-Spin<sup>TM</sup>, en présence de cuivre (2,5 équivalents), sont similaires entre eux. Les figures 95C et 95D montrent les spectres de masse relatifs à un seul des trois mutants, His24Ala. Afin de mieux comparer le comportement de la protéine sauvage et de ses mutants, nous nous

sommes intéressés à l'aire des différents pics. Les pourcentages sont néanmoins donnés à titre approximatif, la spectrométrie de masse n'étant pas une technique quantitative. Dans le cas des mutants, le pic majoritaire (environ 60 %) correspond au dimère liant 1 ion Cu(II), à côté des pics représentant le dimère apo ( $\approx 15$  %), et le dimère fixant 2 ions Cu(II) ( $\approx 25$  %). Le monomère fixe également 1 ion Cu(II), les proportions de monomère apo ( $\approx 40$  %) et de monomère métallé ( $\approx 60$  %) étant sensiblement égales

Un excès de CuCl<sub>2</sub> (5 équivalents) est ensuite ajouté aux différentes solutions protéiques. Après passage sur colonne Micro Bio-Spin<sup>TM</sup>, les spectres enregistrés sont identiques aux précédents, obtenus avec 2,5 équivalents de cuivre (Tab. 17). Par conséquent, les résultats permettent de confirmer la liaison spécifique de *deux ions Cu(II) par dimère chez la protéine sauvage*. Les *mutants, également dimériques, lient le cuivre avec une affinité plus faible, en fixant majoritairement un ion Cu(II) par dimère*.





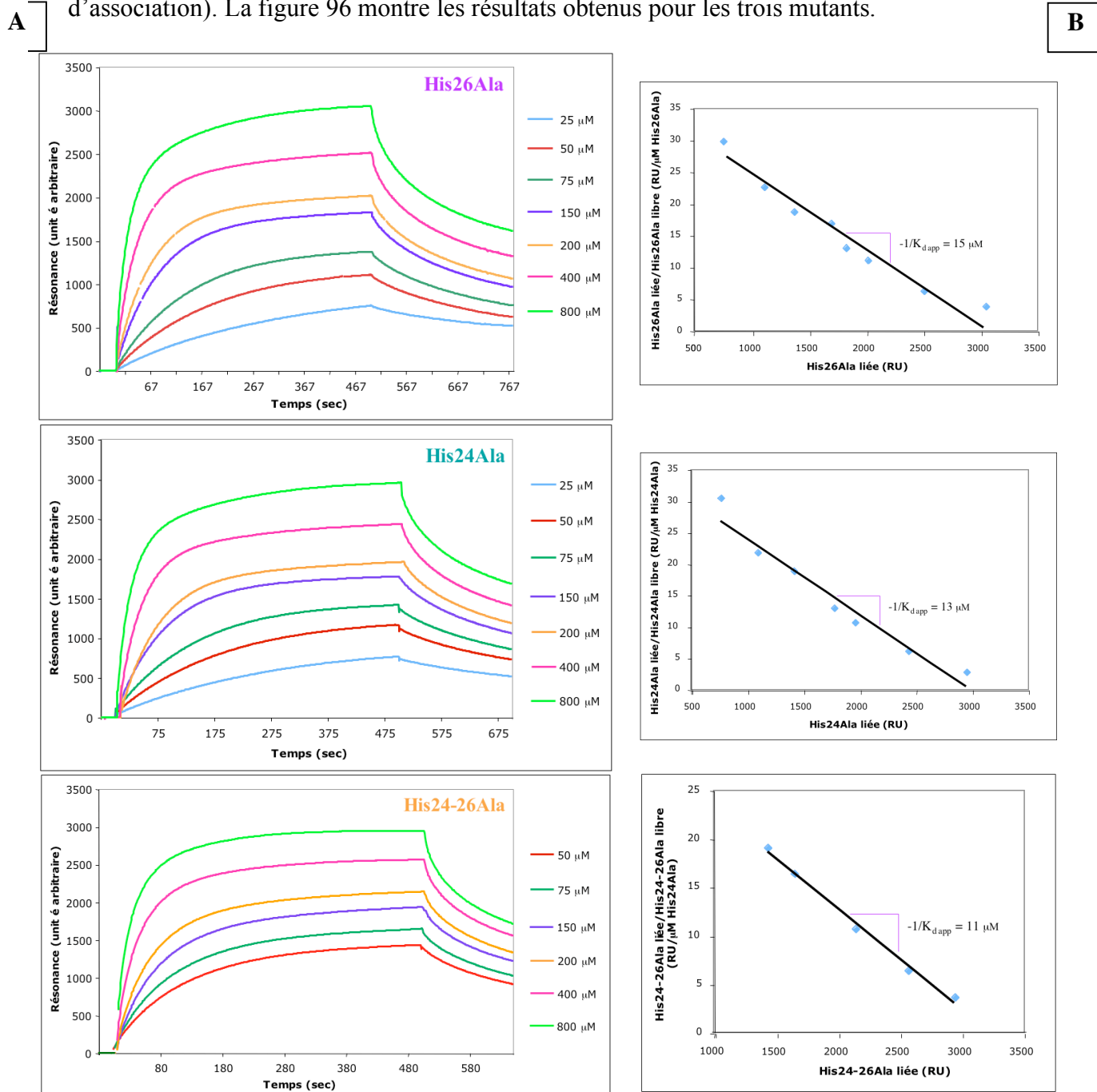
**Figure 95** : Spectres de masse en conditions non dénaturantes de CopH et du mutant His24Ala additionnés de 2,5 équivalents de Cu(II) puis passage sur colonne Micro Bio-Spin™. (A) CopH monomérique pour  $z = 7$ . (B) CopH dimérique pour  $z = 11$ . (C) His24Ala monomérique pour  $z = 7$ . (D) His24Ala dimérique pour  $z = 11$ . Les mutants His26Ala et His24-26Ala se caractérisent par un spectre identique à celui du mutant His24Ala.

	CopH			His26Ala / His24Ala / His24-26Ala		
	apo	Fixant 1 ion Cu(II)	Fixant 2 ions Cu(II)	apo	Fixant 1 ion Cu(II)	Fixant 2 ions Cu(II)
<b>Dimère</b>	0	15%	85%	16%	50%	34%
<b>Monomère</b>	15%	85%	--	40%	60%	--

**Tableau 17** : Tableau récapitulatif de la proportion approximative de chaque espèce protéique liant 0, 1, ou 2 ions Cu(II).

### 2.3.3 Analyse par résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface ne pouvant s'effectuer en présence de cuivre du fait de l'impossibilité de saturer la surface avec ce métal de manière reproductible (voir paragraphe 1.3.3), la protéine sauvage ainsi que les mutants ont été injectés, en quantités croissantes, sur surface Ni-NTA, jusqu'à obtention d'un signal maximal (fin de la phase d'association). La figure 96 montre les résultats obtenus pour les trois mutants.



**Figure 96** : Evolution du signal de résonance en fonction du temps pour différentes quantités de protéine His26Ala, His24Ala, His24-26Ala, injectées sur la surface Ni-NTA (colonne de gauche - A).

Graphes de Scatchard correspondants, pour la détermination de la constante apparente de dissociation de chacun des mutants pour le nickel immobilisé (colonne de droite - B).

La première observation qui vient à l'esprit au regard des sensorgrammes de chacun des mutants est plutôt surprenante : ***les trois mutants se fixent sur la surface Ni-NTA***, y compris le double mutant ne possédant plus d'histidine, *a priori* impliquées dans la liaison métallique... L'amplitude des signaux, pour une même quantité de protéine injectée (par exemple 400  $\mu\text{M}$ ), est cependant plus faible (2500 RU) que celle obtenue pour la protéine sauvage (3250 RU > 2500 RU). Les valeurs de résonance sont similaires dans le cas des deux simples mutants et encore légèrement plus faibles pour le double mutant. ***Ceci laisse penser à une affinité plus faible des mutants pour la surface Ni-NTA en comparaison de celle de la protéine sauvage.***

Comme lors de l'étude de la protéine sauvage, les différents sensorgrammes n'ont pu être modélisés comme un simple modèle d'association/dissociation par le logiciel utilisé BiaEval, et les constantes cinétiques n'ont pu être déterminées. D'autre part, l'affinité des mutants pour la surface Ni-NTA étant plus faible que celle de CopH, il a été plus difficile d'obtenir un plateau en fin de phase d'association à faibles concentrations. Sur l'appareil Biacore utilisé, cette phase ne peut s'étendre sur plus de 250  $\mu\text{L}$ . Le tracé des graphes de Scatchard correspondant à l'étude de chacun des mutants s'appuie sur les valeurs du signal de résonance à l'équilibre, à la fin de la phase d'association. Dans notre cas, en particulier pour les faibles concentrations, le signal de résonance n'atteint pas exactement son maximum à la fin de la phase d'association. La croissance de la résonance étant extrêmement lente en fin de phase d'association, nous avons considéré le signal de résonance maximal, proche de la valeur obtenue expérimentalement à la fin de la phase d'association. Les constantes apparentes de dissociation pour le nickel, déduites de ces graphes, sont très proches de la valeur calculée pour CopH sauvage ( $K_d \approx 16 \mu\text{M}$  ; voir paragraphe 1.3.3), contrairement à la différence d'affinité que laissait présager la différence d'intensité des signaux de résonance décrite précédemment. L'étude par chromatographie d'affinité (voir paragraphe 2.3.1) permettait, quant à elle, de distinguer les différents mutants en fonction de leur affinité pour le cuivre immobilisé.

Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer cette différence. Tout d'abord, l'étude par résonance plasmonique de surface n'a pu être mise en œuvre que sur surface Ni-NTA, la chromatographie d'affinité ayant été réalisée sur colonne chargée en ions Cu(II). D'autre part, la difficulté à atteindre l'équilibre à la fin de la phase d'association dans le cas des mutants a induit une approximation des valeurs prises pour le tracé des graphes de Scatchard, d'où une fiabilité relative des  $K_d$  obtenus. Enfin, deux grandes différences existent

entre les deux expériences par résonance plasmonique de surface et chromatographie d'affinité :

\* dans le premier cas, le débit de la solution protéique injectée est bien plus faible que celui utilisé lors de la chromatographie d'affinité sur colonne HiTrap™ Chelating HP (30 µL/min < 500 µL/min).

\* un plus grand nombre de molécules de protéine est contenu dans la solution protéique injectée en continu (162 µg à 5,2 mg) en comparaison de celui présent dans la solution injectée sur colonne HiTrap™ Chelating (500 µg).

En conséquence, lors de l'expérience par résonance plasmonique de surface, les molécules de protéine, plus nombreuses, disposent de plus de temps pour se fixer au métal immobilisé.

L'analyse du cycle association/dissociation en fonction du pH a également été reproduite. La figure 97 montre l'association de la protéine sauvage puis du double mutant, sur la surface Ni-NTA, en fonction du pH.

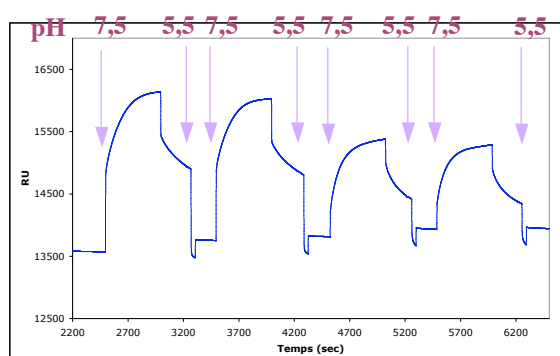


Figure 97 : Influence du pH sur la fixation de CopH puis de His24-26Ala à la surface Ni-NTA

L'expérience a d'abord été effectuée avec la protéine sauvage afin de confirmer le résultat obtenu auparavant (voir Fig. 94 et 85), puis le double mutant a été injecté. La phase d'association observée alors à pH = 7,5 confirme que le double mutant se lie aux ions Ni<sup>2+</sup>. Durant cette phase, le pH est abaissé à 5,5 en remplaçant le tampon initial par du MES ajusté à ce pH. Le double mutant se dissocie immédiatement et complètement. Il se fixe à nouveau à la surface après équilibration de celle-ci à pH = 7,5, pour former un cycle similaire à celui observé pour CopH.

*Par conséquent, le double mutant se fixant à la surface Ni-NTA, nous pouvons raisonnablement conclure que les histidines ne jouent pas le rôle de ligands lors de l'association à la surface.* Cependant, les valeurs plus faibles des signaux de résonance correspondant aux différents mutants laissent penser que *ces résidus sont tout de même*

*impliqués dans la liaison métallique et dans l'affinité de la protéine pour le métal.* De même, nous pouvons affirmer que la dissociation observée à bas pH n'est pas due à la protonation des histidines. Par ailleurs, la séquence de CopH ne présente pas d'autres résidus à chaîne latérale azotée susceptibles de lier les métaux. Néanmoins, comme il a été proposé par Miura *et al.* dans le cas de la protéine Prion (Miura, T. *et al.* 1999), l'ionisation des azotes amide de la chaîne polypeptidique peut être observée en présence d'ions Cu(II) lorsqu'une histidine et un groupement amine sont disponibles pour participer à une liaison (Sundberg, R. J. et Martin, R. B. 1974). Les azotes amide voient alors leur pK<sub>a</sub> diminuer en passant d'une valeur voisine de 15 à une valeur proche du pK<sub>a</sub> des histidines (pK<sub>a</sub> ≈ 6). ***Nous pouvons alors penser à l'implication de certains azotes amide dans la liaison métallique.***

## 2.4 Caractérisation thermodynamique de la liaison CopH-Cu

La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) constitue un outil de choix pour la détermination des paramètres thermodynamiques de nombreuses interactions biologiques (protéine-protéine, protéine-sucre, protéine-métal...) (Wiseman, T. *et al.* 1989 ; Jelesarov, I. et Bosshard, H. R. 1999 ; Leavitt, S. et Freire, E. 2001). Elle permet de mesurer directement la chaleur associée à la formation d'un complexe et d'en déduire une constante d'affinité. Dans ce contexte, nous avons utilisé cette technique afin d'évaluer l'affinité de la liaison CopH-Cu. Les expériences ont été réalisées à température constante, dans une enceinte adiabatique, par titrage d'une solution de protéine d'environ 1,5 mL par une solution de chlorure de cuivre (injections de 5 ou 10 µL de CuCl<sub>2</sub>), préparée extemporanément. Après chaque ajout d'une petite quantité de cuivre, la chaleur absorbée ou fournie pour maintenir la température constante est mesurée. De là, trois paramètres fondamentaux (l'enthalpie, la stoechiométrie, et les constantes d'affinité) peuvent être déduits. L'entropie est calculée à partir des constantes d'affinité et de l'enthalpie (voir le chapitre « Matériel et Méthodes »).

### 2.4.1 Le choix des concentrations en protéine et CuCl<sub>2</sub>

Les concentrations nécessaires pour évaluer l'interaction étudiée dépendent de la valeur de la constante de dissociation. Or nous n'avons a priori aucune idée précise de l'affinité la liaison CopH-Cu, que nous cherchions par là même à calculer. Seule la constante

de dissociation déterminée par compétition avec la glycine (voir paragraphe 1.2.2) pouvait nous aider à faire un choix quant aux concentrations à utiliser. Nous nous sommes alors basés sur cette valeur ( $K_d = 500$  nM), en gardant à l'esprit que la constante relative au cuivre devait être plus faible, et en supposant la présence d'un seul site de liaison au cuivre sur la protéine. Dans ce cas, pour obtenir un facteur de Wiseman  $c$  optimal (par exemple  $c \approx 50$  – voir le chapitre « Matériels et Méthodes »), la concentration en protéine s'écrit :

$$[\text{protéine}] = c / K_a \text{ avec } K_a = 1 / K_d = 1 / (500 \times 10^{-9}) > 2 \times 10^6.$$

$$\text{D'où } [\text{protéine}] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M} = 25 \text{ } \mu\text{M}.$$

Afin d'être certains d'avoir un signal suffisamment intense, nous avons opté pour une **concentration en protéine de 100  $\mu\text{M}$** . Par ailleurs, la concentration en réactif devant généralement être 10 fois supérieure à la concentration en macromolécule, nous avons commencé nos essais par  $[\text{CuCl}_2] = 1 \text{ mM}$ . Comme nous allons le voir, ces choix se sont avérés pertinents.

#### 2.4.2 Le choix du tampon

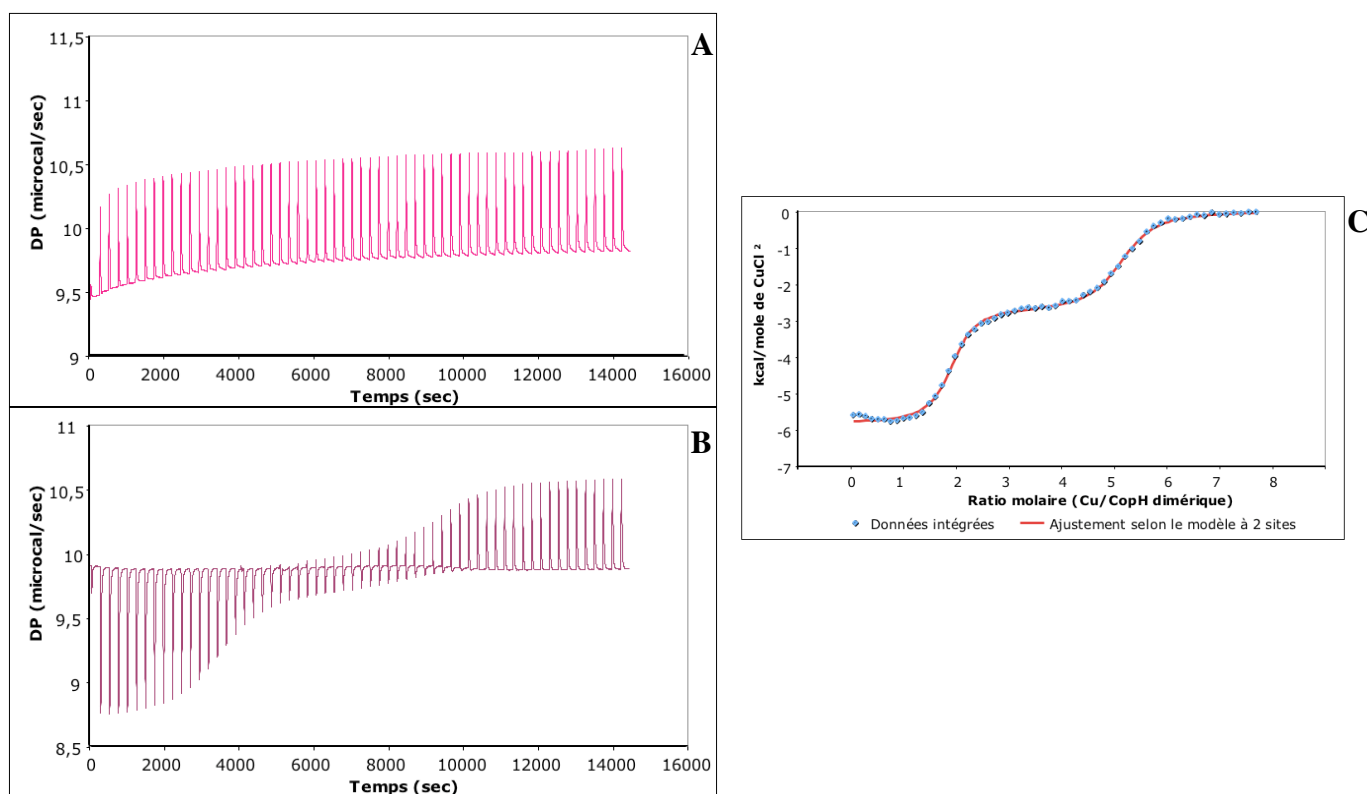
A une concentration de 1 mM, le chlorure de cuivre précipite dans certains tampons, comme le phosphate. Leur utilisation aboutirait donc à l'obtention de valeurs thermodynamiques erronées. D'autre part, le tampon ne doit pas posséder une affinité trop élevée pour le cuivre : en effet, celui-ci doit rester facilement accessible à la protéine. Plus la constante d'affinité du tampon pour le cuivre est élevée, plus la protéine aura des difficultés à le lui arracher. Dans ce cas, la valeur de la constante d'affinité apparaîtra plus faible qu'elle ne l'est en réalité. Si l'interaction cuivre-tampon est trop forte, elle peut même masquer un site de fixation, la constante d'affinité protéine-cuivre devenant inférieure à la limite de détection de l'appareil. Par exemple, le tampon Tris a une affinité pour le cuivre de  $10^4 \text{ M}^{-1}$  (Martell, A. E. *et al*, 2004). Le tampon Hepes a une affinité peu élevée pour le cuivre, comme le MOPS, dont les constantes d'affinité  $K_a$  sont proches de  $10^2 \text{ M}^{-1}$  (Martell, A. E. *et al*. 2004). De plus, au pH considéré (pH = 7,5), la solubilité du cuivre y est supérieure au millimolaire. Ces derniers tampons peuvent donc a priori convenir pour cette étude. Cependant, les premiers essais effectués en tampon Hepes ne nous ont pas donné de résultats reproductibles. Le MOPS a alors été choisi comme tampon de travail et la protéine a été dialysée contre ce tampon. Concernant la solution de chlorure de cuivre, plusieurs essais ont montré une mauvaise reproductibilité et une instabilité des signaux lorsque le  $\text{CuCl}_2$  était préparé en tampon MOPS : nous avons choisi de le dissoudre simplement dans l'eau. Les

variations éventuelles de pH dues à la dilution du tampon MOPS contenu dans la cellule (1,5 mL) par l'eau ajoutée (provenant de la solution de  $\text{CuCl}_2$ , dans la seringue  $< 0,3$  mL) ont été considérées comme négligeables. *Les mesures microcalorimétriques ont donc été réalisées, en tampon MOPS 20 mM pH = 7.5 (le cuivre étant initialement dissout dans l'eau), à  $25^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ .*

### 2.4.3 Les titrages protéiques par $\text{CuCl}_2$

Les mesures d'ITC nécessitent un certain temps. En prenant en compte le dégazage préalable des solutions, l'équilibrage de l'appareil, le retour à l'équilibre après chaque ajout de cuivre..., un titrage basé sur 30 injections de cuivre dure en moyenne 4 heures. D'autre part, afin de minimiser l'erreur expérimentale et dans un souci de reproductibilité, chaque expérience a été reproduite trois fois, à des périodes différentes, sur des lots de protéines différents.

La courbe de titrage représentant l'interaction entre CopH et les ions  $\text{Cu}^{2+}$  est représentée sur la figure 98. Après avoir déterminé le tampon adéquat (voir annexe), l'obtention de cette courbe a nécessité son optimisation par la mise au point de différents paramètres (intensité du signal, concentrations en protéine et en cuivre, nombre d'injections de cuivre, volume et temps entre chaque injection...). Les différents tests ont abouti à l'utilisation d'une solution de CopH, concentrée à  $100 \mu\text{M}$  dans du MOPS 20 mM pH = 7,5, et une solution de  $\text{CuCl}_2$  concentrée à  $1,7 \text{ mM}$  dans l'eau. Cette dernière a été ajoutée à la solution protéique suivant 60 injections de  $5 \mu\text{L}$ , chacune d'elles étant séparée de 240 secondes.



**Figure 98** : Titrage calorimétrique de CopH par les ions Cu(II). (A) Données brutes du blanc : 60 injections de 5  $\mu$ L de  $\text{CuCl}_2$  1.7 mM dans la cellule contenant le tampon MOPS 20 mM pH = 7.5. (B) Données brutes issues de 60 injections de 5  $\mu$ L de  $\text{CuCl}_2$  1.7 mM dans la cellule contenant la protéine CopH 100  $\mu$ M en MOPS 20 mM pH = 7.5. (C) Données intégrées après soustraction du blanc et ajustement de la courbe selon un modèle à deux sites indépendants.

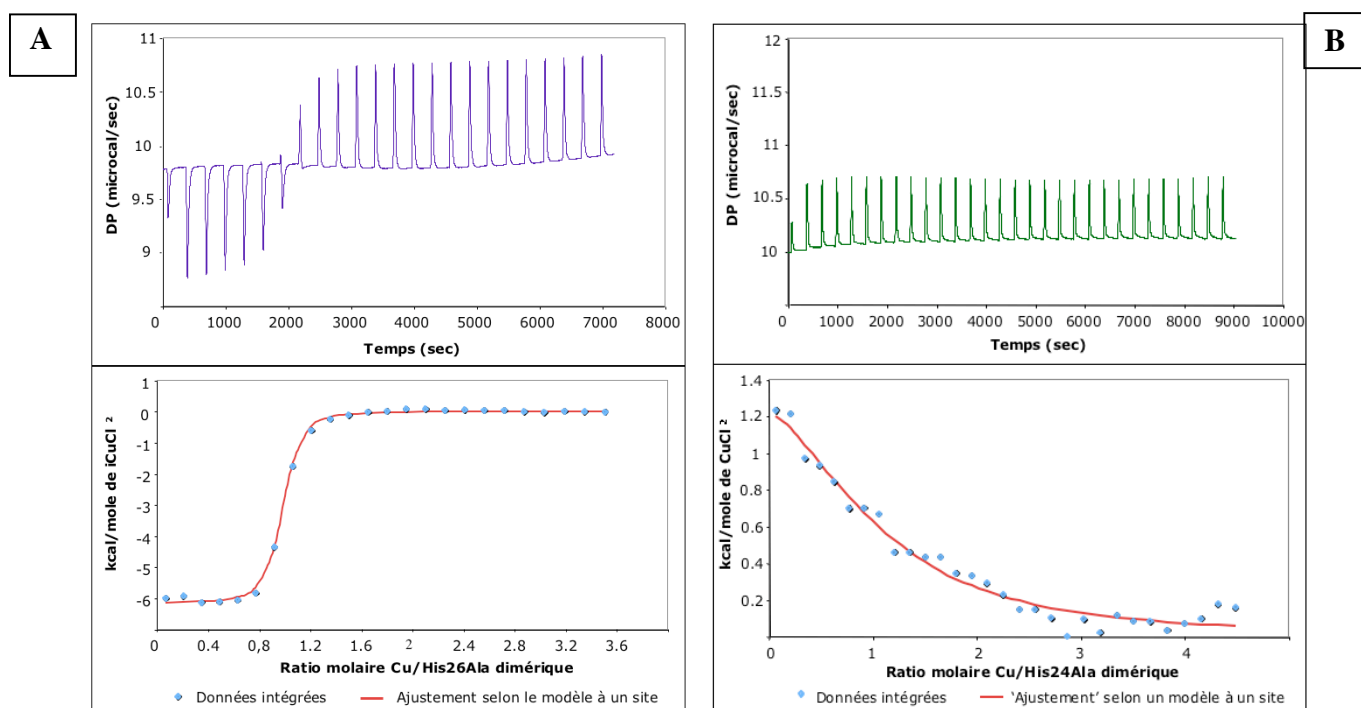
La courbe B représente les résultats bruts, c'est-à-dire les chaleurs mesurées après chaque ajout de solution de  $\text{CuCl}_2$  dans la cellule. Au début du titrage, l'interaction CopH-Cu provoque un dégagement de chaleur (pic dirigés vers le bas) : la formation du complexe CopH-Cu est exothermique dans le tampon MOPS. Ensuite, la chaleur dégagée diminue à chaque injection de cuivre. Une zone intermédiaire où les pics sont dirigés vers le haut et vers le bas est observée après 8000 secondes environ. Enfin, les pics se stabilisent vers le haut, seule l'enthalpie de dilution est alors mesurée : cette partie est en effet identique au phénomène observé dans le cas du blanc (ajout de  $\text{CuCl}_2$ , dissout dans l'eau, dans le tampon MOPS 20 mM pH = 7.5 - courbe A). La courbe C représente les données traitées, après soustraction du blanc, et intégration des données brutes (chaleur dégagée par mole de  $\text{CuCl}_2$ ). Le traitement a été effectué à l'aide du programme fourni par le fabricant, Origin<sup>®</sup> pour ITC. **Les données ont pu être ajustées selon un modèle à deux sites de fixation** (Fig. 98C - courbe rouge). Un premier point d'équivalence peut être déterminé, correspondant à une stoechiométrie d'environ 2 ions Cu(II) par protéine dimérique. Un deuxième point d'équivalence peut être défini avant la fin du titrage correspondant à l'occupation de tous les sites, après 5 équivalents de cuivre par dimère.



La figure 99 correspond au titrage des mutants par le cuivre. Après optimisation du signal, les différents tests ont abouti à l'utilisation de solutions de protéine mutée (His26Ala, His24Ala, ou His24-26Ala), concentrées à 100  $\mu\text{M}$  dans du MOPS 20 mM pH = 7.5, et une solution de  $\text{CuCl}_2$  concentrée à 1 mM dans l'eau. Cette dernière a été ajoutée à la solution protéique suivant 25 injections de 5  $\mu\text{L}$  (dans le cas de His26Ala), et 30 injections de 5  $\mu\text{L}$  (dans le cas de His24Ala ou His24-26Ala), chacune d'elles étant séparée de 300 secondes.

La figure 99A représente les chaleurs mesurées après chaque ajout de cuivre dans la cellule. L'interaction **His26Ala-Cu** mène tout d'abord à un dégagement de chaleur, qui décroît ensuite à chaque injection de cuivre : un point d'équivalence peut être évalué à une stoechiométrie d'environ 1 ion  $\text{Cu}^{2+}$  par dimère. **Les données brutes sont ensuite intégrées et ajustées selon un modèle à un site.** La pente de la courbe au niveau du point d'équivalence est très importante ( $100 < c < 1000$ ). Cependant, les essais d'optimisation de la concentration en cuivre ne nous ont pas permis d'obtenir une courbe « plus douce » correspondant à un facteur de Wiseman  $c$  compris entre 10 et 100.

La figure 99B montre les données obtenues pour les mutants **His24Ala et His24-26Ala** : **aucun titrage n'est observé.**



**Figure 99** : Titrage calorimétrique des mutants par les ions  $\text{Cu}(\text{II})$ . (A) Données brutes, résultat de 25 injections de 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuCl}_2$  1 mM dans la cellule contenant la protéine His26Ala 100  $\mu\text{M}$  en MOPS 20 mM pH = 7,5 ; et données intégrées après soustraction du blanc. Ajustement selon un modèle à un site. (B) Données brutes, résultat de 30 injections de 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuCl}_2$  1 mM dans la cellule contenant la protéine His24Ala 100  $\mu\text{M}$  en MOPS 20 mM pH = 7,5 ; et données intégrées après soustraction du blanc. Ajustement des données selon un modèle à un site. Le même profil est obtenu avec le double mutant His24-26Ala.

Après analyse de toutes ces courbes de titrage, les différents modèles choisis nous ont permis d'ajuster les courbes expérimentales et d'accéder aux paramètres thermodynamiques correspondant aux interactions étudiées. Les moyennes des valeurs obtenues par les différentes expériences réalisées sont reportées dans le tableau 18. Tous ces paramètres ont été évalués avec une incertitude inférieure à 10 %. Les résultats présentés correspondent aux valeurs moyennes sur les trois séries de titrages effectués.

Protéine (dimérique)	CopH (modèle à 2 sites indépendants)		His26Ala (modèle à 1 site)	His24Ala et His24-26Ala
Stoechiométrie ( $n$ )	$1,6 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$	
$K_d$ (nM)	$36 \pm 4$	$2500 \pm 200$	$200 \pm 18$	
$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$2,8 \times 10^7 \pm 3 \times 10^6$	$4 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^4$	$5 \times 10^6 \pm 5 \times 10^5$	pas de titrage
$\Delta H$ ( $kJ.mol^{-1}$ )	$-25,1 \pm 0,17$	$-12,1 \pm 0,17$	$-23,4 \pm 0,17$	visible
$\Delta S$ ( $J.mol^{-1}.K^{-1}$ )	58,5	66,5	50,6	

Tableau 18 : Paramètres obtenus pour les titrages calorimétriques de CopH et ses mutants.

Les simulations révèlent, *pour la protéine sauvage*, des *stoechiométries de  $1,6 \pm 0,2$  pour le site de haute affinité ( $K_d \approx 36$  nM), et  $2,4 \pm 0,2$  pour le site de plus faible affinité ( $K_d \approx 2,5$   $\mu$ M), par protéine dimérique*. Ces valeurs représentent une stoechiométrie légèrement inférieure à 2 ions  $Cu^{2+}$  par dimère pour le site de haute affinité. La stoechiométrie reste cependant très proche de 2, comme le confirment les expériences de spectrométrie de masse, RPE, spectroscopie UV-visible... D'autre part, il est courant d'obtenir une stoechiométrie  $n$  légèrement au-dessous de la valeur théorique. Tous les sites ne sont pas toujours équivalents d'une molécule de protéine à une autre du fait de divers phénomènes difficiles à maîtriser au cours du titrage comme l'agrégation, le mauvais repliement de certaines protéines... Il est même reporté, dans la littérature, un quasi systématique et léger éloignement de la stoechiométrie de 1 par molécule monomérique, lors des analyses de courbes calorimétriques faisant apparaître 2 sites de fixation (Zhang, Y. et Wilcox, D. E. 2002). Des simulations par le logiciel Origin® ont alors été effectuées en fixant la stoechiométrie de chacun des sites à 2 par dimère. Dans ces conditions, les autres paramètres ( $K_a$  et  $\Delta H$ ) n'ont pas été significativement modifiés. Nous avons alors considéré la stoechiométrie effectivement égale à 2, au moins pour le site de plus haute affinité. Le site de plus faible affinité n'a pu être observé par les autres techniques, excepté

par spectrophotométrie UV-visible où il pourrait correspondre au décalage bathochromique visible sur les spectres correspondants (voir paragraphe 2.5.1).

Concernant le *mutant His26Ala*, les simulations fournissent une *stoechiométrie de  $0,8 \pm 0,2$  pour 1 site par dimère*. Son seul site de fixation du cuivre titré possède une constante de dissociation apparente  $K_{d\ app}$  comprise entre celles caractérisant les sites de faible et forte affinité chez CopH :  $K_{d\ app} = 200\ nM$ . Dans ce cas, en forçant la stoechiométrie à 2, les simulations sont beaucoup moins bonnes et s'éloignent de la courbe expérimentale : une constante  $K_d$  de 1 mM est obtenue, au lieu de 200 nM. Par conséquent, les meilleures simulations confirment le résultat correspondant à 1 site accueillant 1 ion  $Cu^{2+}$  par dimère. Ce résultat est également en accord avec celui donné par la spectrométrie de masse, qui fournit ce même résultat pour l'ensemble des mutants.

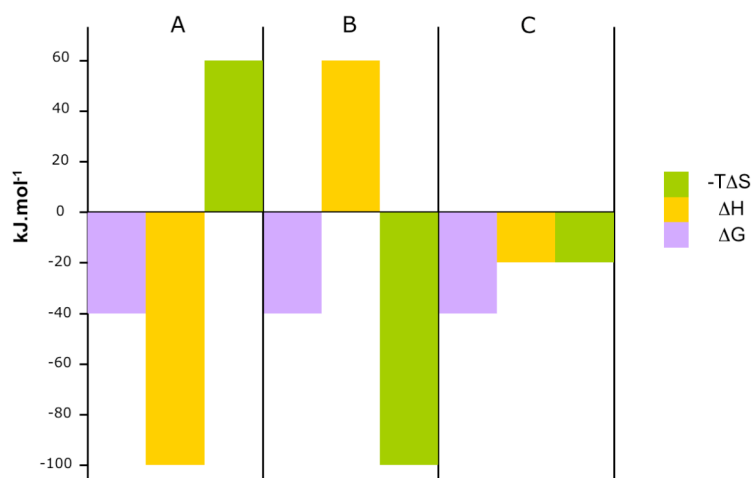
L'enthalpie de la réaction entre CopH et les ions  $Cu^{2+}$  est de  $-25,1\ kJ.mol^{-1}$  et  $-12,1\ kJ.mol^{-1}$  pour chacun des deux sites. La contribution entropique calculée est similaire pour les deux sites :  $58,5\ J.mol^{-1}.K^{-1}$  et  $66,5\ J.mol^{-1}.K^{-1}$ . Ces valeurs peuvent nous permettre d'évaluer la nature de l'interaction CopH-Cu (Ladbury, J. E. et Doyle, M. L. 2004) (Fig. 100). Comme nous l'avons décrit dans le chapitre « Matériel et Méthodes », Ladbury, J. E. et Doyle, M. L. ont pu établir un diagramme schématique représentant les différents profils thermodynamiques d'interactions moléculaires rencontrées la plupart du temps en biologie. Ce diagramme se fonde sur les contributions relatives de l'entropie et de l'enthalpie des interactions.

La contribution enthalpique reflète la force des interactions entre le ligand et la protéine par rapport à celles entretenues avec le solvant. Ces liaisons sont principalement dues à la formation de liaisons hydrogène et aux interactions de Van der Waals. Une enthalpie d'interaction favorable requiert un placement correct des groupes donneurs et accepteurs d'électrons dans le site de fixation. Pour la protéine comme pour le ligand, ce sont des groupements polaires qui interviennent dans ce type d'interaction et leur enthalpie de désolvatation est défavorable. L'enthalpie globale de la réaction dépend de ses deux processus.

La contribution entropique peut provenir de deux phénomènes : le premier est dû à un réaménagement du solvant qui s'opère autour de la protéine lors de la reconnaissance. Bien souvent cette entropie de solvation est favorable lorsque les surfaces mises en jeu dans la reconnaissance sont hydrophobes. En effet, les molécules d'eau présentes dans les premières sphères de solvation de la protéine et/ou du ligand sont repoussées par le rapprochement des surfaces hydrophobes et relarguées dans la solution. Le deuxième phénomène est dû à une

diminution des degrés de liberté du ligand ou de la protéine au moment de l'interaction. Cette contribution entropique est souvent défavorable. En effet, un ligand en solution peut adopter plusieurs conformations dues aux rotations autour des angles de torsion par exemple. L'interaction avec la protéine contraint le ligand dans une seule conformation, ce qui engendre une perte en entropie.

Dans notre cas, pour chacun des deux sites,  $\Delta H < 0$  et  $\Delta S > 0$  (à 25°C,  $\Delta H_{site\ fort} = 25,1\text{ kJ.mol}^{-1}$ ,  $\Delta H_{site\ faible} = 12,1\text{ kJ.mol}^{-1}$  et  $-T\Delta S \approx -1,6\text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Par conséquent, l'interaction CopH-Cu correspond à la famille d'interactions présentées dans la case C (Fig. 100). Bien que l'interaction CopH-Cu (protéine-métal) fasse certainement intervenir des phénomènes plus complexes que ceux décrits et classés selon les groupes A, B et C représentés dans la figure 100, on peut considérer que *la liaison CopH-Cu ferait donc appel à une contribution de nature hydrophobe accompagnée d'une légère contribution provenant de liaisons de type hydrogène, sans induire de grands changements conformationnels ( $-T\Delta S \approx 0$ )*. Cette dernière observation est en accord avec les résultats obtenus par dichroïsme circulaire et RMN.



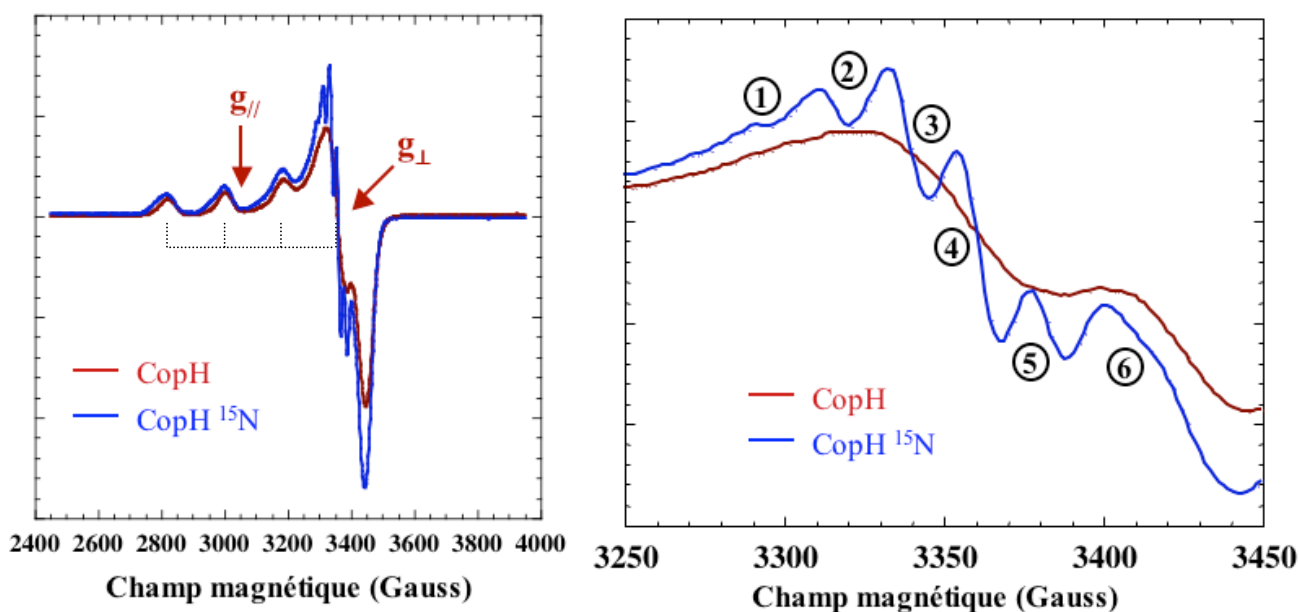
**Figure 100 :** Diagramme schématique représentant différents profils thermodynamiques d'interactions moléculaires souvent rencontrés en biologie : (A) fortes liaisons hydrogène accompagnées de changements conformationnels ; (B) liaisons dominées par des interactions hydrophobes ; (C) contributions hydrophobes et faible contribution favorable de liaisons hydrogène (Ladbury, J. E. et Doyle, M. L. 2004).

## 2.5 Caractérisation spectroscopique et structurale du site cuivre

### 2.5.1 Caractérisation structurale du site cuivre par RPE

*\* CopH : étude en onde continue*

La RPE en onde continue permet de mettre en évidence les couplages forts, de l'ordre d'une dizaine de gauss. Lors de l'étude préliminaire de la protéine CopH, une structure révélatrice de l'existence de couplages hyperfins entre l'électron non apparié du cuivre et ses ligands, a pu être observée dans la zone  $g_{\perp}$  (voir paragraphe 1.3.2). Pour prouver la nature azotée de ces ligands, nous avons reproduit l'expérience avec CopH marquée  $^{15}\text{N}$ , en présence de 1.8 équivalents de cuivre, afin de remplir les deux sites de plus haute affinité observés par microcalorimétrie. Le marquage  $^{15}\text{N}$  permet de simplifier la structure hyperfine des couplages Cu/N, visible dans la région  $g_{\perp}$ , du fait du spin I de l'azote  $^{15}\text{N}$  égal à 1/2 (voir le chapitre « Matériel et Méthodes »). Dans ce cas, si l'on tient compte des premiers résultats obtenus (voir paragraphe 1.3.2) desquels nous avons déduit l'implication de deux atomes d'azote, le nombre de raies observées, relié au nombre d'azotes impliqués dans la liaison au cuivre, devrait être au nombre de quatre... ce qui ne correspond pas aux spectres enregistrés pour la protéine marquée  $^{15}\text{N}$ ... La figure 101 représente les spectres obtenus pour CopH $^{14}\text{N}$  et CopH $^{15}\text{N}$  et leur agrandissement dans la région  $g_{\perp}$ .

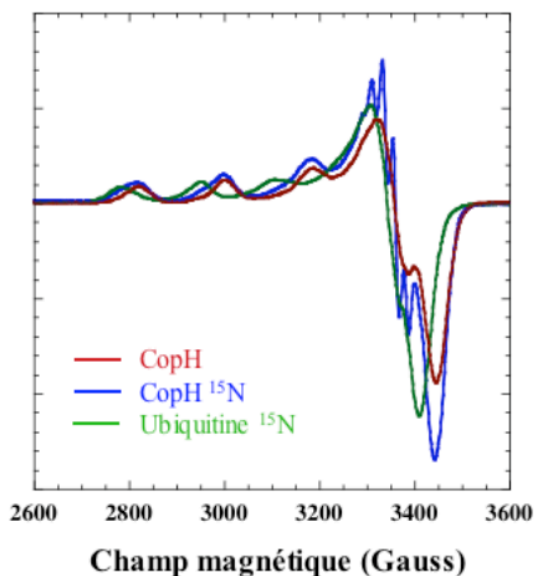


**Figure 101** : Spectres RPE en onde continue de la protéine CopH (en rouge) et CopH marquée  $^{15}\text{N}$  (en bleu). Le graphe de gauche représente le spectre entier ; les zones  $g_{//}$  et  $g_{\perp}$  sont indiquées et les 4 raies du cuivre sont notées en pointillés ( $T = 30\text{ K}$ ,  $P = 1\text{ mW}$  ; modulation : 5 G). Le graphe de droite correspond à l'agrandissement du spectre précédent dans la région  $g_{\perp}$  (modulation : 2 G). Six résonances sont visibles.

Tout d'abord, la région  $g_{//}$  montre bien 4 raies, relatives au couplage hyperfin du cuivre (de spin 3/2). Les caractéristiques (facteurs  $g_{//}$  et  $g_{\perp}$ , et constante de couplage  $A_{//}$ ) ont ensuite été analysées. Le spectre de CopH est caractérisé par  $g_{//} = 2,231$  MHz,  $g_{\perp} = 2,055$  MHz, et  $A_{//} = 555$  MHz (Tab. 19).

Dans la zone  $g_{\perp}$ , six résonances ( $N = 6$ ) peuvent être décomptées. L'écart entre les raies étant constant à première vue, nous pouvons formuler l'hypothèse que toutes les raies ne seraient dues qu'au couplage avec des azotes qui seraient en outre tous équivalents. Suivant la règle du triangle de Pascal ( $2nI+1 = N$  (voir « Matériel et Méthodes »), avec dans notre cas  $N = 6$  et  $I = 1/2$ ), ces 6 résonances peuvent correspondre à ***l'interaction forte du cuivre avec 5 atomes d'azote***. D'autre part, les intensités relatives des 6 raies (1 / 5 / 10 / 10 / 5 / 1) sont en adéquation avec les intensités prévues par les coefficients du triangle de Pascal.

L'ubiquitine, marquée  $^{15}\text{N}$ , protéine n'ayant aucune affinité particulière connue pour le cuivre, a été utilisée comme contrôle (Fig. 102). Les valeurs  $g_{//}$ ,  $g_{\perp}$  et  $A_{//}$ , extraites du spectre de l'ubiquitine ( $g_{//} = 2,278$  MHz,  $g_{\perp} = 2,055$  MHz,  $A_{//} = 505$  MHz), sont nettement différentes de celles caractérisant le spectre de CopH (Tab. 19). De la comparaison de ces valeurs, nous pouvons déduire que les spectres enregistrés pour CopH correspondent bien à la ***signature spécifique de la protéine fixant le cuivre***. D'autre part, la comparaison de ces valeurs avec celle extraites des spectres RPE décrits dans la littérature, révèle que les coefficients  $g_{//}$  et  $g_{\perp}$  et  $A_{//}$  sont proches de ceux relatifs aux spectres de la protéine Prion et montrant les ***interactions Cu/N*** (Cereghetti, G. M. *et al.* 2003 ; Luczkowski, M. *et al.* 2003 ; Van Doorslaer, S. *et al.* 2001).



**Figure 102** : Comparaison des spectres de CopH et de l'ubiquitine. Le spectre de l'ubiquitine est visiblement différent de celui de CopH ( $T = 30$  K,  $P = 1$  mW ; modulation : 5 G).

Protéine	$g_{//}$ (MHz)	$g_{\perp}$ (MHz)	$A_{//}$ (MHz)
<b>CopH</b>	2,231	2,055	555
His24Ala	2,231	2,055	555
His26Ala	2,230	2,055	555
His24-26Ala	2,237	2,055	565
<b>Peptide GGGTH (protéine Prion)</b>			
à pH = 6,0	2,36	2,07	421
à pH = 6,7	2,23	2,05	540
à pH = 7,4	2,22	2,055	541
à pH = 10,0	2,20	2,05	600
Tronquée	2,232	2,055	500
Ubiquitine	2,278	2,055	505

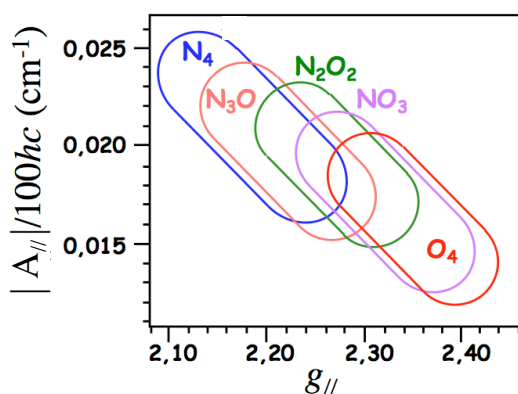
**Tableau 19** : Coefficients  $g_{//}$ ,  $A_{//}$  et  $A_{\perp}$  correspondant aux spectres des protéines CopH et simples mutants, protéine CopH tronquée, et protéine Prion, liées aux ions Cu(II), ainsi que l'ubiquitine en présence d'ions Cu(II).

\* Les mutants histidine

L'étude des spectres des protéines mutées, en présence de 1,8 équivalents de cuivre, dans la région  $g_{//}$ , révèle les mêmes facteurs  $g_{//}$  et  $A_{//}$  extraits du spectre de la protéine sauvage (Tab. 19). La simple et la double mutations n'apportent donc pas de changement structural significatif, se répercutant au niveau des coefficients  $g_{//}$  et  $A_{//}$  ( $g_{// \text{ CopH}} = g_{// \text{ protéines mutées}}$  et  $A_{// \text{ CopH}} = A_{// \text{ protéines mutées}}$ ).

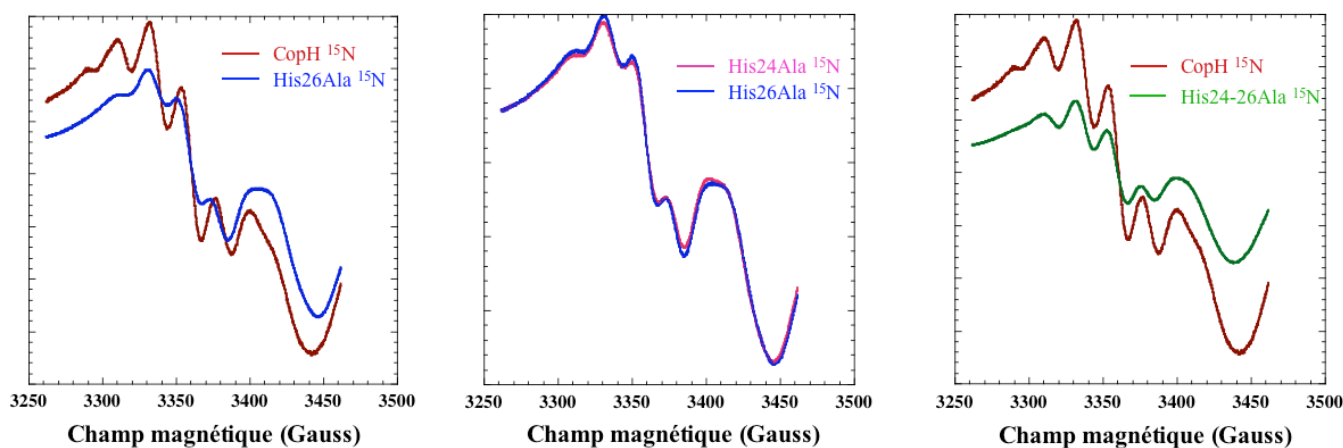
D'autre part, il est à noter que les coefficients  $g_{//}$  et  $A_{//}$  des spectres enregistrés pour la protéine Prion sont significativement modifiés par le nombre d'azote en interaction avec le cuivre. Dans un souci de clarté, seules les données RPE concernant un peptide représentant un site cuivre de la protéine Prion ont été reportées dans le tableau 19 (Hureau, C. *et al.* 2006). Lorsque le pH du milieu augmente, le nombre d'atomes d'azote en interaction avec le cuivre augmente aussi (Hureau, C. *et al.* 2006 ; Van Doorslaer S. *et al.* 2001) et les valeurs de  $g_{//}$  et  $A_{//}$  passent de  $g_{//} = 2,36$  MHz et  $A_{//} = 421$  MHz lorsque le cuivre est lié à un seul atome d'azote à pH = 6,0, à  $g_{//} = 2,20$  MHz et  $A_{//} = 600$  MHz lorsque le cuivre se fixe à quatre atomes d'azote à pH = 10. Ceci est en accord avec les résultats présentés par Peisach, J. et Blumberg, W. E., en 1974, et montrant l'évolution du nombre de ligands azotés en fonction des valeurs de  $g_{//}$  et  $A_{//}$  caractérisant le spectre RPE de la protéine étudiée (Fig. 103).

L'augmentation de la valeur de la constante de couplage  $A_{//}$  concomitante à la décroissance de celle de  $g_{//}$  est caractéristique du remplacement progressif des ligands oxygénés par des ligands azotés quand le pH augmente. Dans notre cas, ces valeurs restent inchangées quel que soit le spectre de la protéine, CopH ou ses mutants. Ceci nous amène alors à penser que le même nombre d'azotes serait impliqué dans la liaison aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  au sein de chacune des protéines, sauvage et mutées.



**Figure 103** : Représentation des domaines donnés par ( $g_{//}$  ;  $a_{//}$ ) et correspondant au type et au nombre de ligands du cuivre. Le nombre de ligands azotés augmente lorsque  $g_{//}$  diminue et  $A_{//}$  augmente.

Afin de pouvoir comparer le nombre de ligands azotés du cuivre chez les mutants, plusieurs spectres des protéines mutées marquées  $^{15}\text{N}$  ont été enregistrés et analysés dans la région  $g_{\perp}$  (Fig. 104). Les spectres des deux simples mutants marqués  $^{15}\text{N}$  sont parfaitement superposables et paraissent ne contenir que 5 raies de résonance. Le spectre du double mutant marqué  $^{15}\text{N}$ , quant à lui, ne montre que 4 raies a priori visibles.



**Figure 104** : Agrandissements de la région  $g_{\perp}$  des spectres relatifs à CopH et ses mutants, marqués  $^{15}\text{N}$  ( $T = 30\text{ K}$ ,  $P = 1\text{ mW}$  ; modulation :  $2\text{ G}$ ).

Dans tous les cas, les résonances ne sont pas clairement définies et il est difficile de les décompter avec exactitude. Les mêmes spectres ont donc été enregistrés sur les protéines mutées marquées  $^{15}\text{N}$  après échange proton  $^1\text{H}$  / deutérium  $^2\text{D}$ , ce qui permet d'affiner les



raies et rendre ainsi les couplages Cu/N plus visibles. (Fig. 105). Nous pouvons alors affirmer l'existence de 6 résonances sur chacun des spectres des protéines sauvage et mutées. Afin de confirmer ce résultat, les spectres ont également été observés en dérivée seconde. La figure 106 montre le résultat obtenu pour CopH et le double mutant His24-26Ala : les 6 résonances sont bien visibles. La même observation peut être faite à partir des spectres de deux simples mutants.

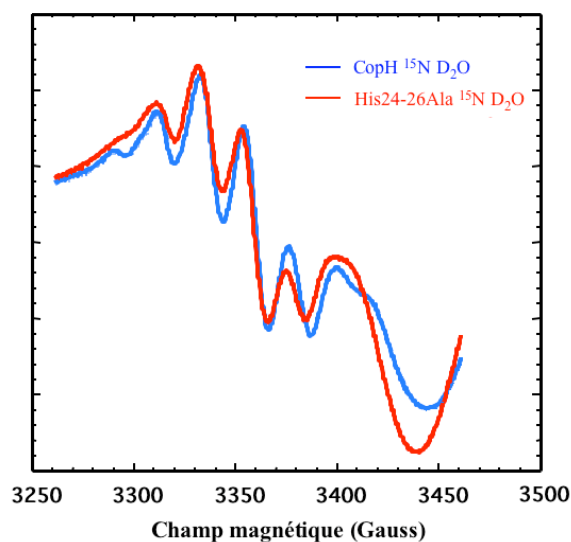


Figure 105 : Spectres RPE de CopH et du double mutant marqués  $^{15}\text{N}$ , en Hepes- $\text{D}_2\text{O}$  ( $T = 30 \text{ K}$ ,  $P = 1 \text{ mW}$ ; modulation : 2 G).

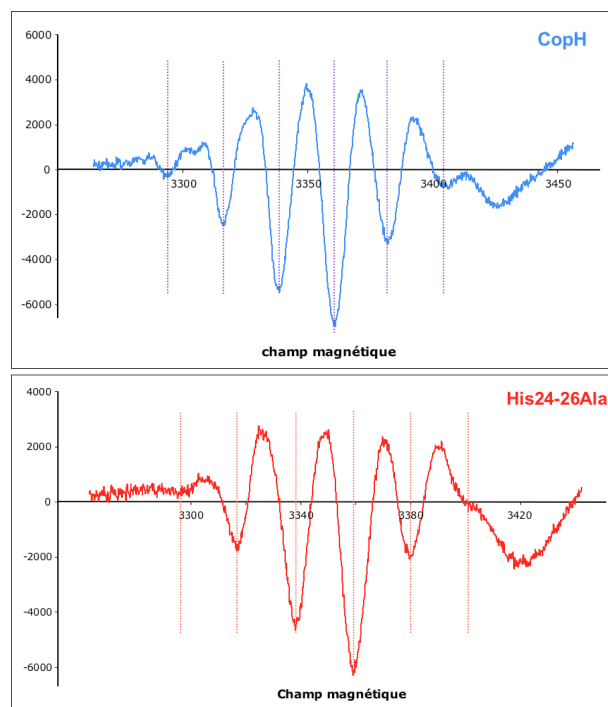
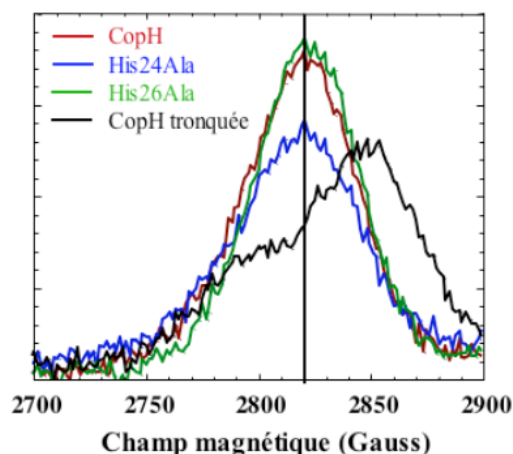


Figure 106 : Spectre RPE de CopH  $^{15}\text{N}$  et His24-26Ala  $^{15}\text{N}$  en Hepes- $\text{D}_2\text{O}$ , observé en dérivée seconde. Les 6 résonances sont plus clairement visibles pour chacune des deux protéines.

Il est alors possible de conclure sur *l'interaction forte du cuivre avec 5 atomes d'azote au sein de la protéine CopH et de ses mutants*. En revanche, la différence de netteté des raies de couplage, observée avec la présence d'une puis deux mutations, pourrait s'expliquer par une affinité plus faible des simples mutants, et en particulier du double mutant, pour les ions  $\text{Cu(II)}$ . Cette interprétation rejoindrait les résultats obtenus par ITC. *De-là, nous pouvons avancer que les deux histidines ne sont pas directement en interaction avec les ions  $\text{Cu(II)}$ . Elles jouent cependant un rôle essentiel dans l'affinité pour le métal.* Nous pouvons alors nous poser la question de l'origine des azotes en interaction forte avec le cuivre...

Enfin, l'enregistrement du spectre de la protéine tronquée (ne possédant plus la région N-terminale de localisation des deux histidines), en présence de 2 équivalents de cuivre, a été également réalisé : le spectre est largement décalé, non superposable à celui de CopH ni à celui des mutants (Fig. 107). *Cela conforte l'hypothèse que le site cuivre serait situé du côté N-terminal, comportant les deux histidines.*

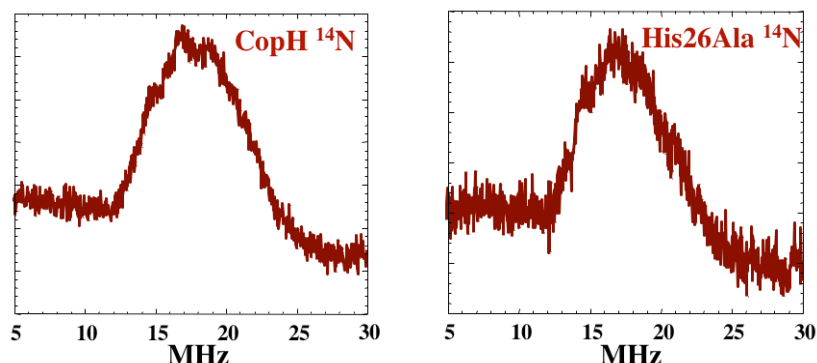


**Figure 107** : Spectres RPE de CopH, et de ses mutants, comparés à ceux de la protéine CopH tronquée. Le spectre présenté correspond à l'agrandissement de la bande à bas champ (T = 30 K, P = 1 mW ; modulation : 2 G).

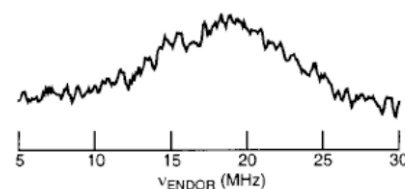
*\* Les spectres ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance)*

L'ENDOR que nous avons utilisée correspond à une RPE pulsée dont la séquence de pulses a été étudiée pour mettre en évidence les couplages intermédiaires, de l'ordre de 6 à 60 MHz, soit 2 à 20 Gauss. Dans ce cas, sont observées les transitions entre niveaux de même nombre de spin  $m_s$ . Les spectres ont été enregistrés à partir de la protéine sauvage  $^{14}\text{N}$  et du simple mutant His26Ala  $^{14}\text{N}$ . La figure 108 montre des spectres similaires pour les deux protéines, et caractérisés par des raies larges. Leur position, centrée sur 17 MHz correspond exactement au couplage observé dans la région  $g_{\perp}$  des spectres en continu (Fig. 108). Ces raies sont semblables à celles attribuées à l'interaction Cu/N, où N est un azote appartenant à la chaîne polypeptidique et non au cycle imidazole d'une histidine (azote le plus éloigné de la liaison peptidique et donc le plus proche du ligand -Fig. 110), au sein de la protéine Prion (Van Doorslaer, S. *et al.* 2001) (Fig. 109). En particulier, la largeur de la raie (10 MHz) semble correspondre à une interaction un peu anisotrope reportée pour les atomes

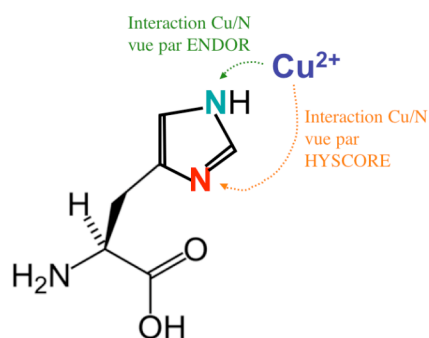
amide de la chaîne polypeptidique. *Les 5 atomes d'azote en interaction forte avec le cuivre appartiendraient donc à la chaîne peptidique, comme nous l'avait suggéré les spectres de dichroïsme circulaire.*



**Figure 108** : Spectres ENDOR de la protéine CopH et du mutant His26Ala (T = 15 K, P = 1 mW, enregistrés dans la zone  $g_{\perp}$ ).



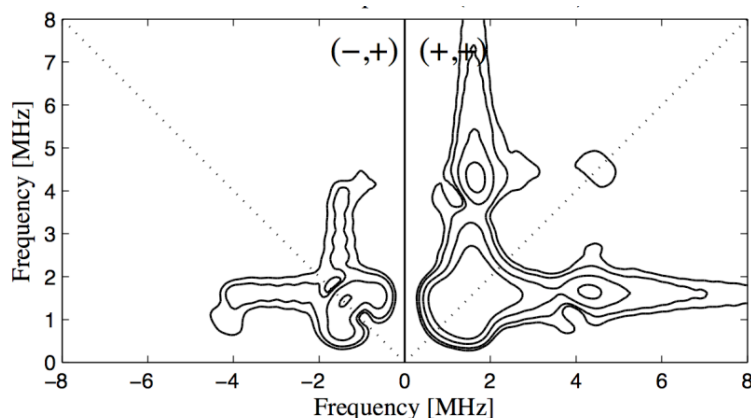
**Figure 109** : Spectre ENDOR de la protéine Prion en présence de cuivre Cu(II) à pH = 7,4 (Van Doorslaer, S. *et al.* 2001)



**Figure 110** : Formule développée d'une histidine. Lors d'une interaction Cu/Histidine, l'interaction Cu/N « vue » par ENDOR correspond à celle existant entre l'ion cuivre et l'atome d'azote le plus proche (marqué en vert). L'interaction vue par HYSCORE correspond à celle entre le cuivre et l'atome d'azote plus éloigné, marqué en rouge.

\* Les spectres HYSCORE (Hyperfine Sublevel Correlation)

L'HYSCORE est un type de RPE pulsée permettant de voir les couplages faibles, de l'ordre de 1-8 MHz (Fig. 110). Les spectres correspondant aux protéines sauvage et mutées, non marquées, sont tous similaires (Fig. 111).



**Figure 111** : Spectre HYSCORE du mutant His26Ala. Les spectres HYSCORE de CopH et des autres mutants sont tous identiques (T = 15 K, P = 1 mW, enregistrés dans la zone  $g_{\perp}$ ).

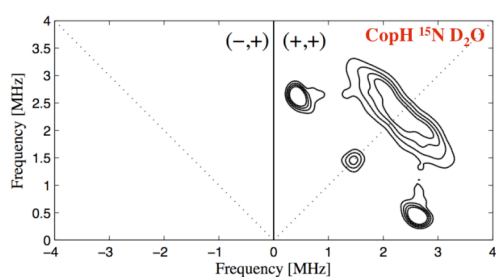
Tout d'abord, l'allure des taches de résonance est caractéristique de l'azote, en particulier les résonances rassemblées en forme d'oreilles de lapin, dans la partie gauche du spectre. Nous pouvons distinguer les deux taches des doubles quanta de l'azote aux coordonnées (-4 MHz, 1,5 MHz) dans la partie gauche, et les deux résonances à (4,2 MHz ; 1,6 MHz) dans la partie droite. L'interprétation est difficile car le spin de l'azote  $^{14}\text{N}$  est égal à 1. Par conséquent, nous avons effectué le même type d'expérience sur CopH et His24-26Ala marqués  $^{15}\text{N}$  (Fig. 112 et 113). Deux résonances sont nettement visibles à (2,2 MHz ; 0,4 MHz), symétriques par rapport à la diagonale. Elles sont caractéristiques d'un azote faiblement couplé. D'autre part, les taches sont bien définies. Elles ne forment pas plusieurs taches larges résultant en un halo par-dessus la diagonale, comme dans le cas d'interactions anisotropes (voir l'halo dû au deutérium sur la figure 112). ***Cet atome d'azote serait donc en interaction, de nature isotrope, avec le cuivre. Ce genre d'interaction s'explique souvent par une délocalisation de liaisons, en particulier de liaisons  $\pi$ .*** A partir de là, trois raisons nous ont amenés à produire de nouveaux mutants :

- \* cet atome d'azote est visible sur tous les spectres HYSCORE (protéines sauvage et mutées). ***Il n'appartient donc pas au cycle imidazole d'une histidine.***

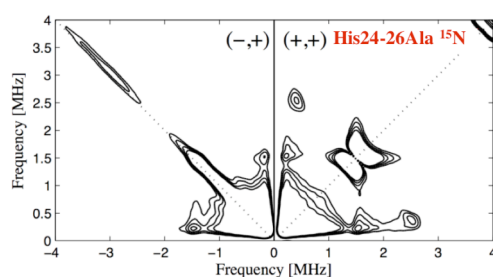
- \* il est en interaction de nature isotrope avec Cu(II) (raisonnablement *via* une délocalisation de liaisons  $\pi$ )

- \* le site de liaison métallique est situé a priori du côté N-terminal.

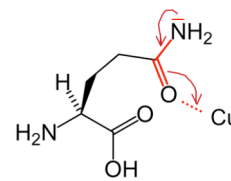
Nous avons alors cherché quel(s) acide(s) aminé(s) serait(ent) susceptible(s) de participer au couplage avec les ions Cu(II) dans la région proche des histidines. Les glutamines, nombreuses dans cette zone, sont des candidats de choix (Fig. 114). Nous avons alors décidé de muter les deux glutamines en position 19 et 23 (Fig. 115) afin de confirmer, ou non, leur implication dans l'interaction avec l'électron non apparié du cuivre, *via* les liaisons  $\pi$ . Nous les avons remplacées par des sérines, dont la structure est relativement proche des glutamines, sans posséder d'atome d'azote. Cependant, les spectres HYSCORE des deux mutants Gln19Ser et Gln23Ser sont toujours similaires à celui de la protéine sauvage. L'atome d'azote faiblement couplé de manière anisotrope n'appartient donc pas aux glutamines 19 et 23. D'autres glutamines existent en N-terminal en positions 14, 15 et 17, et ailleurs dans la séquence de la protéine. Il n'est pas exclu qu'un acide aminé, éloigné du site cuivre dans la séquence, soit en interaction avec les ions Cu(II) grâce à un repliement approprié de la protéine.



**Figure 112** : Spectre HSCORE de la protéine CopH  $^{15}\text{N}$  en présence de  $\text{D}_2\text{O}$  ( $T = 15 \text{ K}$ ,  $P = 1 \text{ mW}$ , enregistré dans la zone  $g_{\perp}$ ).



**Figure 113** : Spectre HSCORE du double mutant His24-26Ala  $^{15}\text{N}$  ( $T = 15 \text{ K}$ ,  $P = 1 \text{ mW}$ , enregistré dans la zone  $g_{\perp}$ ).



**Figure 114** : Interaction potentielle Glutamine – Cu *via* une délocalisation de liaisons  $\pi$ .

1    ADKLESTNPA    GWSQQAQIQV    AA**QH**DHGARA    GLSSLSAIKP    GPEASLFGSE    50  
61    APAGSTSRVV    DVAPGLKYVN    VDSGETVTFK    SGASEITFAF    AQLDRNKAVA    100  
101    LNVLPPELPG    GQGVVVYIEQ    SELYIGG    127

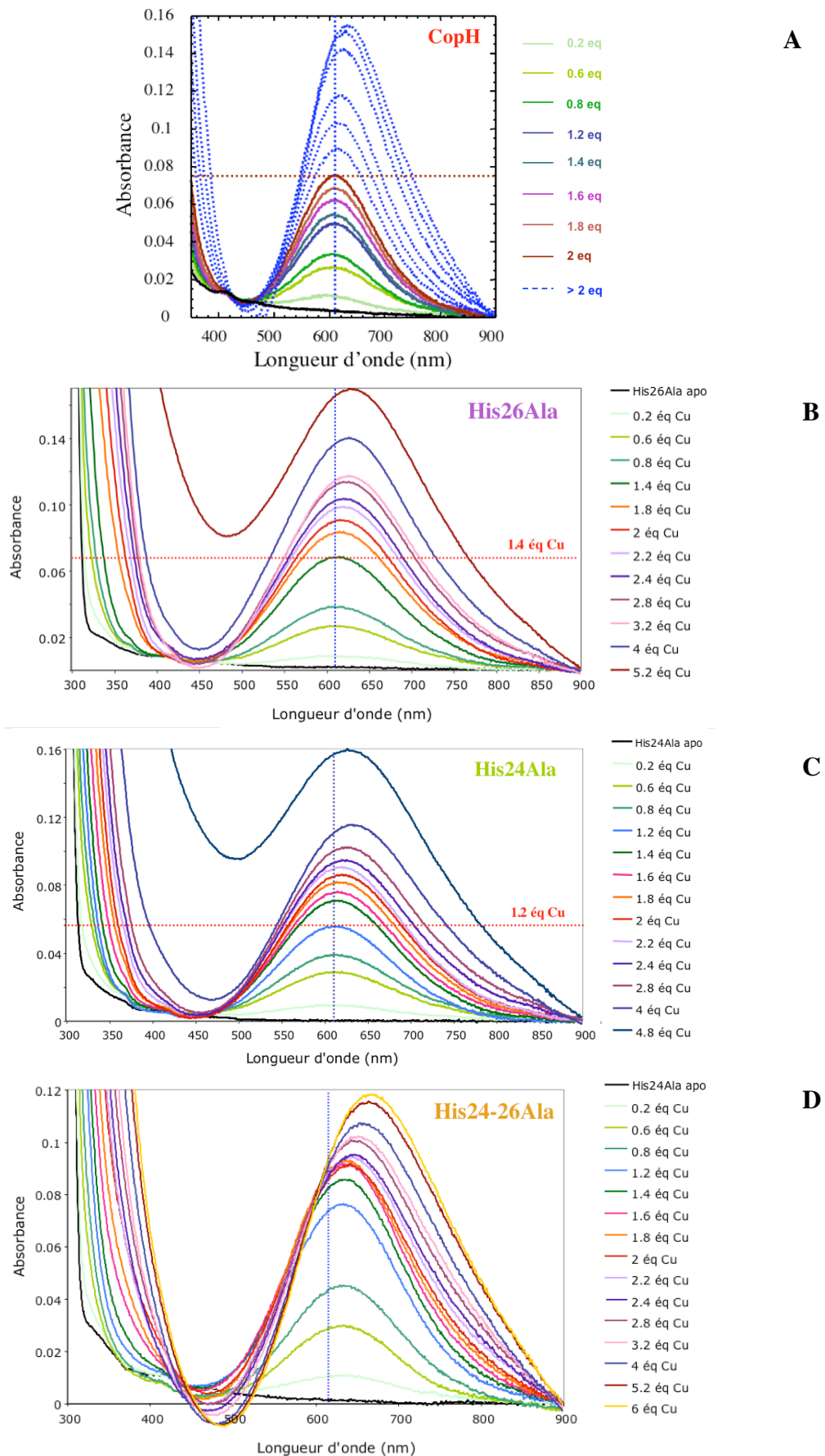
**Figure 115** : Séquence de la protéine CopH après maturation. Les deux glutamines en positions 19 et 23 sont écrites en bleu.

En conclusion, la RPE confirme que *les histidines, a priori ligands du cuivre, n'interagissent pas, en réalité, avec les ions Cu(II). Les azotes interagissant avec le cuivre, probablement au nombre de 5, seraient des azotes amides* appartenant à la chaîne peptidique. Le *cuivre* est également en *interaction faible avec un autre azote*, interaction de nature *isotrope*.

## 2.5.2 Titrages par spectroscopie UV-visible et RPE

### \* Titrages UV-visible

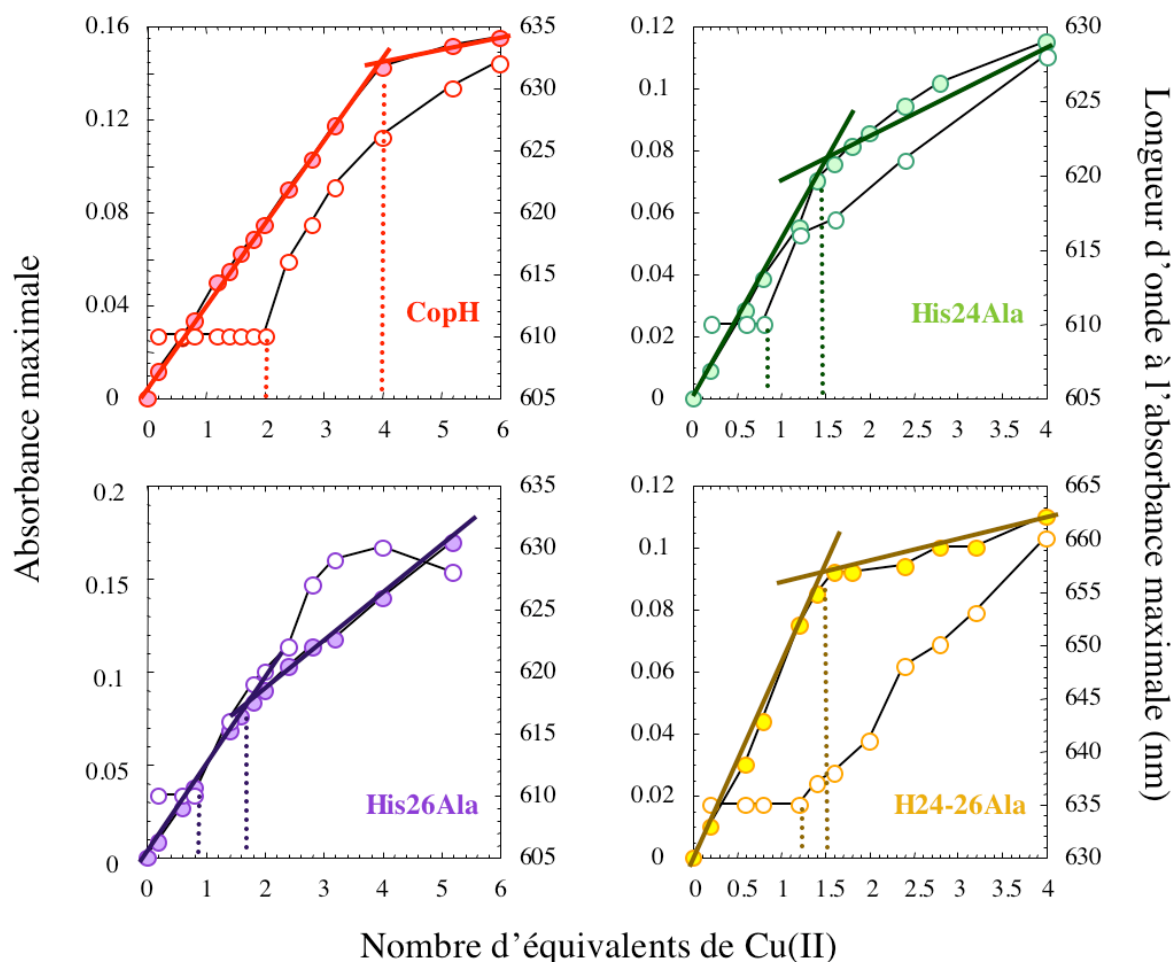
La liaison du cuivre sur la protéine sauvage ainsi que sur les différents mutants se traduit par l'apparition d'une bande d'absorbance aux environs de 600 nm. (Fig. 116). Cette bande dépend également de l'environnement du cuivre et sa position dépend du type de ligands (soufre, azote ou oxygène) (Sigel, H. et Martin, R. B. 1982). La figure 116 montre les spectres UV-visible enregistrés au cours des titrages de chacun des trois mutants histidine par les ions Cu(II), comparés à celui obtenu pour la protéine sauvage. De la même façon qu'avec CopH, les changements spectraux ont été analysés entre 300 et 900 nm, en fonction de quantités croissantes de cuivre, ajoutées à la protéine considérée en tampon Hepes.



**Figure 116 :** Titrages UV-visible des trois mutants His26Ala (B), His24Ala (C) et His24-26Ala (D) par des quantités croissantes de  $\text{CuCl}_2$ , en comparaison avec celui obtenu pour la protéine sauvage (A).

Concernant les simples mutants His26Ala et His24Ala, une bande d'absorbance apparaît tout d'abord à 610 nm. Puis son intensité augmente de façon linéaire jusqu'à un équivalent de cuivre par rapport à la quantité de protéine (protéine dimérique). L'absorbance continue à croître pour des ajouts de cuivre supplémentaires, les bandes d'absorbance se décalant vers les longueurs d'onde plus grandes, jusqu'à atteindre une absorbance comparable à celle de CopH ( $A \approx 0,12$ ) à la même longueur d'onde ( $\lambda_{\max} \approx 630$  nm). Le déplacement bathochromique observé lors du titrage de la protéine sauvage apparaît donc également dans le cas du titrage des mutants. Ce déplacement se produit cependant plus tôt, dès 1 équivalent de cuivre ajouté environ. ***De la bande à 610 nm (spectre enregistré pour 0,8 équivalent de cuivre pour chacun des simples mutants), nous pouvons déduire un coefficient d'extinction molaire, comparable à celui de la protéine sauvage ( $150 M^{-1}.cm^{-1}$  à 610 nm), et caractéristique d'une transition électronique entre orbitales d d'un ion cuivre de type II*** (Solomon, E. I. *et al.* 2004 ; Solomon, E. I. 2006). Le spectre du double mutant possède le même profil, la bande d'absorbance initiale étant toutefois centrée sur 635 nm, pour atteindre 660 nm après le déplacement bathochromique observé également dès un équivalent de cuivre ajouté.

A partir des spectres enregistrés lors du titrage UV-visible présentés précédemment, nous avons choisi de représenter les variations de l'absorbance maximale ou de la longueur d'onde à l'absorbance maximale, en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajoutés, pour CopH et chacun de ses mutants (Fig. 117).



**Figure 117** : Représentations de l'augmentation de l'absorbance maximale (cercles pleins), puis de la longueur d'onde à l'absorbance maximale (cercles vides), en fonction du nombre d'équivalents de Cu(II) ajoutés, pour chaque protéine (CopH et ses mutants).

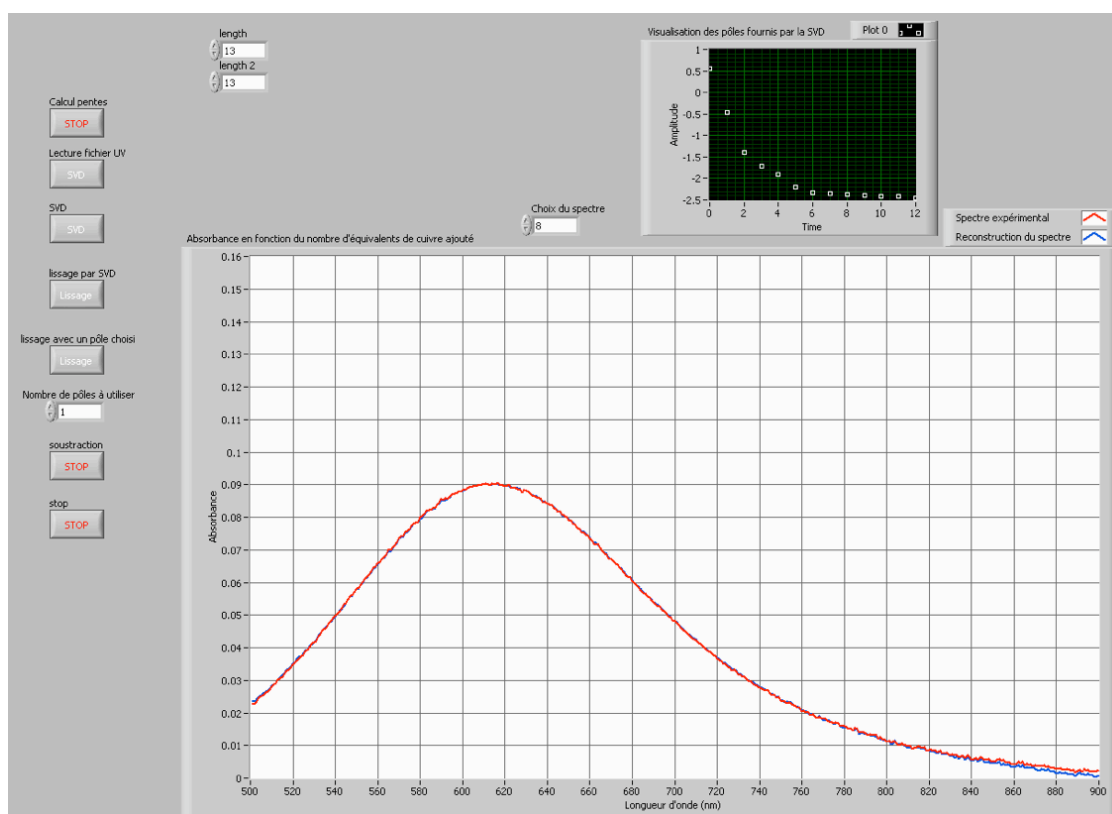
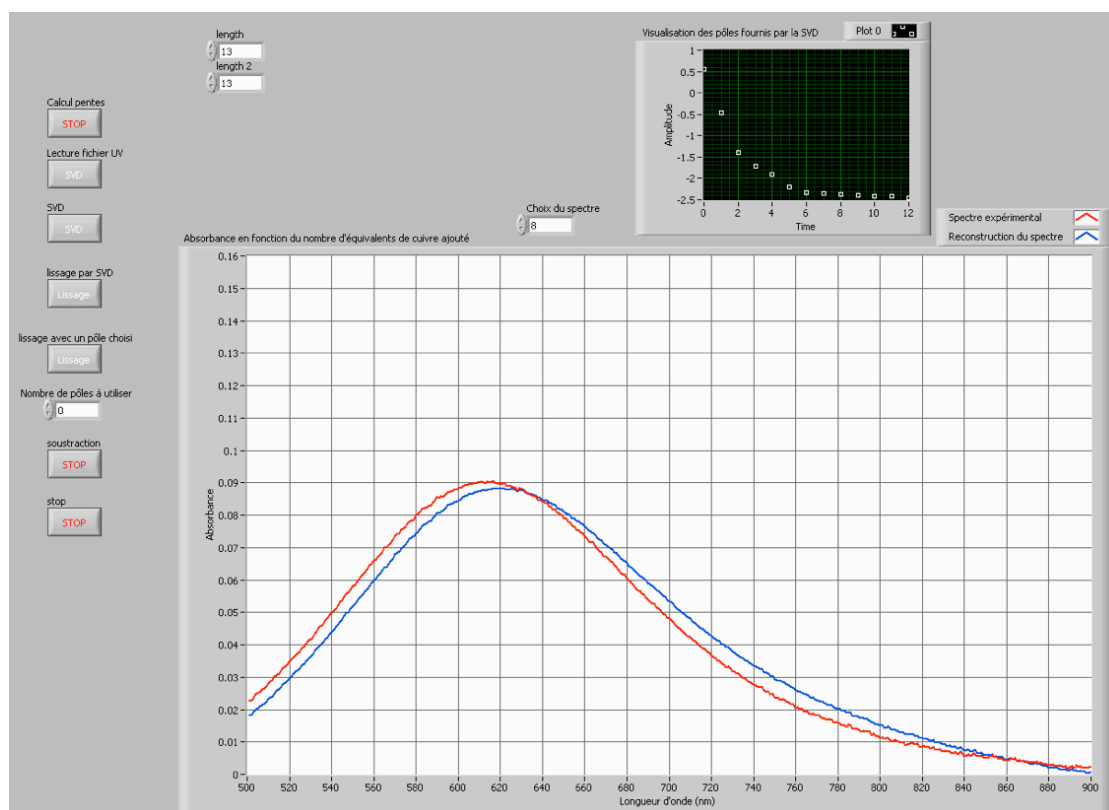
*L'augmentation linéaire de l'absorbance à 610 nm, jusqu'à 2 équivalents de Cu(II), pour CopH, se traduit par une droite horizontale à hauteur de 610 nm (cercle vides). Il en est de même pour les mutants, jusqu'à 1 équivalent de Cu(II), à 610 nm ou 635 nm. Puis l'absorbance maximale se décale vers les longueurs d'onde plus grandes. Concernant la protéine sauvage, l'absorbance maximale augmente linéairement jusqu'à 4 équivalents de Cu(II) avant d'arriver à un plateau. On peut voir, dans ce cas, 4 sites, remplis par 4 équivalents de Cu(II). Les mutants voient leur absorbance maximale s'élever linéairement jusqu'à 1 équivalent de Cu(II). L'absorbance continue de croître de façon plus douce, l'effet est particulièrement net dans le cas du double mutant.*



Une autre étude a été menée pour déterminer, par déconvolution des spectres UV-visible, le nombre et peut-être la nature spectrale UV-visible des espèces présentes au fur et à mesure du titrage. L'outil mathématique utilisé est la SVD ou Singular Value Decomposition (voir le chapitre « Matériels et Méthodes »). Pour chaque protéine, nous avons cherché à évaluer le nombre minimal de pôles assurant la complète recombinaison de l'ensemble des spectres suivant la combinaison linéaire :

spectres expérimentaux =  $\alpha_1$  pôle 1 +  $\alpha_2$  pôle 2 +  $\alpha_3$  pôle 3 + ... avec  $\alpha_1 > \alpha_2 > \alpha_3 > \dots$

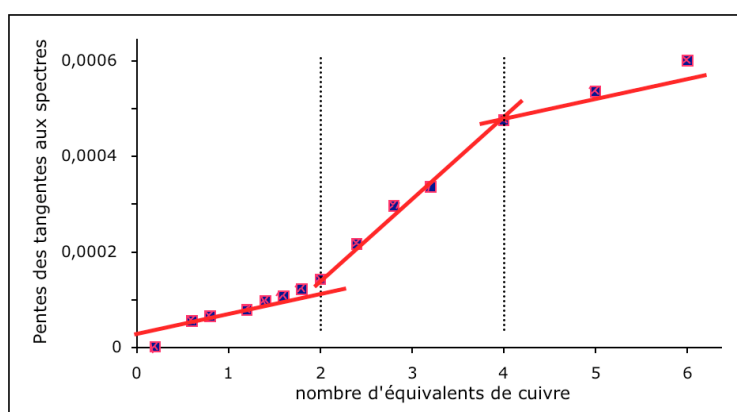
Sur la figure 118, le graphe du haut montre la difficulté à modéliser les spectres expérimentaux (en rouge) avec un seul pôle (en bleu). Un seul spectre expérimental a été pris pour exemple afin de clarifier la figure. Il est clair qu'avec un seul pôle, ce dernier ne parvient pas à se superposer au spectre expérimental. En revanche, en retenant les 2 pôles principaux, nous pouvons observer la parfaite superposition du spectre expérimental pris pour exemple et du pôle correspondant. Les graphiques supérieurs (en noir) sur chacune des figures représentent l'importance des différents pôles dans la déconvolution des spectres expérimentaux. L'importance du premier pôle  $x_1$  est donnée par  $\log(x_1) = 0,5$ , l'importance du second pôle  $x_2$  par  $\log(x_2) = -0,5$ , et l'importance du troisième pôle  $x_3$  par  $\log(x_3) = -1,5$ . En conséquence,  $x_1 = 3 > x_2 = 0,3 > x_3 = 0,03$ . Le premier pôle joue alors un rôle 10 fois plus important que le second, et un rôle plus de 100 fois plus important que les pôles suivants, dans le traitement par déconvolution. Dans notre cas, les deux premiers pôles les plus importants sont suffisants pour reconstruire l'ensemble des spectres expérimentaux, pôles que l'on peut faire correspondre à deux principales espèces protéiques présentes lors du titrage (Fig. 118).



**Figure 118** : Représentation de la déconvolution des spectres UV-visible obtenus par titrage de CopH avec les ions Cu(II). Le graphe du haut montre la difficulté à modéliser les spectres expérimentaux (en rouge) avec un seul pôle (en bleu). Le graphe du bas révèle la parfaite déconvolution des spectres expérimentaux (en rouge) avec 2 pôles (en bleu). Les graphiques supérieurs correspondants (en noir) représentent l'importance des différents pôles dans la déconvolution des spectres expérimentaux : le premier pôle joue un rôle 10 fois plus important que le second, et un rôle plus de 100 fois plus important que les pôles suivants, dans le traitement par déconvolution (importance du premier pôle  $x_1$  :  $\log(x_1) = 0,5$  ; importance du second pôle  $x_2$  :  $\log(x_2) = -0,5$  ; importance du troisième pôle  $x_3$  :  $\log(x_3) = -1,5$ ).

Dans un second temps, la SVD nous assurant la présence de 2 principales espèces lors du titrage, nous avons essayé de confirmer l'apparition successive de ces deux espèces, puis le moment, au cours du titrage, où le second pôle devient nécessaire à la recombinaison des spectres suivants. Dans le cas du titrage de CopH, un seul pôle est nécessaire pour reconstituer tous les spectres enregistrés jusqu'à 2 équivalents de cuivre. Nous pouvons faire correspondre ce résultat à la présence d'une seule espèce en solution jusqu'à 2 équivalents de cuivre ajouté. **Le premier pôle représenterait donc la première espèce, à l'origine de l'absorbance croissante à 610 nm.** Ensuite, pour des ajouts de cuivre supplémentaires, la présence du deuxième pôle devient indispensable et son importance relative augmente. Nous pouvons faire correspondre ce phénomène à l'apparition de la **deuxième espèce, dont les caractéristiques spectrales sont responsables du déplacement bathochromique observé à partir de 2 équivalents de cuivre ajoutés.**

Nous pouvons alors nous appuyer sur les caractéristiques spectrales de chacune des deux espèces pour construire une représentation de l'apparition successive des deux espèces au cours du titrage. Nous avons en effet calculé les pentes des tangentes à chacun des spectres dans la région où l'absorbance est due majoritairement à la présence d'une des deux espèces. Par exemple, en se plaçant entre 780 nm et 800 nm, nous avons tracé l'évolution de la pente de la tangente aux spectres de la protéine CopH, entre ces deux points (Fig. 119). Une pente faible représente la présence majoritaire de l'espèce 1, une pente importante la présence majoritaire de l'espèce 2. Il apparaît clairement que, jusqu'à deux équivalents de cuivre ajoutés, la seconde espèce est quasi absente. Comme nous l'avons vu, la SVD montre la présence d'une seule espèce dans ce cas. Il est donc net, encore une fois, que deux ions  $\text{Cu}^{2+}$  se fixent d'abord à la protéine, phénomène représenté par la première espèce. **L'ajout de cuivre supplémentaire fait naître la deuxième espèce, absente avant 2 équivalents de Cu(II) et dont l'absorbance augmente avec la quantité de cuivre.**



**Figure 119 :** Représentation de l'évolution des pentes des tangentes aux spectres obtenus par titrage UV-visible de la protéine CopH par les ions  $\text{Cu(II)}$ . Les pentes ont été calculées entre 780 nm et 800 nm.

Le même travail a été réalisé à partir des spectres UV-visible des différents mutants et confirme l'apparition d'une seconde espèce à partir de 1 équivalent de cuivre ajouté. Dans le cas du mutant His24-26Ala, du fait de la double mutation, la première espèce absorbe à 635 nm. Le même comportement est ensuite observé, avec apparition d'une seconde espèce déplaçant le maximum d'absorbance vers les longueurs d'onde plus grandes.

En conclusion, la comparaison des différents spectres UV-visible nous permet d'affirmer que :

\* l'ajout progressif de cuivre fait apparaître 2 espèces successives et ayant des caractéristiques spectrales différentes. La première correspondrait à la protéine CopH fixant 2 ions Cu(II). La seconde représenterait la protéine fixant plus de 2 ions Cu(II).

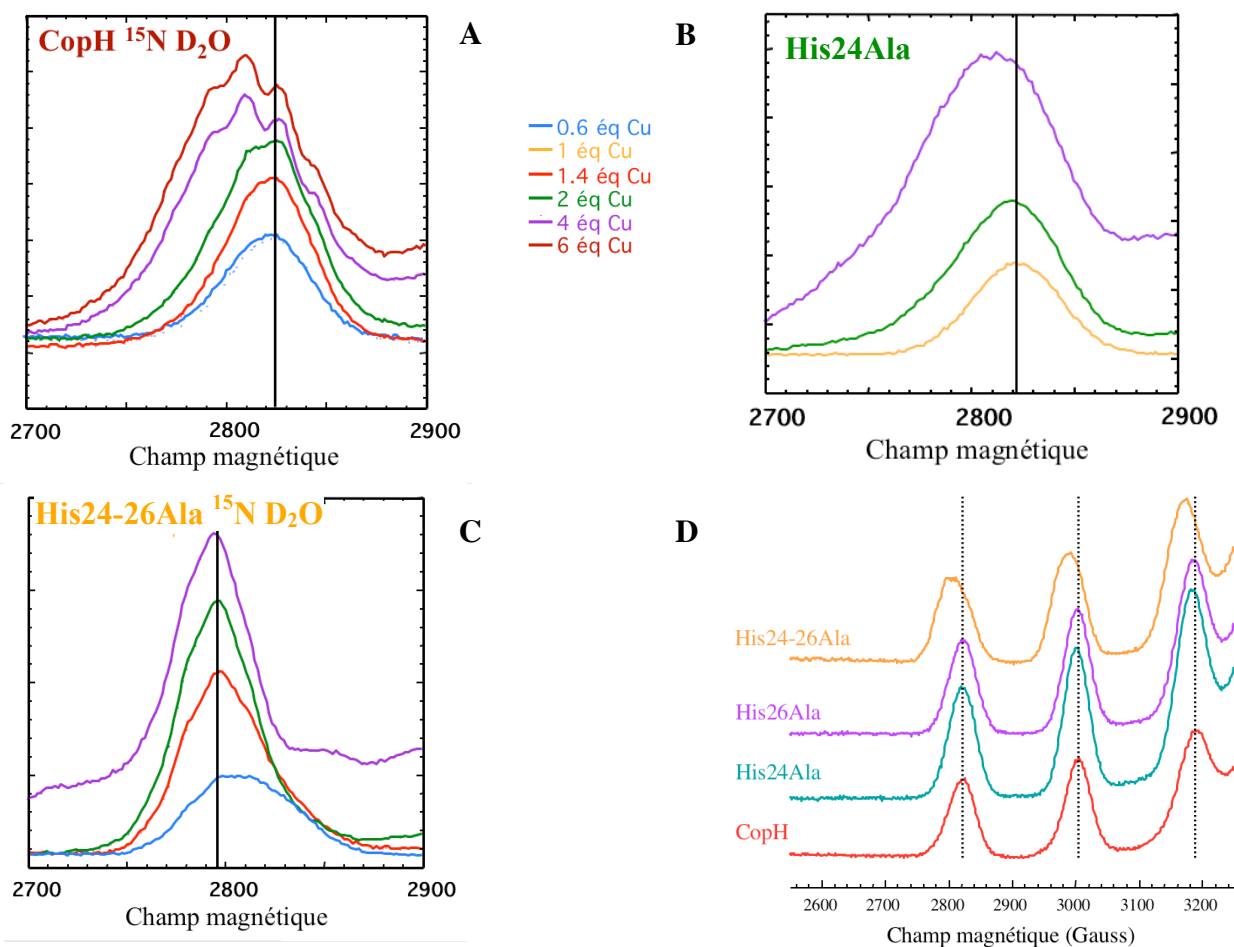
*\* la simple mutation d'une histidine modifie le site cuivre (en termes de structure et/ou d'affinité), ne le rendant plus capable de lier qu'un seul ion  $\text{Cu}^{2+}$ , avant d'observer l'apparition d'une seconde espèce responsable du déplacement bathochromique. Le site garde toutefois les mêmes caractéristiques spectrales (site cuivre de type II).*

*\* la double mutation permet toujours à la protéine de lier un ion  $\text{Cu}^{2+}$ . Cependant, les caractéristiques spectrales apparaissent modifiées : la nature des ligands et la structure du site sont vraisemblablement différentes.*

Enfin, dans tous les cas, la méthode empirique de Sigel et Martin (Sigel, H. et Martin, R. B. 1982) permet de dire qu'au moins 2 atomes d'azote sont impliqués comme ligands du cuivre. Ce résultat est très limité, mais va dans le même sens que ceux obtenus par RPE, comme nous allons le voir par la suite.

*\* Titrages par résonance paramagnétique électronique (RPE)*

L'étude de l'évolution des spectres RPE de la protéine, en fonction de la quantité de cuivre ajouté, peut permettre d'accéder aux changements structuraux du site cuivre de la protéine considérée. Nous avons donc analysé l'évolution des spectres de la protéine CopH et des mutants en fonction de l'ajout de quantités croissantes d'ions Cu(II). Le comportement de la bande à bas champ étant similaire à celui de l'ensemble du spectre RPE, nous avons choisi, dans un souci de clarté, de ne représenter que l'évolution de cette bande en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajoutés.



**Figure 120** : Titrages par RPE de la protéine CopH (A) et des mutants (B et C) par différents équivalents de  $\text{CuCl}_2$ . Le simple mutant His26Ala se comporte de façon similaire à His24Ala, seul représenté (B). Les graphes présentés correspondent à l'agrandissement de la bande à bas champ ( $T = 30 \text{ K}$ ,  $P = 1 \text{ mW}$ , modulation :  $2 \text{ G}$ ). Le cadre D représente la superposition des zones  $g_{//}$  des spectres de chacune des protéines sauvage et mutées en présence de 1,8 équivalents de cuivre. Le double mutant possède un spectre légèrement décalé par rapport aux autres.

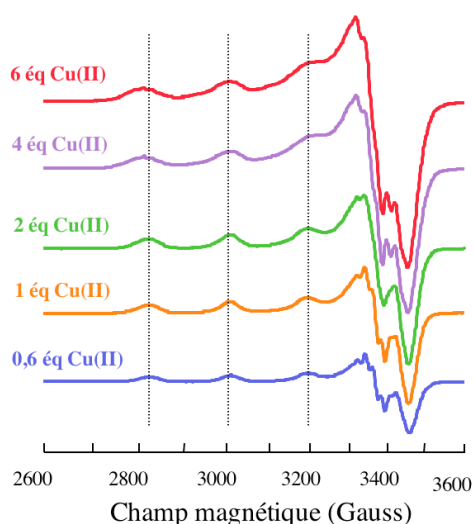
Dans le cas de la protéine CopH en présence de 0,6 équivalent de cuivre, la bande observée est tout d'abord centrée sur 2822 G (Fig. 120A). A partir de 2 équivalents de cuivre ajouté, par dimère, les raies deviennent plus larges, sans revenir au niveau de la ligne de base, et se décalent vers les plus bas champs (2822 G  $\rightarrow$  2805 G). Ce comportement laisse penser à l'existence de liaisons non spécifiques du cuivre sur la protéine, avec apparition d'autres espèces, en l'occurrence dans notre cas, principalement une autre espèce, comme nous l'ont confirmé les traitements des spectres UV-visible (voir paragraphe précédent). Une structure hyperfine apparaît d'autre part, révélant la présence de cette nouvelle espèce caractérisée par des couplages différents.

Le même type d'expériences a été effectué sur les simples mutants (Fig. 120B) : ils possèdent tous les deux un comportement similaire, seul l'un des deux a donc été représenté sur la figure. A partir de 2 équivalents de cuivre ajoutés, on observe à nouveau l'élargissement de la bande à bas champ qui se décale également vers les champs plus bas

(2822 G  $\rightarrow$  2805 G), signe de l'apparition de liaisons non spécifiques du cuivre sur les mutants. Le spectre enregistré en présence de moins d'un équivalent de cuivre n'a cependant pas été enregistré, et ne peut nous aider dans ce cas à décrire complètement l'évolution du comportement des simples mutants, en présence d'une faible quantité de cuivre.

Cette évolution de la bande à bas champ en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajoutés est similaire dans la zone  $g_{\perp}$  pour CopH et les simples mutants (Fig. 121) : à partir de 2 équivalents de cuivre ajoutés, la structure représentant les couplages hyperfins Cu-N se décale légèrement vers les plus bas champs tout en étant moins bien définie.

Concernant l'évolution des spectres du double mutant (Fig. 120C), la bande à bas champ du spectre enregistré initialement (0,6 équivalents de cuivre) est centrée sur 2805 G (Fig. 120D) puis se décale à 2795 G. La bande s'élargit après 2 équivalents de Cu(II), tout en restant centrée à ce même champ.



**Figure 121** : Représentation de l'évolution du spectre de la protéine CopH en fonction du nombre d'équivalents de cuivre ajouté. Dans la zone  $g_{\parallel}$ , les raies s'élargissent et se décalent vers les champs plus bas. Dans la région  $g_{\perp}$ , la structure représentant les couplages hyperfins Cu-N se décale légèrement vers les plus bas champs tout en étant moins bien définie.

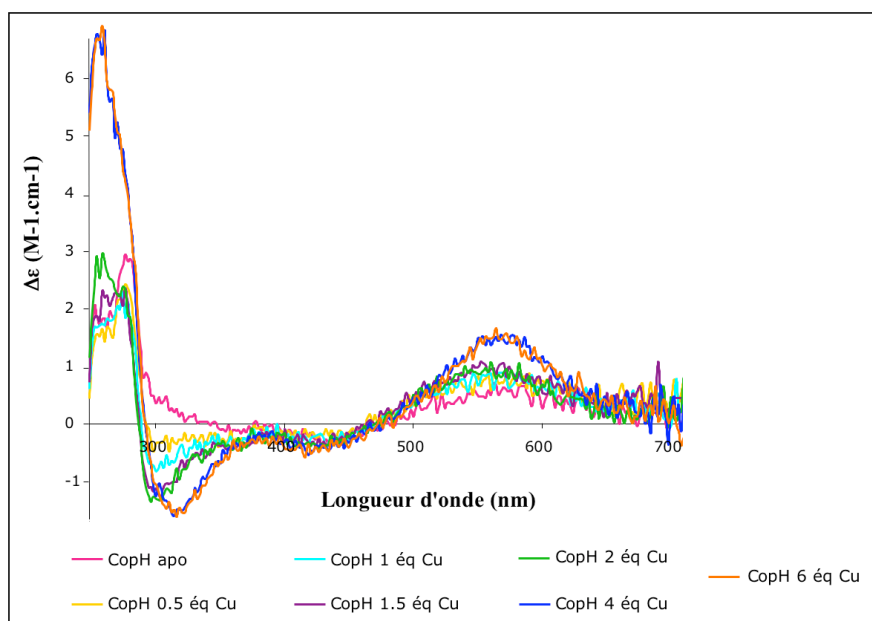
En conclusion, concernant en particulier les mutants, il est à noter que les analyses UV-visible et RPE ne fournissent pas exactement les mêmes résultats. Les titrages contrôlés par spectroscopie UV-visible montrent un déplacement des bandes d'absorbance à partir de 2 équivalents de cuivre chez CopH sauvage et 1 équivalent de cuivre ajouté chez les mutants, révélant l'apparition d'une deuxième espèce protéique. En RPE, en revanche, les spectres issus du titrage des simples mutants, identiques entre eux, se caractérisent par une modification des raies à partir de 2 équivalents de cuivre ajoutés... Le double mutant, quant à lui, voit son spectre RPE décalé vers les champs plus bas dès le premier ajout de cuivre, comme le spectre enregistré en UV-visible est déplacé initialement vers les longueurs d'onde

plus grandes. Le spectre RPE n'est ensuite aucunement décalé à la suite de l'ajout progressif de cuivre.

Cependant, les analyses par spectroscopie UV-visible et RPE confirment la présence de deux espèces au cours des titrages effectués. La première correspondrait à la protéine liant 2 ions Cu(II). La seconde représenterait la protéine, chélatant toujours les deux premiers ions Cu(II), et liant 2 autres ions Cu(II) de façon moins affine, liaison s'apparentant à une interaction moins spécifique mais ne provoquant pas de modifications drastiques des paramètres RPE.

### 2.5.3 Le dichroïsme circulaire dans le visible

L'analyse spectroscopique et structurale de CopH s'est enrichie des résultats obtenus par dichroïsme circulaire dans le visible. Les spectres apparaissent bruités du fait du nombre limité de scans choisi pour l'enregistrement. Cette expérience n'a été d'autre part réalisée qu'une seule fois. Sa fiabilité et sa reproductibilité n'ont donc pas été confirmées. Nous avons toutefois choisi de la présenter ici car il nous semble qu'elle apporte des informations très intéressantes et corroborant celles obtenues par les méthodes précédentes.



**Figure 122** : Spectres CD de CopH en présence de différents équivalents de cuivre, enregistrés dans le visible.

Le spectre de la protéine apo a tout d'abord été enregistré (Fig. 122). Il est à noter qu'une légère bande d'absorbance est présente aux alentours de 600 nm, la protéine étant toutefois libre de tout ion métallique. Nous avons considéré ce spectre comme celui représentant la signature spectrale de la protéine apo en dichroïsme circulaire dans le visible. Au fur et à mesure de l'ajout de cuivre, la bande positive présente dans la région caractéristique des transitions d-d ( $\approx 600$  nm), bande particulière observée également en spectrophotométrie UV-visible, s'accroît. Une seconde bande, négative, apparaît à 300 nm, dès le premier ajout de cuivre. *Cette dernière peut être attribuée à une transition due à un transfert de charge (t.c.) entre les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et un groupe imidazole ( $\pi_1 N_{im}\text{-Cu t.c.}, 280\text{-}345$  nm) ou un azote déprotoné de la chaîne peptidique ( $N\text{-Cu t.c.}, 295\text{-}315$  nm)* (Daniele, P. G. *et al.* 1996 ; Fawcett, T. G. *et al.* 1980). Les résultats obtenus par RPE, affirmant l'absence d'interaction entre les histidines et le cuivre, permettent de discriminer l'une de ces possibilités en ne retenant que la deuxième. L'intensité de ces bandes augmente légèrement jusqu'à 2 équivalents de cuivre. Dans ce dernier cas, une bande plus intense est visible à 265 nm, signature de l'interaction cuivre-carboxylate  $\text{Cu(II)-O}_2\text{C}^-$  probablement dû à un léger excès de cuivre. Les ajouts supplémentaires de cuivre, 4 et 6 équivalents, forceraient le système : le déplacement de la bande négative vers 320 nm et l'augmentation de l'intensité de la bande positive à 600 nm pourraient correspondre à l'interaction du cuivre avec les histidines ( $\pi_1 N_{im}\text{-Cu t.c.}, 280\text{-}345$  nm) au niveau du site cuivre (bande à 600 nm). La bande CD de forte intensité à 265 nm représenteraient les interactions non spécifiques des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en excès avec les différents groupes carboxylate de la protéine.



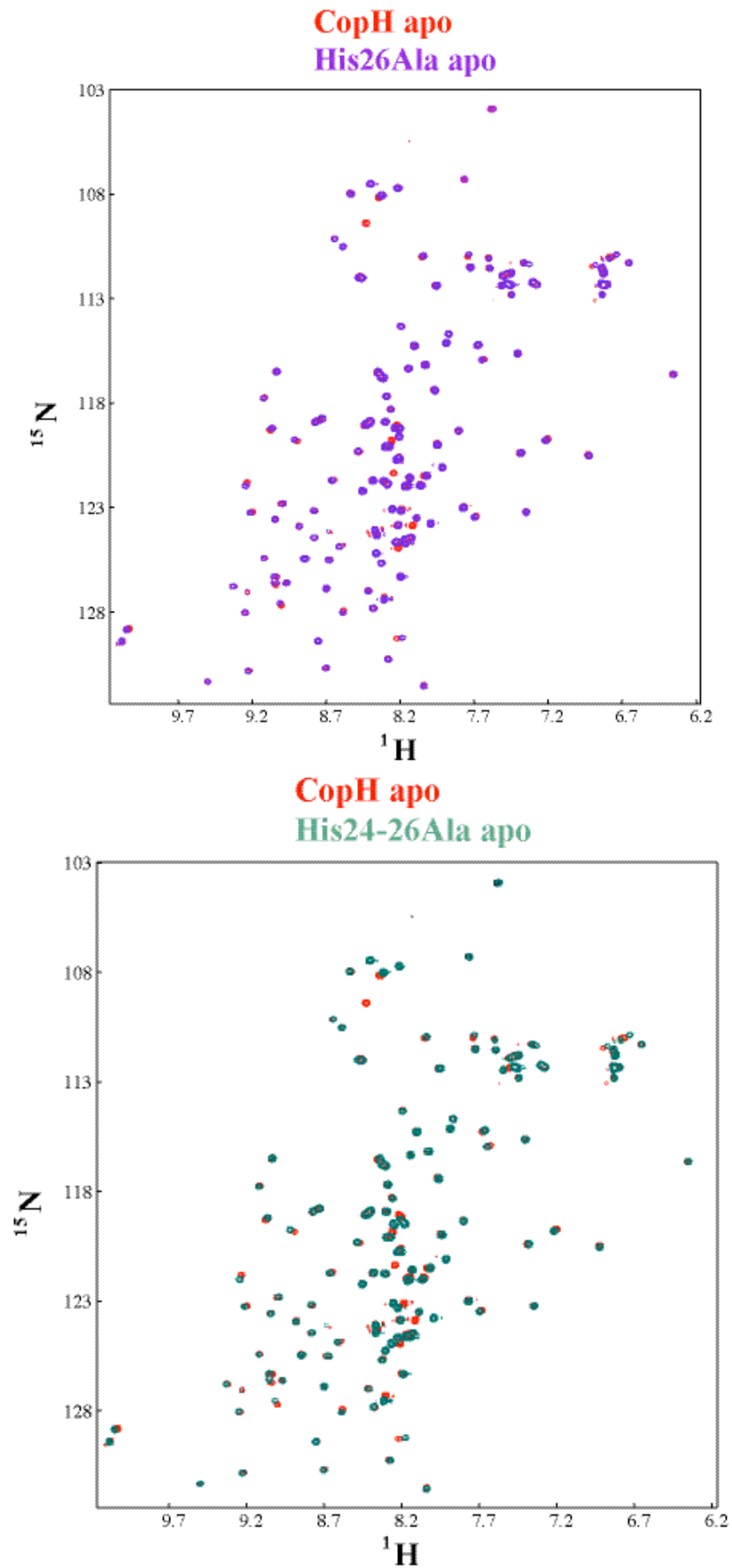
#### 2.5.4 La résonance magnétique nucléaire

L'étude de la structure relative de la protéine sauvage et des mutants a été réalisée à partir de spectres  $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$  HSQC. Les spectres des protéines mutées sont très similaires à ceux de la protéine sauvage. Sur les spectre enregistrés (Fig. 123), les fréquences RMN des différentes résonances sont largement distribuées dans le plan des déplacements chimiques  $\delta(^1\text{H})$  et  $\delta(^{15}\text{N})$ , ce qui est caractéristique des protéines correctement repliées. On remarque également de nombreuses résonances, caractérisées par une intensité plus forte, au centre du spectre. Nous pouvons conclure que la protéine mutée présente également des zones bien structurées mais aussi des parties très flexibles, pauvres en structures secondaires.

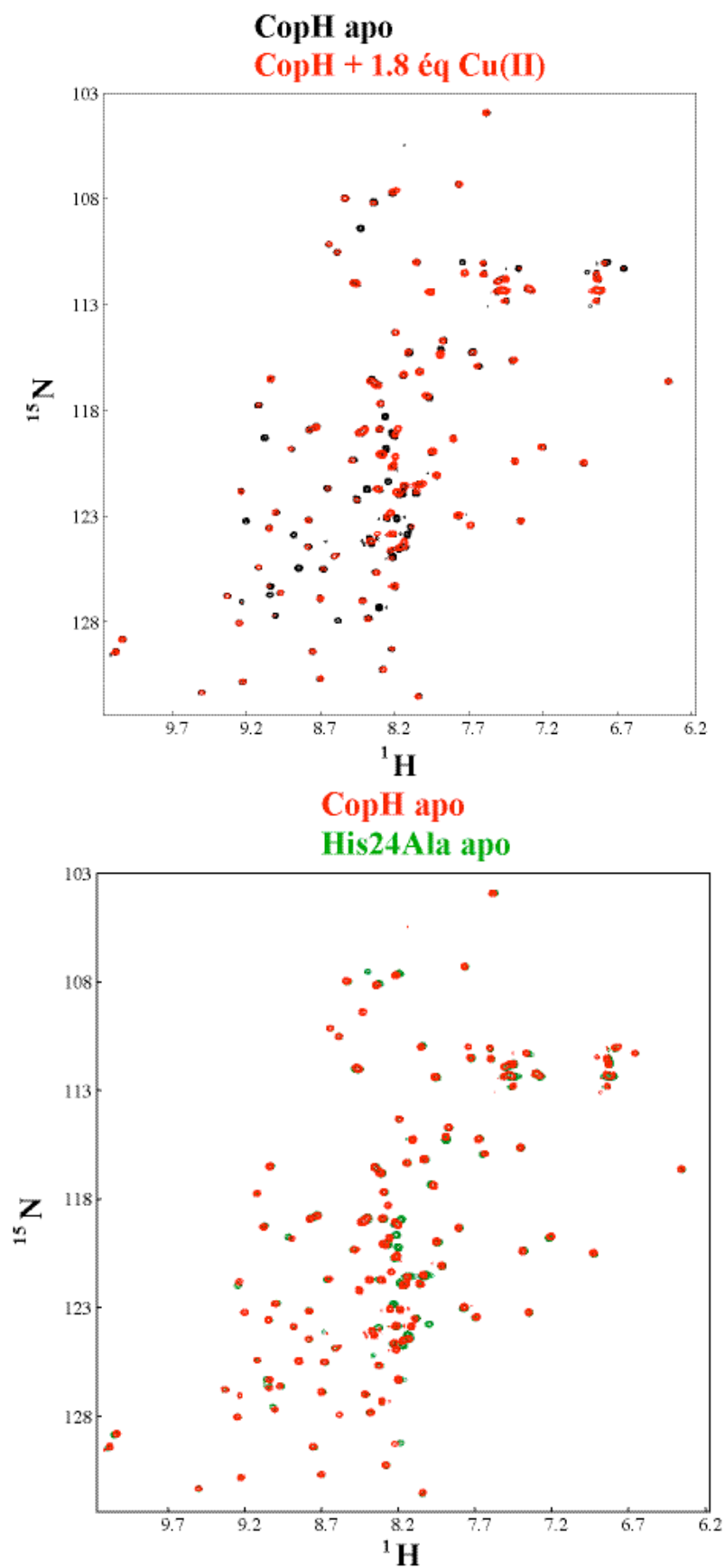
Les différentes mutations n'induisent pas de changements majeurs des fréquences de résonance, par rapport au spectre enregistré pour la protéine sauvage. La comparaison plus approfondie de la position de chaque résonance permet cependant de différencier l'effet des différentes mutations histidine.

Il est remarquable que la double mutation provoque le même type de modifications spectrales que la simple mutation de l'histidine 26 (Fig. 123). La résonance de la glycine (hypothétiquement Gly27), déjà remarquée lors de la métallation de CopH sauvage, disparaît dans la partie supérieure du spectre, ainsi que plusieurs résonances de résidus localisés dans la partie flexible de la protéine. De très faibles déplacements des résonances situées dans le quart inférieur gauche peuvent également être observés, probablement dus à de légers changements conformationnels aux alentours des acides aminés résonant dans cette zone. La métallation de ces deux mutants provoque le même type de modifications des résonances, en comparaison de la métallation de la protéine sauvage : plusieurs taches disparaissent au centre du spectre ainsi que dans le quart inférieur gauche (en particulier les trois résonances remarquées précédemment).

D'autre part, il est à noter que la mutation de l'histidine 24 induit des modifications spectrales très similaires à celles observée après ajout de cuivre : le spectre de CopH métallée est quasi superposable à celui du mutant His24Ala apo (Fig. 124). Cette observation pourrait s'expliquer par la diminution de la vitesse de relaxation des noyaux proches du site cuivre, due à la présence de métal, dans le cas de la protéine métallée. La flexibilité conformationnelle induite dans la même zone par la mutation aurait pour conséquence d'augmenter le temps de corrélation  $\tau_c$  et donc de diminuer également la vitesse de relaxation des protons proches du site concerné. La métallation du mutant His24Ala ne touche quasiment que la zone centrale du spectre, correspondant aux parties flexibles de la protéine.



**Figure 123** : Spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de la protéine CopH et des mutants His26Ala et His24-26Ala. Comparaison avec les spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC des mutants avec celui de la protéine sauvage



**Figure 124** : Spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de la protéine CopH et du mutant His24Ala. Comparaison du spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC du mutant His24Ala avec celui de CopH en présence de 1,8 équivalents de cuivre.

## Conclusion

Le projet concernant l'étude de la protéine CopH a tout d'abord bénéficié d'avantages non négligeables, intrinsèques à la protéine elle-même. La construction plasmidique nous a permis de surexprimer CopH dans *E. coli* avec un excellent rendement. Les conditions de surproduction et les différentes étapes de purification ont été mises au point en peu de temps tout en fournissant une protéine soluble, pure, stable dans le temps et en grande quantité (environ 150 mg par litre de culture).

Nous nous sommes ensuite appliqués à caractériser la fixation des ions Cu(II) sur la protéine pour lesquels elle possède une grande affinité, en comparaison d'autres métaux. CopH se définit comme une protéine périplasmique, se présentant sous la forme d'un dimère symétrique, et se caractérise par une flexibilité importante, les régions peu structurées représentant 38 % de la protéine. La fixation des ions Cu(II) n'induit pas de changements conformationnels majeurs affectant de façon significative la structure secondaire de la protéine et menant à une meilleure structuration.

CopH possède deux ions Cu(II) par dimère, soit un par monomère, au sein desquels les ions Cu(II) ne se lieraient pas aux deux histidines en positions 24 et 26, résidus a priori ligands du cuivre, comme nous le pensions au départ, mais se fixeraient à cinq atomes d'azote de type amide appartenant à la chaîne polypeptidique, comme le suggère la comparaison avec les signaux RPE obtenus lors de l'étude de la protéine prion. Ces cinq atomes d'azote formeraient un site Cu(II) de type II. En conséquence, les résidus histidine n'interviennent pas en tant que ligands du cuivre, mais jouent cependant un rôle essentiel dans l'affinité, l'histidine 24 ayant un effet prépondérant par rapport à sa voisine en position 26.

CopH contient également deux autres sites accueillant les ions Cu(II), par dimère, avec une plus faible affinité. Cette fixation de deux ions Cu(II) supplémentaires (ou même trois ions Cu(II) d'après les résultats obtenus par microcalorimétrie, induit la formation d'un autre type d'espèce possédant des caractéristiques spectrales différentes.

*La protéine CopH*

*Discussion*



## Discussion

Le gène *copH* est l'un des 19 ORFs composant le cluster *cop*, porté sur le plasmide pMOL30, chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Outre l'absence d'information dans la littérature concernant les protéines codées par les gènes du cluster *cop*, le travail sur la protéine CopH a commencé dans un laboratoire vierge de toute expérience sur les protéines à cuivre. Par conséquent, les recherches ont débuté par le clonage du gène *copH* dans un vecteur d'expression et la mise au point des conditions de surproduction de la protéine correspondante chez *E. coli*. Elles ont ensuite nécessité l'établissement d'un protocole de purification, par précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une filtration sur gel, qui a permis d'obtenir la protéine pure, soluble, stable, et en quantités suffisantes pour mener à bien sa caractérisation.

Nous avons montré que CopH est une protéine périplasmique. La forme maturée ne contient ni cystéine, ni méthionine classiquement impliquées comme ligands métalliques chez les métalloprotéines, mais deux histidines, en position 24 et 26, encadrant un résidu aspartate. Ces deux histidines constituent ainsi les deux seuls résidus susceptibles a priori de fixer le cuivre du fait de leur chaîne latérale azotée. L'histidine 26 de CopH est alignée avec l'histidine 24 de CzcE, seul paralogue de CopH chez *C. metallidurans* CH34 (Fig. 87). Pour valider l'hypothèse d'une participation des deux résidus histidine dans la liaison avec les ions Cu(II), hypothèse cohérente avec les caractéristiques de la grande majorité des métalloprotéines, nous avons comparé le comportement de la protéine sauvage avec les simples mutants His26Ala, His24Ala et le double mutant His24-26Ala, produits par mutagenèse dirigée.

La protéine CopH a d'abord été caractérisée comme un dimère, par filtration sur gel et spectrométrie de masse en conditions natives. La spectroscopie UV-visible, la RPE et la spectrométrie de masse nous ont permis de montrer que la protéine était purifiée sous sa forme apo. D'autre part, elle possède une plus grande affinité pour les ions Cu(II) que pour les autres ions métalliques. De là, nous avons tout d'abord mis en évidence la capacité de la protéine à lier deux équivalents de cuivre par dimère, au sein de deux sites cuivre possédant les caractéristiques spectrales de sites cuivre de type II. Comme la spectrométrie de masse en

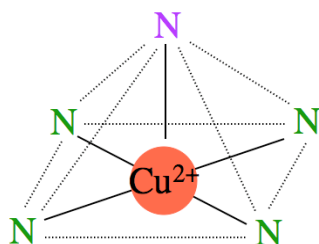
conditions non dénaturantes permet à la fois la détection des formes monomérique et dimérique lors de la même expérience, nous avons pu démontrer que chaque sous-unité protéique contenait son propre site métallique. En outre, nous avons pu montrer par titrages UV-visible et RPE, qu'au-delà de deux équivalents de cuivre, deux autres ions cuivre se fixeraient sur la protéine, au niveau de deux nouveaux sites. Les deux premiers ions Cu(II) se fixeraient au sein de sites cuivre de type 2. Les autres possèdent des caractéristiques spectrales différentes. Leur fixation est responsable d'un déplacement bathochromique des bandes d'absorbance en spectroscopie UV-visible, révélant l'apparition d'une nouvelle espèce et correspondant à CopH liant 4 ions Cu(II). Les titrages RPE mettent également en évidence un déplacement des raies vers les champs plus bas ainsi que leur élargissement. L'étude des titrages ITC confirme la présence de 4 voire 5 sites sur la protéine. La microcalorimétrie apporte également une information supplémentaire relative à l'affinité et permet de distinguer deux sites de haute affinité, proche de 36 nM, et deux ou trois sites de plus faible affinité - environ 2,5  $\mu$ M.

Nous avons exploité diverses méthodes de RPE afin de caractériser la liaison CopH-Cu lors de la présence de 2 équivalents d'ions Cu(II) par dimère. Le point le plus surprenant et le plus original repose sur la découverte de l'absence d'implication des résidus histidine dans la liaison au cuivre. La RPE permet de montrer l'implication des azotes amide appartenant à la chaîne peptidique, dans l'interaction avec les ions Cu(II), dans le plan équatorial. L'implication des azotes amide dans la liaison au cuivre, révélée également par dichroïsme circulaire, constitue un résultat particulièrement original et ne trouve un pendant que dans les données de la littérature décrivant l'interaction des ions Cu(II) avec une protéine particulière, présente chez les mammifères : la protéine Prion.

Plusieurs méthodes, comme la spectroscopie UV-visible, la RMN ou la RPE, nous ont permis de démontrer que les deux premiers ions Cu(II) fixés par la protéine se trouvaient au sein de sites cuivre de type 2. Ces sites se définissent classiquement comme tétraogonaux, l'ion Cu(II) se situant au cœur d'une géométrie plan-carré et possédant comme ligands trois atomes d'azote et un atome d'oxygène. Les sites cuivre de type 2 peuvent également se présenter sous la forme d'une pyramide à base carrée. La superoxyde dismutase possède par exemple un tel site. Le cuivre y est lié à quatre résidus histidine formant un plan, et à une molécule d'eau en axial (Fig. 5). Dans notre cas, au sein d'un site de type 2, l'ion Cu(II) est certainement en interaction forte avec quatre atomes d'azote, selon un couplage de même nature, dans le plan



équatorial. Nous pouvons alors nous poser la question de l'existence du cinquième azote. Il est possible, par « coïncidence », que ce cinquième couplage détecté par RPE en onde continue corresponde au couplage du cuivre avec un proton, proton non échangeable car toujours visible en présence d'eau lourde. D'autre part, l'ion cuivre est en interaction faible avec un cinquième ligand, également de nature azotée, interaction de nature isotrope. Le cuivre se situe par conséquent dans une pyramide à base carrée dont les sommets sont représentés par quatre atomes d'azote appartenant probablement à la chaîne polypeptidique, dans le plan équatorial, et un atome d'azote plus éloigné, en axial (Fig. 125).



**Figure 125** : Site cuivre de type 2. Dans notre cas, l'ion Cu(II) se trouve au sein d'une pyramide à base carrée dont les sommets sont représentés par quatre atomes d'azote appartenant à la chaîne polypeptidique, dans le plan équatorial, et un atome d'azote plus éloigné, en axial.

Un constat s'impose alors : CopH représente une protéine liant les ions cuivre de façon particulièrement originale, en ne faisant intervenir que des ligands azotés interagissant avec un ion Cu(II) selon une géométrie pyramidale à base carrée. Nous avons proposé, d'après les résultats de dichroïsme circulaire dans le visible et en référence aux caractéristiques RPE issues de l'étude de la protéine Prion, que les quatre atomes d'azote situés dans le plan équatorial, appartiendraient à la chaîne polypeptidique. Deux questions se posent alors : « est-il possible de concevoir un site cuivre formés uniquement d'azotes amide ? » et « est-il possible que d'autres résidus à chaîne latérale azotée puissent être impliqués dans la liaison avec les ions Cu(II) ? » Suite à la première question, nous pouvons nous appuyer sur les résultats obtenus en particulier par RPE, et sur l'analogie faite avec ceux déduits de l'étude de la protéine prion (voir chapitre « Résultats » - paragraphe 2.5.1 ; Van Doorslaer, S. *et al.* 2001), pour avancer une réponse positive. La protéine se caractérisant d'autre part par une grande flexibilité, particulièrement importante dans la zone supposée de localisation du site cuivre en N-terminal, il ne paraît pas absurde de penser à une conformation particulière permettant à quatre atomes d'azote amide de former une géométrie à base carrée suite à un repliement approprié de la chaîne. La deuxième question requiert un travail de comparaison entre les chaînes latérales azotées des acides aminés d'intérêt et une réflexion concernant le caractère nucléophile de l'atome d'azote concerné. Les acides aminés communément impliqués dans la fixation des ions métalliques sont la méthionine, la cystéine

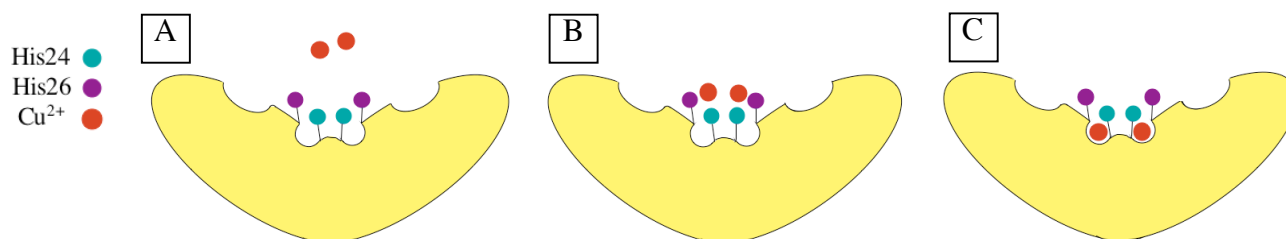
(résidus à chaîne latérale soufrée), et l'histidine (résidu à chaîne latérale azotée). Parmi ceux-ci, le plus nucléophile est la cystéine, du fait de la position du groupement SH en fin de chaîne latérale. Les résidus à chaîne latérale azotée sont : l'histidine, l'arginine, la lysine, la glutamine, et l'asparagine. La nucléophilie des azotes des deux derniers résidus cités est limitée par la délocalisation de liaison  $\pi$  dans laquelle ils sont impliqués. Ils possèdent cependant en ce sens un caractère nucléophile et un comportement proches de celui des azotes amide de la chaîne peptidique. On peut alors penser qu'ils seraient capables de contribuer à la fixation du cuivre en formant le même type de liaison faisant intervenir les azotes amide, liaisons définies par des caractéristiques spectrales pouvant correspondre à celles mises en évidence par RPE et par dichroïsme circulaire. La lysine et l'arginine possèdent un caractère nucléophile plus important, le doublet des atomes considérés étant libre pour participer à une liaison avec un ion Cu(II). Pour pouvoir retenir cette hypothèse, il faudrait considérer cependant les caractéristiques spectrales de liaison N-Cu identiques à celles de la liaison mise en œuvre par les azotes amide, ce qui est plus difficilement concevable, en particulier au vu des spectres ENDOR.

Les deux résidus histidine n'interviennent pas en tant que ligands des ions Cu(II) dans la liaison CopH-Cu. Ces deux acides aminés azotés jouent cependant un rôle essentiel dans l'affinité de la protéine pour les ions Cu(II), comme le démontrent les expériences de chromatographie d'affinité, de résonance plasmonique de surface et surtout de microcalorimétrie. Cette dernière fournit une valeur de constante de dissociation d'environ 36 nM pour la protéine sauvage. Pour le mutant His26Ala, ne possédant plus que l'histidine 24, la constante de dissociation est voisine de 200 nM. Lorsque l'histidine en position 24 est absente, aucune interaction entre la protéine mutée et les ions Cu(II) n'est détectée. L'histidine en position 24 jouerait donc un rôle prépondérant par rapport à sa voisine, dans l'affinité.

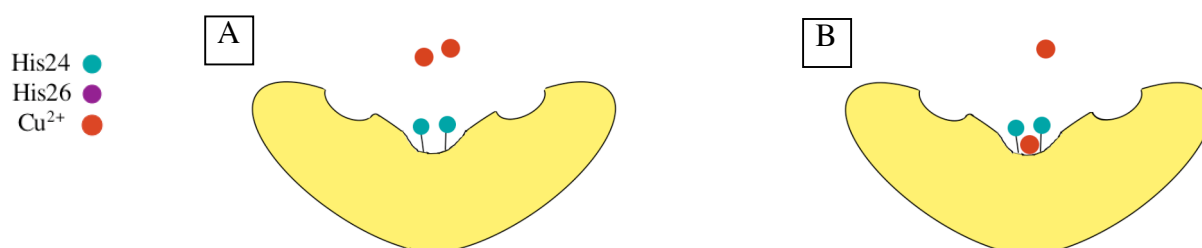
Nous pouvons alors nous poser la question : comment les résidus histidine peuvent-ils intervenir dans l'affinité de la protéine pour les ions Cu(II) sans être impliqués en tant que ligands métalliques ? Une idée consisterait à invoquer la participation des histidines, *via* les ions Cu(II), dans la déprotonation des azotes amide, comme le suggèrent Miura T. *et al.* dans le cas de la protéine Prion (Miura, T. *et al.* 1999). Les azotes amide de la chaîne polypeptidique sont généralement neutres du fait de leur très faible acidité ( $pK_a \approx 15$ ) (Sigel, H. et Martin, B. 1982). Cependant, l'ionisation d'un groupement amide peut être initiée par la présence d'ions Cu(II) lorsqu'une histidine et un groupement amine en N-

terminal sont disponibles pour participer à une liaison (Sundberg, R. J. et Martin, R. B. 1974). L'histidine intervient en réalité dans un réseau de relais de proton au sein duquel le noyau imidazole permet de renforcer le caractère nucléophile des azotes amide en captant leur proton. De tels complexes de Cu(II) sont formés en N-terminal des sérum albumines ainsi que dans le cas des peptides courts synthétisés pour mimer les sites de liaison aux ions Cu(II) chez les albumines (par exemple la glycyglycyl-L-histidine) (Sigel, H. et Martin, B. 1982 ; Sarkar, B. et Wigfield, Y. 1968 ; Lau, S *et al.* 1984). La déprotonation des azotes amide a également été observée dans les complexes de Cu(II) avec des peptides comme l'acétylglycyglycyl-L-histidine (Bryce, G. F. *et al.* 1965) qui possèdent un seul site de liaison. Ceci suggère que la liaison des ions Cu(II) à la chaîne latérale d'une histidine pourrait induire l'ionisation des azotes amide voisins, au sein d'une protéine. Un facteur possible pouvant empêcher cette chélation est l'encombrement stérique provoqué par les chaînes latérales des acides aminés ainsi que la chaîne peptidique. La chélation métallique nécessite en effet un arrangement compact du site de liaison et des azotes amide (Sundberg, R. J. et Martin, R. B. 1974 ; Morris, P. J. et Martin, R. B. 1971). A partir de cette réflexion, nous pouvons penser que les histidines interagiraient avec les ions cuivre de façon à les conduire au sein d'un site spécifique formé par quatre azotes amide, déprotonés par l'approche d'un ion Cu(II). Ces quatre azotes chargés alors négativement peuvent former une liaison avec l'ion Cu(II) selon une géométrie à base carrée.

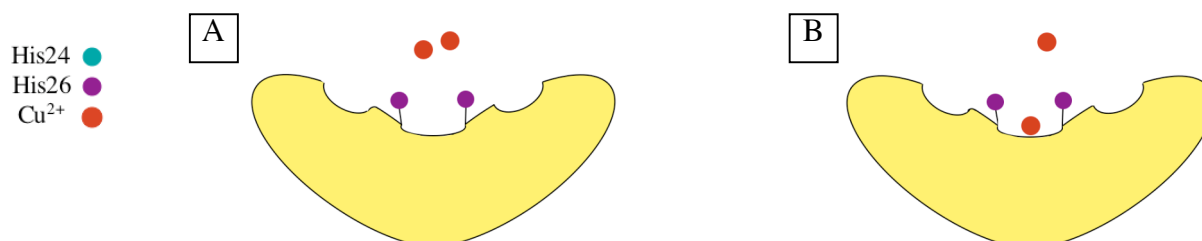
De là, les résidus histidine auraient donc non seulement un rôle dans l'affinité, mais également dans la préparation structurale du site accueillant l'ion Cu(II). Cette hypothèse est confirmée par le fait qu'en l'absence des histidines, l'affinité décroît de façon drastique. Les histidines, en particulier celle en position 24, permettrait une légère structuration du site dans lequel elles conduiraient l'ion Cu(II). Cette structuration, très locale et très faible, pourrait ne pas être perçue par les techniques utilisées, comme le dichroïsme circulaire. Nous remarquons cependant qu'en l'absence d'histidine, les caractéristiques RPE de la protéine en présence de 2 équivalents de cuivre restent inchangées. Les ions cuivre se fixent donc toujours au même endroit, même si les histidines ne sont pas là pour les guider. Le site serait donc déjà prêt à accueillir les ions métalliques, les histidines étant là pour aider à une meilleure structuration du site, très locale, menant à une meilleure affinité (Fig. 126 à 129).



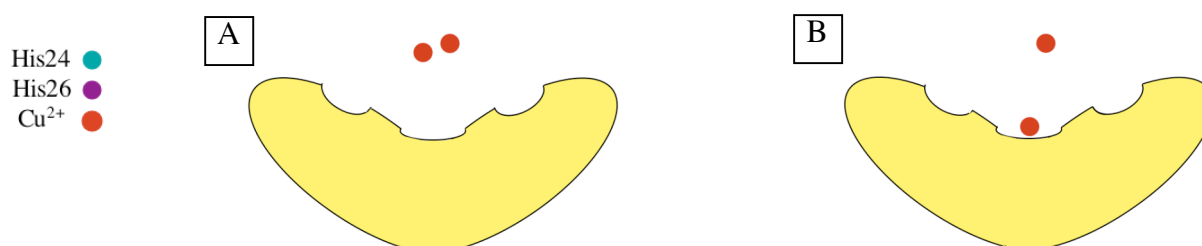
**Figure 126** : Représentation schématique de la protéine CopH suivant l'hypothèse d'un dimère symétrique possédant quatre sites, deux de haute affinité, et deux autres de plus faible affinité. L'histidine 24 de chacun des monomères est représentée par une boule verte, l'histidine 26 par une boule violette, et les ions Cu(II) par une boule rouge-orange. (A) CopH en présence de deux ions Cu(II). (B) Les histidines guident les ions Cu(II) vers les sites de plus haute affinité. (C) Les deux ions Cu(II) se logent au sein des sites cuivre de type 2, dans une pyramide à base carrée.



**Figure 127** : Représentation schématique du simple mutant His26Ala suivant l'hypothèse d'un dimère symétrique ne possédant plus qu'un site de haute affinité, et deux autres de plus faible affinité. L'histidine 24, non mutée, est représentée par une boule verte. (A) His26Ala en présence de deux ions Cu(II). La mutation de l'histidine 26 a modifié légèrement la conformation du site de haute affinité sur chacun des monomères. (B) L'histidine 24 guident les ions Cu(II) vers le site de plus haute affinité et les deux ions Cu(II) se logent au sein du site cuivre de type 2, dans une pyramide à base carrée.



**Figure 128** : Représentation schématique du simple mutant His24Ala suivant l'hypothèse d'un dimère symétrique ne possédant plus qu'un site d'assez faible affinité, outre les deux autres de plus faible affinité. L'histidine 26, non mutée, est représentée par une boule violette. (A) His24Ala en présence de deux ions Cu(II). La mutation de l'histidine 24 a modifié la conformation du site de haute affinité sur chacun des monomères. (B) L'histidine 24 guide difficilement les ions Cu(II) vers le site de plus haute affinité et les deux ions Cu(II) se logent au sein du site cuivre de type 2, dans une pyramide à base carrée, avec une affinité plus faible que dans le cas du mutant His26Ala.

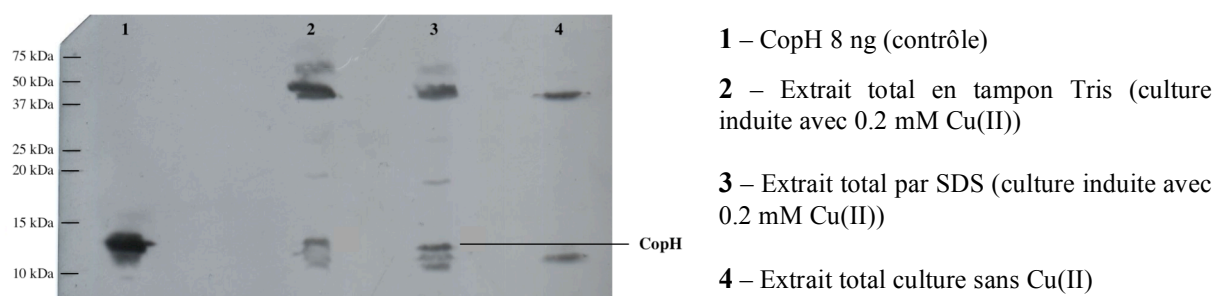


**Figure 129** : Représentation schématique du double mutant His24-26Ala suivant l'hypothèse d'un dimère symétrique ne possédant plus que des sites de faible affinité. (A) His24-26Ala en présence de deux ions Cu(II). (B) Aucune histidine n'est présente pour guider les ions Cu(II) vers le site de préférentiel, restant tout de même suffisamment structuré pour accueillir un ion Cu(II) qui se logent au sein du site cuivre de type 2, dans une pyramide à base carrée, avec une faible affinité.

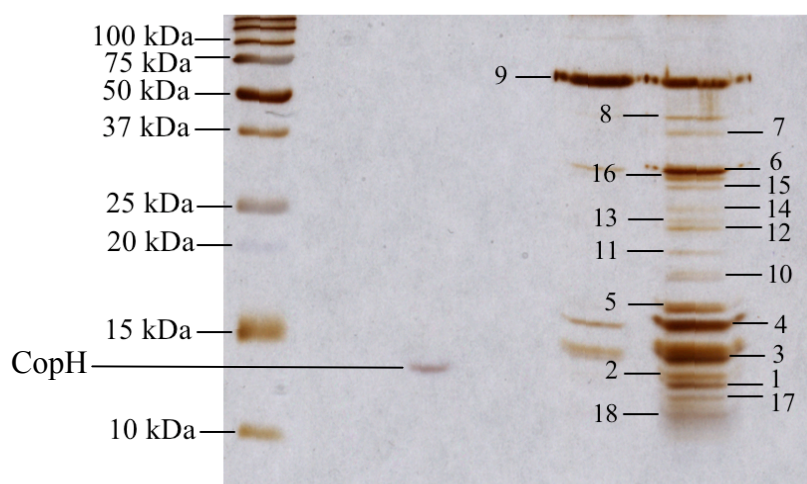
CopH se révèle être une protéine quasi unique, ne possédant qu'un seul paralogue chez *C. metallidurans* CH34, nommé CzcE (Fig. 87). CzcE est une protéine périplasmique qui a d'abord été identifiée, par chromatographie d'affinité, comme étant capable de lier les ions Cu(II), Zn(II), Ni(II) et Co(II) fixés sur colonnes NTA. Son étude a été reprise récemment au laboratoire. Nous avons pu montrer que CzcE, protéine codée par le gène *czcE* appartenant au cluster responsable de la résistance aux ions cobalt, zinc et cadmium, ne fixait en réalité que les ions Cu(II) (Zoropogui, A. *et al.* soumis). L'implication du seul résidu histidine, en position 24, dans la liaison au métal a été démontrée par modification chimique en utilisant le diéthylpyrocarbonate (Grosse, C. *et al.* 2004).

La régulation de l'opéron *czc* est complexe et se fonde sur l'action concertée de plusieurs promoteurs différents, dont l'action est probablement contrôlée par la concentration en ions métalliques dans le cytoplasme et le périplasma. Parmi les trois métaux régulés, deux sont essentiels (cobalt et zinc) tandis que le troisième est toxique (le cadmium), ce qui constitue probablement une raison au nombre élevé de protéines régulatrices de l'opéron *czc* (Grosse, C. *et al.* 2004). CzcE pourrait être un senseur utilisant la concentration périplasmique en cation comme un signal pour la régulation de l'expression d'une pompe à efflux formée des protéines CzcA, CzcB et CzcC (Rensing, C. *et al.* 1997). Il a été montré récemment que CzcE possédait deux sites distincts, par dimère, pouvant accueillir les ions cuivre à l'état d'oxydation I (Cu(I)) et à l'état d'oxydation II (Cu(II)). Cette caractéristique se retrouve chez les protéines CopC et PcoC. Si la fonction de CzcE est similaire à celle de ces dernières, alors il s'agit d'une protéine qui apporte soit les ions Cu(I), soit Cu(II), à des partenaires selon les conditions. Outre leur homologie de séquence, CopH et CzcE partagent également la même localisation périplasmique et appartiennent à un régulon codant pour un système de régulation à deux composants (Munson, G. P. *et al.* 2000 ; Yamamoto, K. *et al.* 2005). Nous pouvons alors penser que le rôle physiologique de CopH pourrait avoir un lien avec la régulation de la détoxification en cuivre. Il a déjà été mentionné que la régulation de l'homéostasie du cuivre agissait sur deux clusters de gènes. L'un d'entre eux semblerait être spécialisé dans la réponse cellulaire à de hautes concentrations de cuivre, avec une coordination possible des senseurs de cuivre périplasmique et cytoplasmique (Monchy, S. *et al.* 2006). CopH, dont l'induction maximale est observée une heure après le stress cuivre, pourrait être impliquée comme senseur du cuivre périplasmique une fois le mécanisme de détoxification activé, et interviendrait par conséquent dans la régulation de la phase de réponse tardive. Par analogie avec CzcE, la fonction régulatrice pourrait être remplie *via* une interaction avec CopS, régulant ainsi la phosphorylation de CopR (Yamamoto, K. *et al.* 2005).

La question concernant la fonction de CopH reste posée. Cependant, à la lumière de ses différentes caractéristiques mises en évidence au cours de ce travail, nous pouvons penser que CopH aurait un rôle très spécifique dans la gestion des ions Cu(II) au sein de l'espace périplasmique. Par exemple, CopH pourrait être impliqué comme récepteur des ions Cu(II) provenant de l'oxydase à cuivre, CopA (Rensing, C. et Grass, G. 2003). Elle permettrait ainsi le recyclage des ions cuivre portés par CopA. CopH pourrait également servir de transporteur à cuivre entre différentes protéines du cluster *cop*, comme il a été proposé pour CopC (Arnesano, F. *et al.* 2003). Toutes ces hypothèses suggèrent l'existence d'interactions entre différents partenaires. Nous avons donc effectué des expériences d'immunoprécipitation dans l'optique de mettre en évidence un ou plusieurs partenaires de CopH. Nous avons confirmé que la protéine était exprimée par la bactérie *C. metallidurans* CH34 à la suite d'un stress cuivre. Cependant, son taux d'expression est trop faible pour se distinguer du bruit de fond. Il est possible d'identifier toutes les protéines visibles sur gel SDS-PAGE (Fig. 131), dans les fractions d'élution. Nous n'avons néanmoins pas pu distinguer d'éventuel(s) partenaire(s) appartenant au cluster *cop* et nous mettre sur la voie d'une fonction pour CopH à la suite d'un stress cuivre chez *C. metallidurans* CH34 (Fig. 130 et 131). Cependant, toutes ces hypothèses sont cohérentes avec le fait que ces interactions pourraient être favorisées par la grande flexibilité de CopH. Enfin, une caractérisation fonctionnelle et structurale plus détaillée de l'ensemble du cluster *cop*, mais également d'autres clusters intervenant dans la résistance à d'autres métaux, est nécessaire pour comprendre le fonctionnement complexe de chacune de ses protéines en interaction avec les autres (Fig. 132). D'autre part, il a été montré que plusieurs gènes, appartenant à des clusters différents, étaient induits par un stress dû à un métal autre que celui ou ceux définissant le cluster auquel ils appartiennent. Il est donc probable qu'un gène impliqué dans la résistance à un métal intervienne également dans le mécanisme de résistance à un autre métal. Ainsi, une caractérisation plus détaillée de l'ensemble du cluster *cop*, mais également d'autres clusters intervenant dans la résistance à d'autres métaux, apparaît nécessaire afin d'appréhender le fonctionnement particulièrement complexe de l'homéostasie du cuivre chez *C. metallidurans* CH34.

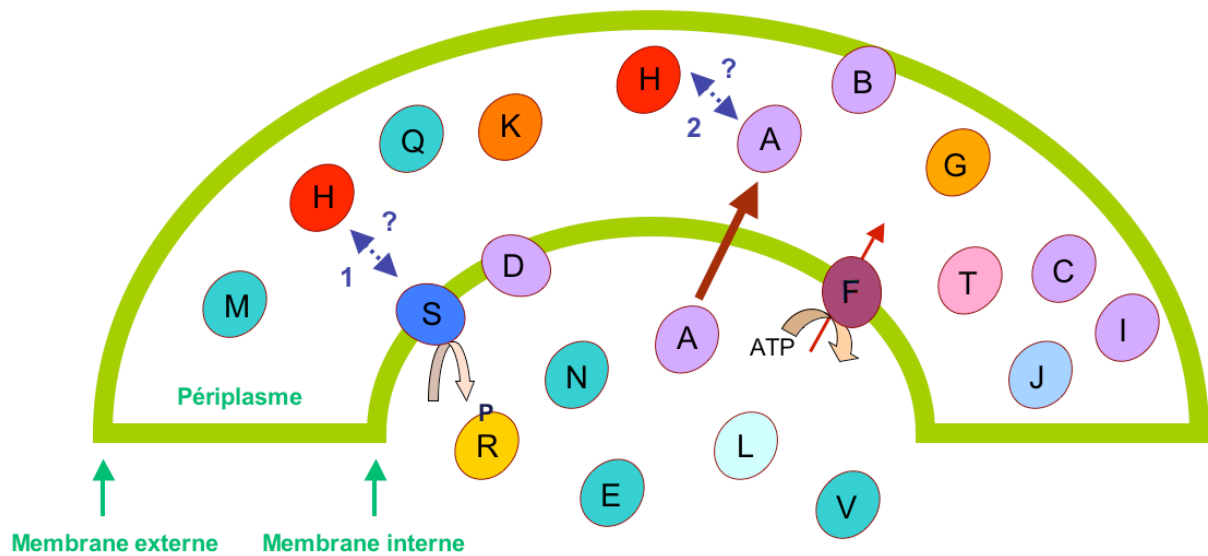


**Figure 130** : Western-blot des extraits totaux de cultures de *C. metallidurans* CH34 avec ou sans cuivre. Confirmation de l'induction de CopH après 1 heure, par 0.2 mM Cu(II).



**Figure 131** : Analyse et identification par spectrométrie de masse des différentes protéines présentes dans l'éluion après immunoprécipitation de la protéine CopH

N° trypsinolyse	Nom protéines	% recouvrement	N° acides aminés	MW théorique (Daltons)	pI théorique
1	Ribosomal protein S10	60	102	11670	9.69
2	CopH				
3	Ribosomal protein S11	30	133	14126	11.40
4	Ribosomal protein L17			15054	10.92
5	OsmC-like protein	49	127	13883	9.42
6	Ribosomal protein S3	53	265	29872	10.60
7	Hypothetical protein	27	369	41888	6.67
8	Translation elongation factor Tw	31	396	43346	5.41
9	Albumine (Bos taurus)	56	607	71274	5.82
10					
11					
12	Ribosomal protein L4/L1e	35	206	22840	9.88
13					
14					
15	Ribosomal protein S2	38		27276	6.47
16	Ribosomal protein L2	76	276	20115	11.05
17	Ribosomal protein S21				
18	Ribosomal protein S15	77	89	10154	10.90



**Figure 132 :** Représentation schématique de l'ensemble des protéines du cluster *cop* dans leur espace périplasmique, cytoplasmique ou membranaire. CopH est représentée en rouge. La double flèche 1 pose la question du rôle de CopH en tant que senseur à cuivre ; elle interagirait ainsi avec CopS. La double flèche 2 interroge sur le rôle de CopH comme protéine impliquée dans le recyclage des ions Cu(II) portés par CopA. Il n'est pas exclu que CopH puisse également interagir avec d'autres protéines codées par des gènes appartenant à d'autres clusters ou opérons.



*Les transporteurs*

*membranaires*

*CusA et CzcA*



## Résultats

L'étude des deux transporteurs membranaires CusA et CzcA a fait l'objet de mon premier projet de thèse. Ces deux protéines font partie de la famille HME-RND (Heavy Metal Efflux – Resistance Nodulation cell Division) décrite dans le chapitre « Introduction ». Ces protéines sont membranaires. Leur extraction ainsi que leur purification nécessitent par conséquent l'utilisation de détergent(s) afin de pouvoir les obtenir, sous forme solubilisées, en solution.

L'étude de protéines membranaires constituait un nouveau projet au sein de notre équipe, projet initié par Dominique Cannella quelques mois avant mon arrivée en thèse.

Le travail sur les deux transporteurs a été réalisé dans un but fonctionnel et structural. Dans ce dernier cas, il est communément admis qu'une préparation protéique homogène, ou monodisperse, facilite, et est même nécessaire, à la cristallisation de la protéine d'intérêt. Suivant ce « dogme », mon travail s'est axé sur la recherche d'un ou plusieurs détergents permettant la meilleure solubilisation et la meilleure purification possible de la protéine d'intérêt, et surtout la plus grande homogénéité de la préparation protéique.

J'ai choisi de présenter mon travail de façon chronologique afin de permettre au lecteur de mieux comprendre le chemin que j'ai suivi, le choix des techniques de caractérisation utilisées et les difficultés rencontrées. Ce travail s'est étalé sur plus d'un an. Il a ensuite été poursuivi par David Stroebel, alors post-doc au laboratoire, et réorienté vers l'étude du comportement de CusA en détergent, en comparaison de celui de AcrB, seule protéine RND cristallisée à ce jour. Les observations que nous avons pu faire et la conclusion à laquelle nous sommes arrivés sont plutôt surprenantes et vont à l'encontre du « dogme » précédemment cité. Ce travail et la réflexion quant à la nécessité de disposer d'une préparation protéique absolument monodisperse dans un but fonctionnel et structural ont été décrits dans un article publié en mars 2007 dans *BBA Biomembranes* (Stroebel, D. *et al.* 2007).

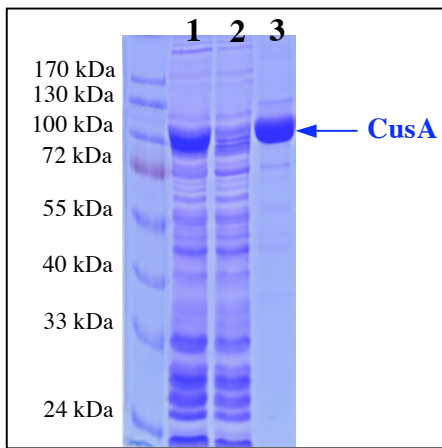
La première partie de ce chapitre concerne les travaux réalisés sur la protéine CusA dans un but structural. La seconde partie porte sur l'étude de la protéine CzcA, et s'appuie sur la description des travaux effectués dans un but structural mais également fonctionnel.

## I –La protéine CusA : homogénéité et approche structurale

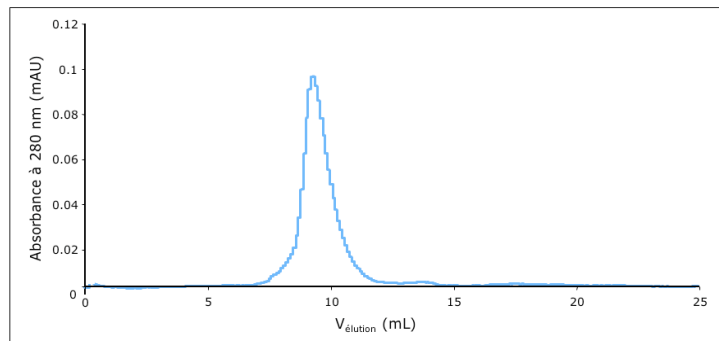
### 1.1 Surexpression et purification de CusA en DDM

La construction du plasmide d'expression a été conçue selon la séquence codante du gène *cusA* au sein du vecteur pASK-IBA3 permettant d'ajouter, en C-terminal de la protéine, un strep-tag II, composé de 10 acides aminés (SAWSHPQFEK). Le plasmide pASK-IBA3:*cusA* nous a été donné par l'équipe du professeur D. H. Nies, avec laquelle nous travaillons en collaboration. Les conditions d'expression et le protocole général de purification de la protéine ont été repris à partir de ceux décrits pour la protéine CzcA (Goldberg, M. *et al.* 1999). Nous nous sommes de même appliqués à optimiser les conditions de surproduction de la protéine CusA. Les meilleurs résultats ont été observés lorsque CusA est surexprimée dans la souche BL21(DE3)pLysS d'*E. coli*, après une induction de 4 heures à 37°C, dans du milieu TB, par 200 µg/L d'anhydrotétracycline. Il est à noter que, généralement, la surproduction d'une protéine membranaire est difficile à visualiser sur gel SDS-PAGE à partir des extraits bruts après culture. Les contrôles de surexpression ont donc été effectués, à ce stade, par Western-Blot. Bien que ces analyses révélaient une bonne surproduction de la protéine, à la masse attendue, une autre souche - BL21C43 d'*E. coli* - a été utilisée afin d'augmenter le rendement lors de la surexpression de CusA. Cependant, aucune différence avec les cultures précédentes n'a été remarquée. Nous sommes donc restés sur notre premier choix, CusA étant surexprimée dans la souche BL21(DE3)pLysS d'*E. coli*, avec un excellent rendement pour une protéine membranaire (environ 25 à 30 % des protéines membranaires totales). Ce résultat peut être déduit de l'analyse du gel SDS-PAGE après solubilisation des extraits membranaires en détergent (Fig. 133 piste 1). Dans ce cas, la surproduction de la protéine CusA est nettement visible.

La présence du strep-tag II, en fusion avec la protéine, a permis de simplifier la principale étape de purification : après solubilisation en DDM (1 %), l'extrait membranaire est chargé sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> (IBA) et CusA est éluée, par la desthiobiotine, avec un excellent degré de pureté après une seule étape de purification (Fig. 133 piste 3). La protéine est ensuite concentrée suivant plusieurs cycles de concentration/dilution afin d'éliminer la desthiobiotine. Le rendement en protéine est d'environ 800 µg par litre de culture.



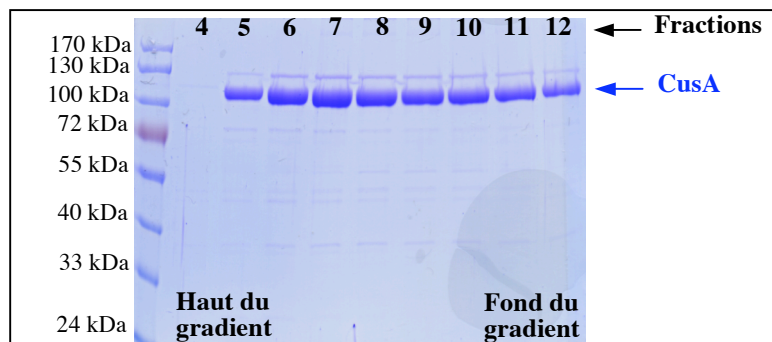
**Figure 133** : Gel SDS-PAGE (12%) représentant (1) l'extrait membranaire après solubilisation en tampon (Tris-HCl 100 mM pH = 8, DDM 1 %, NaCl 500mM), (2) l'ensemble des protéines non retenues sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>, (3) la protéine CusA après purification sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>



**Figure 134** : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel (colonne Superdex-200 – 25 mL) de la protéine CusA après passage sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> ( $V_{\text{élution}} = 9,3$  mL,  $V_{\text{mort}} = 8,9$  mL et  $V_{\text{total}} = 25$  mL)

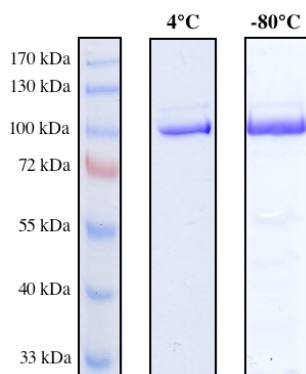
Afin d'avoir une idée de l'homogénéité et du poids moléculaire de la protéine purifiée en détergent, CusA a été chargée sur colonne analytique Superdex 200 (25 mL) calibrée. Le chromatogramme montre un pic relativement symétrique, centré sur un volume d'élution de 9,3 mL (Fig. 134). La calibration de la colonne permet de faire correspondre ce volume avec une masse, pour le complexe membranaire purifié, d'environ 600 kDa. Cette valeur paraît excessivement grande. En effet, en considérant que la protéine soit purifiée sous forme trimérique ( $3 \times 114,7$  kDa  $\approx$  344 kDa), CusA serait entourée de molécules de détergent et peut-être également de molécules de lipides assez nombreuses pour atteindre environ 600 kDa et donc quasiment doubler la masse de la protéine. Cependant, cette valeur ne constitue qu'une estimation grossière de la masse, une filtration sur gel permettant plutôt d'accéder au rayon hydrodynamique de la protéine (le Maire, M. *et al.* 2000). Même si la masse paraît élevée, le rayon hydrodynamique du complexe membranaire purifié se révèle toutefoix incontestablement très grand (de l'ordre 85 Å) et montre que nous sommes en présence d'un complexe protéine-détergent-lipides conséquent. Nous le verrons par la suite (paragraphe 1.4), une étude par dosage des molécules de détergent et de lipides a été menée en utilisant des méthodes classiques et par infra-rouge à transformée de Fourier. D'autre part, la protéine est éluee dans un volume quasi égal au volume mort de la colonne ( $V_{\text{mort}} = 8,9$  mL et  $V_{\text{élution}} = 9,3$  mL). L'étude par chromatographie sur gel ne peut donc pas nous apporter d'informations précises quant à la taille exacte de la protéine purifiée en détergent.

Une autre méthode nous a permis d'évaluer l'homogénéité de la protéine : l'analyse de l'équilibration de la protéine au sein d'un gradient de sucrose après centrifugation pendant plusieurs heures à haute vitesse. Après collecte du contenu du gradient par fractions de 800  $\mu$ L, le gel SDS-PAGE correspondant montre la présence de la protéine dans toutes les fractions, et non dans une région restreinte du gradient (Fig. 135). Cette méthode met en doute l'homogénéité de la préparation de CusA. Une étude plus précise de l'homogénéité par différentes méthodes (microscopie électronique et ultracentrifugation analytique) sera décrite par la suite (paragraphe 1.3.2 et 1.3.3).

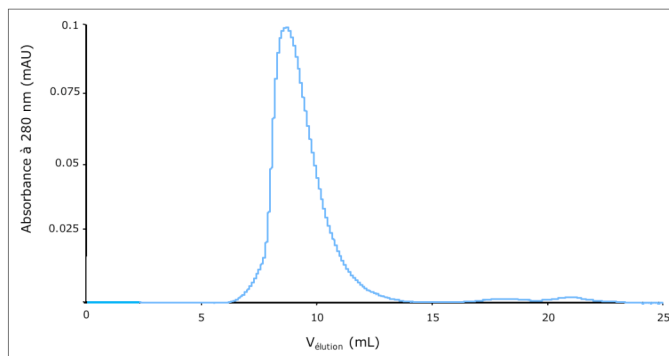


**Figure 135** : Gel (12%) SDS-PAGE représentant le contenu des différentes fractions de 800  $\mu$ L collectées à partir d'un gradient de sucrose contenant 0,05% DDM. La protéine CusA est présente dans les fractions 5 à 12.

La stabilité de la protéine a été suivie par électrophorèse SDS-PAGE. CusA purifiée en DDM paraît stable plusieurs semaines à 4°C et la congélation à -80°C ne provoque pas de dégradation de la protéine (Fig. 136). Les profils obtenus après filtration sur gel de la protéine laissée une semaine à 4°C, ou de la protéine fraîchement décongelée, sont également similaires à celui de CusA juste après purification sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. Aucun autre pic, pouvant signifier la dénaturation de la protéine, n'est visible (Fig. 137). De la même façon, l'étude par ultracentrifugation analytique de la protéine CusA laissée une semaine à 4 °C confirme la stabilité de l'échantillon protéique (voir paragraphe 1.3.2).



**Figure 136** : Gels SDS-PAGE (12%) représentant la protéine CusA après 3 semaines à 4°C et après congélation à -80°C. La protéine apparaît toujours avec le même degré de pureté.



**Figure 137** : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel (colonne Superdex-200 – 25 mL) de la protéine CusA après une semaine à 4°C ( $V_{\text{élution}} = 9,3$  mL). Un profil similaire est obtenu dans le cas de la protéine congelée à -80°C. Ce chromatogramme est identique à celui enregistré juste après purification sur colonne *Strep-Tactin*® Sepharose®.

## 1.2 Solubilisation ménagée de CusA par d'autres détergents

L'étude de la protéine par équilibration sur gradient de densité de sucrose nous ayant montré l'absence d'homogénéité de la préparation protéique, homogénéité constituant pourtant a priori un facteur essentiel à la cristallisation des protéines, nous avons cherché à identifier d'autres détergents permettant une bonne solubilisation des extraits membranaires, et permettre ensuite d'obtenir une préparation protéique homogène, et une bonne stabilité.

### 1.2.1 Détermination de détergents adéquats à la solubilisation de CusA

Nous nous sommes d'abord appliqués à étudier la solubilisation des extraits membranaires de CusA dans différents détergents, en fonction de la concentration de ces derniers. Une gamme de détergents a été explorée : DDM,  $\beta$ -OG, fos-choline 12 (FC12), fos-choline 14 (FC14), fos-choline (FC16) (Fig. 138 et Tab. 20). La protéine CusA paraît presque totalement solubilisée pour un rapport massique  $m_{\text{CusA}}/m_{\text{DDM}} = 1,4$  (ce qui correspond à une concentration en détergent de 0,05 %, égale à 5 fois la concentration micellaire critique) et l'est totalement pour un rapport  $m_{\text{CusA}}/m_{\text{DDM}}$  de 0,9 (soit  $[\text{DDM}] = 0,078\%$ ). Ceci va dans le sens du choix d'une concentration en DDM de 1 % pour la solubilisation des extraits membranaires et 0,05 % DDM pour la purification de CusA. De son côté, le  $\beta$ -OG s'est montré incapable de solubiliser les extraits membranaires : il apparaît donc inapproprié à la solubilisation de CusA. La fos-choline 12 a montré une bonne capacité à solubiliser la

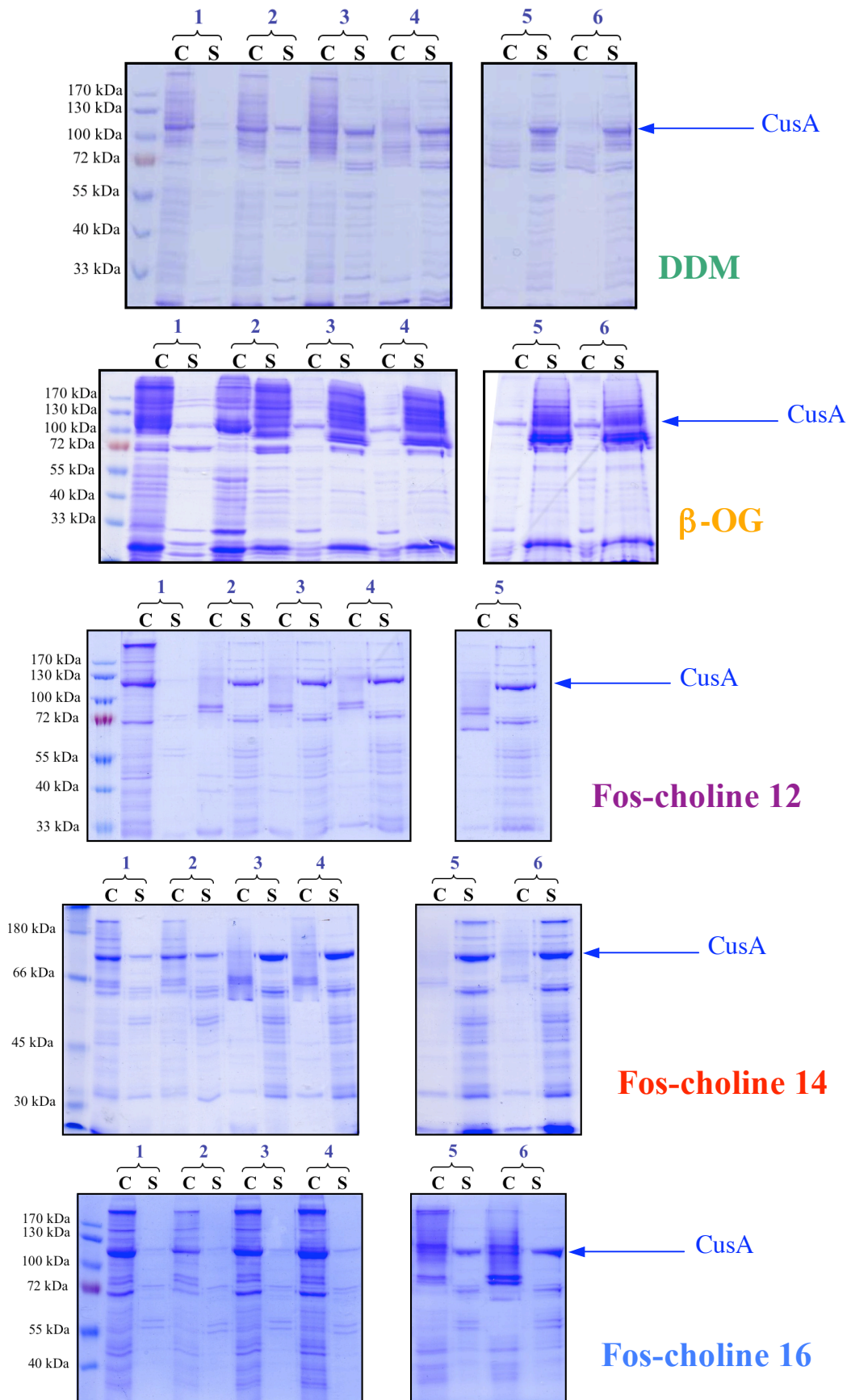
protéine dès 0,12 % (soit 2.3 fois la cmc). Il en est de même pour la fos-choline 14 (dès 0,045 % soit 10 fois la cmc), et la fos-choline 16 (avec 0,018 % soit 34 fois la cmc).

A partir de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser la fos-choline 12 et la fos-choline 14 afin d'optimiser la purification de CusA. En effet, la cmc de la fos-choline 16 étant très faible, le contrôle de la concentration en détergent ainsi qu'un éventuel échange avec un autre détergent se révèlent difficiles. D'autre part, il est nécessaire d'utiliser une concentration minimale de 34 fois la cmc de la fos-choline 16 pour observer la solubilisation des extraits membranaires de la protéine CusA, ce qui est très grand en termes de concentration ainsi qu'en termes de coût. Toutes ces remarques justifient que la purification de CusA dans ce détergent n'ait pas été optimisée.

	<b>DDM</b> M = 510,63 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,01%		<b>β-OG</b> M = 292,4 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,6%		<b>Fos-choline 12</b> M = 351 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,05%		<b>Fos-choline 14</b> M = 379,5 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,0045%		<b>Fos-choline 16</b> M = 407,5 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,00053%	
	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%
<b>1</b>	∞	0	∞	0	5	0,014	∞	0	∞	0
<b>2</b>	2,8	0,025	0,048	1,46	0,5	0,14	5	0,014	50	0,0014
<b>3</b>	1,4 (5 × cmc)	0,05	0,019 (6 × cmc)	3,65	0,13 (10 × cmc)	0,53	1,54 (10× cmc)	0,045	13,23 (10× cmc)	0,0053
<b>4</b>	0,9	0,078	0,012	5,85	0,09	0,78	0,9	0,078	9	0,0078
<b>5</b>	0,5	0,14	0,0068	10,2	0,05	1,4	0,5	0,14	5	0,014
<b>6</b>	0,28	0,25	0,0048	14,6			0,28	0,25	2,8	0,025

**Tableau 20** : Conditions testées pour la solubilisation ménagée des extraits membranaires de la protéine CusA. Les extraits obtenus ont été analysés sur gel SDS-PAGE (12 %) (voir Fig. 138).

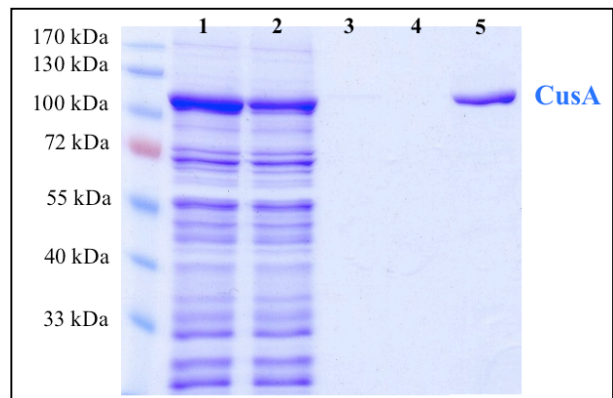




**Figure 138** : Solubilisation ménagée des extraits membranaires de la protéine CusA par différents détergents. **C** signifie que la protéine se trouve dans le culot après centrifugation (fraction insoluble). **S** signifie que la protéine se trouve dans le surnageant après centrifugation (fraction soluble). Les numéros correspondent aux conditions décrites dans le tableau 20.

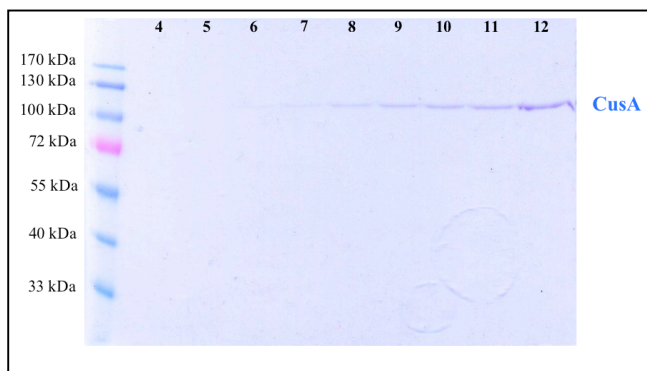
### 1.2.2 Purification en fos-choline 12

Le même protocole décrit en 1.1 est repris en remplaçant le DDM par la fos-choline 12, à une concentration correspondant à celle déterminée par solubilisation ménagée des extraits membranaires de CusA, soit 0.18%. Dans ce cas, la protéine paraît mal retenue sur la colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. Elle apparaît pure après cette étape de chromatographie d'affinité (Fig. 139).

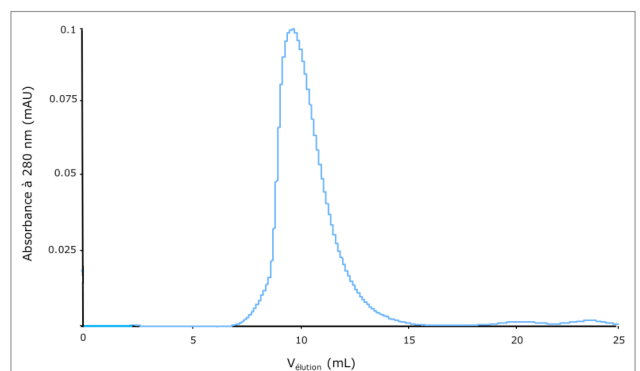


**Figure 139** : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant les différentes étapes de la purification de CusA en fos-choline 12 0,18 %. **(1)** extrait membranaire solubilisé en fos-choline 12 0,18 %. **(2)** fraction non retenue après chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. **(3)** lavage en tampon 2 (Tris-HCl pH = 8, FC12 0,2 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(4)** lavage en tampon 3 (Tris-HCl pH = 8, FC12 0,08 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(5)** Elution de CusA.

La filtration sur gel révèle une protéine apparaissant sous la forme d'un pic symétrique, mais centré sur le même volume d'éluion (9,3 mL) (Fig. 141) que précédemment, lors de la purification en DDM. L'analyse par gradient de sucrose montre quant à elle une protéine présente dans les fractions 7 à 12 collectées à partir du haut du gradient (Fig. 140). La protéine se trouve donc dans les fractions correspondant au fond du tube, là où le gradient est le plus dense. Ce résultat nous amène à penser à une agrégation importante de la protéine purifiée dans ce détergent.



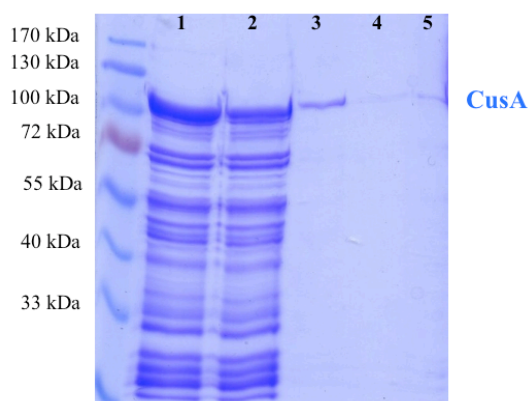
**Figure 140** : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant le contenu des différentes fractions de 800  $\mu$ L collectées à partir d'un gradient de sucrose contenant 0,08 % de FC12. La protéine CusA est présente dans les fractions 6 à 12.



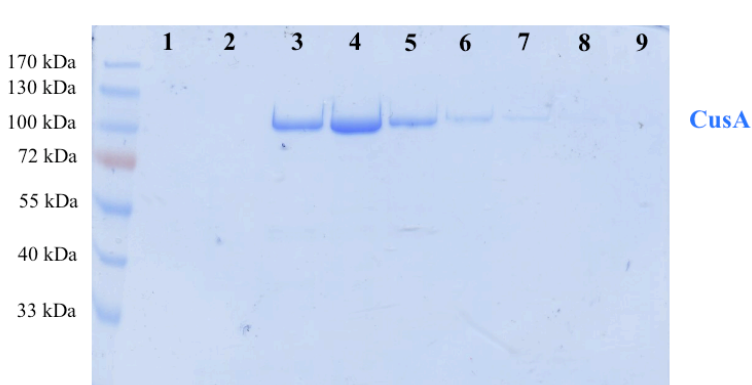
**Figure 141** : Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel (colonne Superdex-200 – 25 mL) de la protéine CusA après purification sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> ( $V_{\text{élution}} = 9,3$  mL).

### 1.2.3 Purification en fos-choline 14

Les étapes de purification décrites précédemment sont suivies en solubilisant la protéine dans un tampon Tris-HCl 100 mM, fos-choline 14 0,05 %, NaCl 500 mM (Fig. 142 piste 1). Il est net que l'affinité de la protéine pour la biotine de la colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> est très faible en présence de fos-choline 14, comme en fos-choline 12 : une grande quantité de CusA est toujours visible dans la partie non retenue (flow-through) (Fig. 142 piste 2). Une partie est également éluée lors du lavage de la colonne en tampon Tris-HCl 100 mM, fos-choline 14 0,05 %, NaCl 100 mM (Fig. 142 piste 3). La vérification de la nature de la protéine visible dans la fraction non retenue et dans celle correspondant au lavage de la colonne a été réalisée par Western-blot et y confirme la présence de la protéine CusA. A cette étape, l'étude du comportement de CusA sur gradient de sucrose montre une protéine équilibrée dans seulement deux fractions, dans le haut du gradient, révélant une meilleure homogénéité de la préparation en comparaison de celle obtenue avec les détergents précédents (Fig. 143).

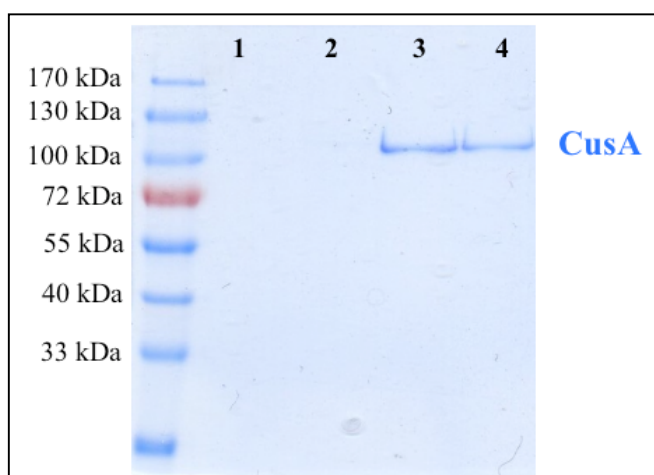


**Figure 142** : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant les différentes étapes de la purification de CusA en fos-choline 14 0,025%. **(1)** extrait membranaire solubilisé en tampon Tris-HCl 100 mM, fos-choline 14 0,05 %, 500 mM NaCl. **(2)** fraction non retenue après chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. **(3)** lavage en tampon 2 (Tris-HCl pH = 8, FC14 0,05 %, NaCl 100 mM) (10 mL). CusA est éluée avec le tampon de lavage. **(4)** lavage en tampon 3 (Tris-HCl pH = 8, FC14 0,025 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(5)** Elution de CusA. La protéine n'est pas présente, son élution ayant été provoquée précédemment par le premier lavage.



**Figure 143** : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant le contenu des différentes fractions de 800 µL collectées à partir du haut d'un gradient de sucrose contenant 0,0025 % fos-choline 14. L'échantillon déposé sur le gradient correspond au contenu de la fraction du premier lavage en tampon 2 (Tris-HCl pH = 8, FC14 0,05%, NaCl 100 mM). La protéine CusA est principalement présente dans les fractions 3, 4 et 5.

Plusieurs idées ont été testées afin d'optimiser l'accroche de la protéine à la résine lors de la première étape de chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. Tout d'abord, sachant que la protéine est solubilisée, dans la première étape, en présence d'une quantité importante de sels (500 mM NaCl), les observations précédentes laissent penser que le chlorure de sodium influe sur l'affinité de la protéine pour la résine. Une trop grande quantité de sels diminuerait l'affinité de la protéine pour la résine. Partant de cette idée, les extraits membranaires ont d'abord été solubilisés en détergent dans un tampon sans sels (Tris-HCl 100 mM, fos-choline 14 0,05 %). La présence de chlorure de sodium reste toutefois importante afin d'éluer, dans les tampons de lavage, des molécules se liant de façon non spécifique, par interaction ioniques, à la colonne. Nous avons alors exploré l'influence des sels pour déterminer la concentration minimale en NaCl permettant d'éliminer ce type d'interactions avant l'élution spécifique de CusA. Différents lavages de la colonne, par des tampons contenant des concentrations croissantes en sels (NaCl), ont alors été effectués et ont montré que CusA était éluee, sans desthiobiotine, dès 200 mM NaCl (Fig. 144).



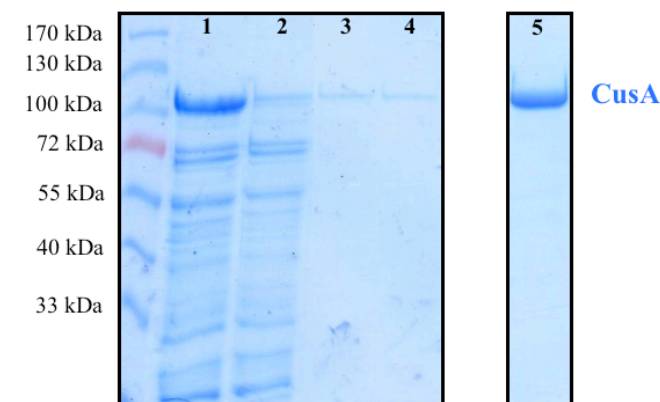
**Figure 144** : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant l'élution de la protéine CusA par des quantités croissantes de NaCl. (1) 100 mM NaCl. (2) 150 mM NaCl. (3) 200 mM NaCl. (4) 250 mM NaCl.

Nous avons donc choisi d'effectuer un premier lavage sans sels, suivi d'un deuxième réalisé avec 150 mM de NaCl, afin d'éliminer les molécules liées de façon non spécifique à la résine

La façon de déposer les extraits membranaires sur la colonne constitue également un paramètre jouant un rôle quant à l'efficacité de la rétention de la protéine sur la résine. Un premier essai a consisté à charger la colonne en continu, à un flux lent, pendant une heure, tout en effectuant plusieurs passages des extraits membranaires sur la colonne afin d'augmenter la proportion de molécules de protéine liées à la résine. Cependant un meilleur résultat a été obtenu en chargeant la protéine en « batch », sous agitation lente, pendant une

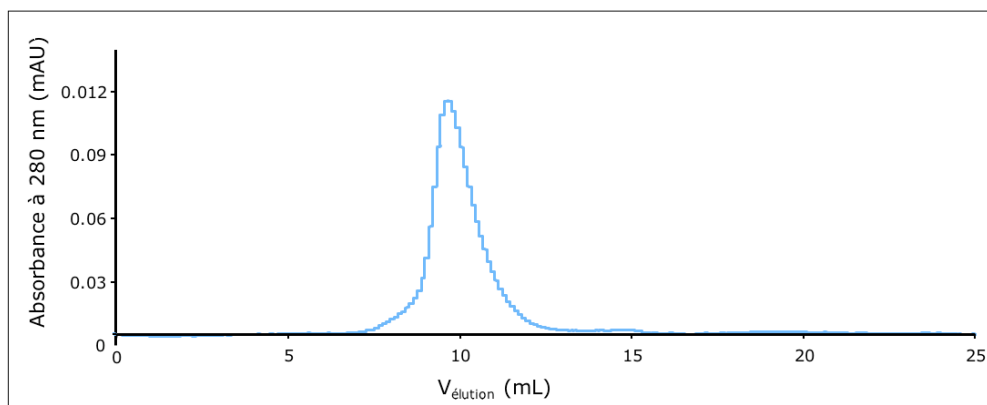
heure. Dans ce cas, la grande majorité des molécules de protéine est retenue sur la colonne (Fig. 145 piste 2).

La figure 145 montre les différentes étapes de la purification de CusA optimisée en fos-choline 14. Les extraits membranaires solubilisés en fos-choline 14 0,05 % sont chargés en « batch » sur la colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. La protéine est éluée, avec un excellent degré de pureté, par 2.5 mM desthiobiotine, après deux lavages en l'absence puis en présence de sels (150 mM de NaCl).



**Figure 145 :** Gel SDS-PAGE (12 %) représentant les différentes étapes de la purification de CusA optimisée, en fos-choline 14 0,025 %. **(1)** extrait membranaire solubilisé en tampon Tris-HCl 100 mM, fos-choline 14 0,05 % et chargé en batch sur la colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. **(2)** fraction non retenue (flow-through) après chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. **(3)** lavage en tampon 2 sans NaCl (Tris-HCl pH = 8, FC14 0,05 %) (10 mL). **(4)** lavage en tampon 3 (Tris-HCl pH = 8, FC14 0,025 %, NaCl 150 mM) (10 mL). **(5)** Elution de CusA avec 2,5 mM desthiobiotine en tampon Tris-HCl pH = 8, FC14 0,025 %, NaCl 100 mM. La protéine apparaît pure après cette étape.

La filtration sur gel révèle encore une fois un pic symétrique (Fig. 146), centré sur un volume d'éluion identique à celui déterminé lors des purifications précédentes en DDM, ou fos-choline 12.

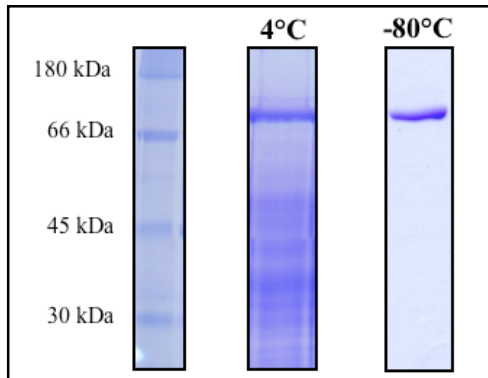


**Figure 146 :** Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel (colonne Superdex-200 – 25 mL) de la protéine CusA après purification en fos-choline 14 0.025% sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> ( $V_{\text{élution}} = 9,3$  mL).



La vérification du comportement de CusA sur gradient de sucrose montre à nouveau une protéine équilibrée dans seulement 3 fractions, dans le haut du gradient, selon un profil identique à celui présenté sur le gel SDS-PAGE en figure 143.

La stabilité de la protéine a été suivie par électrophorèse SDS-PAGE. CusA, purifiée en fos-choline 14, se dégrade rapidement à 4°C. Le gel en figure 147 montre une étendue de bandes révélant la dégradation de la protéine par protéolyse, après 24 heures à 4°C. La protéine reste stable si elle est immédiatement congelée à -80°C après purification.



**Figure 147** : Gels SDS-PAGE (12 %) représentant la protéine CusA purifiée en fos-choline 14, après incubation à 4°C pendant 24 heures, et après congélation à -80°C.

Le rendement en protéine est similaire à celui annoncé lors de la purification en DDM, soit environ 800 µg par litre de culture.

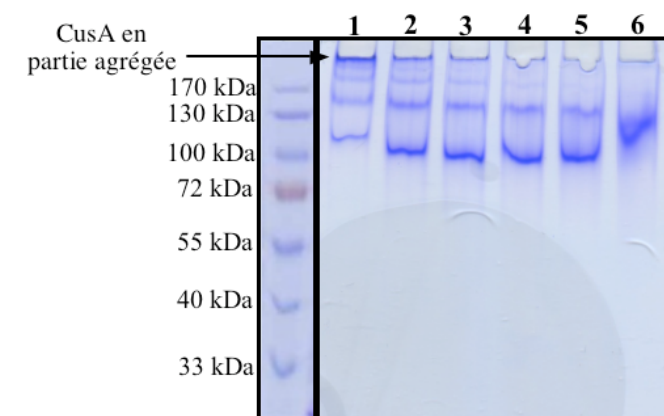
#### 1.2.4 Purification en DDM/SDS

Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est une molécule amphipatique anionique largement employée en biochimie des protéines pour ses propriétés dissociantes et solubilisantes (Dong, M. *et al.* 1997 ; Dong, M. *et al.* 1996). La présence de SDS menant invariablement à la perte de l'activité biologique des protéines, il est souvent admis, à tort, que le SDS provoque forcément la dénaturation complète des protéines, croyance confirmée par l'utilisation quotidienne des protocoles d'électrophorèse SDS-PAGE. Cependant, à des concentrations inférieures à la cmc (1-10 mM, soit 0,025-0,25 %, selon la force ionique du milieu), le SDS peut être utilisé comme n'importe quel autre détergent et est capable d'induire et de stabiliser des conformations peptidiques ordonnées telles que les hélices  $\alpha$  ou feuilletts  $\beta$  (Khong, L. et Johnson, W. C. 1992 ; Montserret, R. *et al.* 2000). Les interactions protéine-SDS ont été étudiées de façon approfondie, récemment (Xiang, J. *et al.* 2006). Il peut également empêcher l'agrégation de protéines ainsi que l'association non spécifique d'autres

molécules lors de purifications par chromatographie d'affinité. Par ailleurs, la réactivation de quelques protéines solubilisées en SDS a été décrite dans la littérature (Hjertén, S. *et al.* 1988). En fait, l'étape essentielle à la réactivation est l'élimination du SDS, qui peut être effectuée par échange, par chromatographie, avec un détergent doux tel que le DDM (Dong, M. *et al.* 1997).

A partir de ces connaissances relatives au SDS, nous avons également essayé de purifier la protéine CusA, à l'aide d'un mélange de détergents, DDM et SDS. Le DDM étant un détergent doux et le rendement en protéine étant bien plus élevé en DDM par rapport aux autres détergents, nous avons choisi d'ajouter, outre le DDM, une quantité minimale de SDS permettant l'optimisation de la purification et l'obtention d'une préparation protéique la plus homogène possible. Dans ce cas, une concentration de 0,02 % SDS, évitant l'agrégation partielle de la protéine (Fig. 148 piste 1), tout en visualisant une bande singulière à la masse attendue, a été déterminée (Fig. 148 pistes 2 et 3).

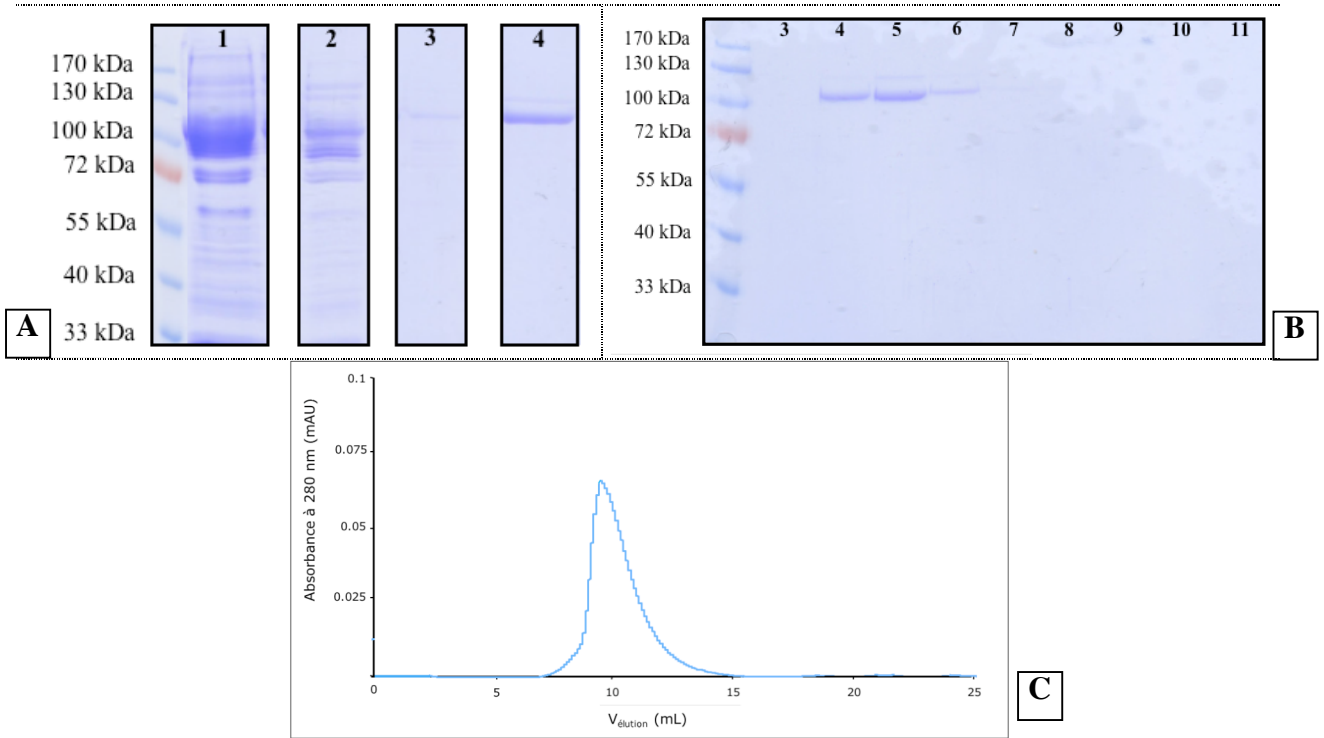
Le rendement en protéine est similaire à ceux obtenus par les purification précédentes, soit environ 800 µg par litre de culture.



**Figure 148 :** Gel natif (8%) représentant la solubilisation de la protéine CusA purifiée en DDM 0,05%, par différentes quantités de SDS. (1) 0 % SDS. (2) 0,01 % SDS. (3) 0,02 % SDS. (4) 0,03 % SDS. (5) 0,075 % SDS. (6) 0,2 % SDS.

Les diverses étapes du protocole de purification ont alors été suivies en solubilisant d'abord, en tampon Tris 100 mM, NaCl 500 mM, DDM 1 % (Fig. 149A piste 1), l'extrait membranaire, qui est ensuite chargé sur la colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> préalablement équilibrée en tampon Tris 100 mM, NaCl 500 mM, DDM 0,2 %, SDS 0,02 %. La protéine reste bien accrochée à la résine, la partie non retenue (flow-through) ne contenant pas la protéine (Fig. 149A piste 2). CusA est alors obtenue pure après élution par 2,5 mM desthiobiotine en tampon Tris 100 mM, NaCl 500 mM, DDM 0,05 %, SDS 0,02 % (Fig. 149A piste 4). L'homogénéité de la préparation protéique est vérifiée par équilibration sur un gradient de sucrose contenant 0,05 % de DDM et 0,02 % de SDS. CusA apparaît dans

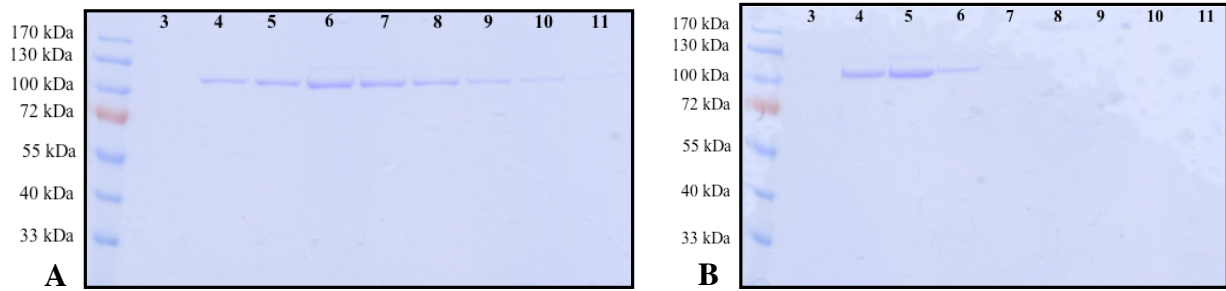
une région restreinte du gradient, principalement dans les fractions 4, 5 et 6 (Fig. 149B). La filtration sur gel révèle un chromatogramme identique à celui observé en présence de DDM et représentant un pic principal centré sur un volume d'éluion de 9,3 mL (Fig. 149C).



**Figure 149** : Purification de CusA en DDM 0,05% et SDS 0,02%. **(A)** chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. **1-** Extrait membranaire solubilisé en DDM 1%. **2-** Fraction non retenue (flow-through). **3-** Lavage en tampon Tris 100 mM pH = 8, NaCl 100 mM, DDM 0,2 %, SDS 0,02 %. **4-** Elution par 2,5 mM desthiobiotine en tampon Tris 100 mM pH = 8, NaCl 100 mM, DDM 0,05 %, SDS 0,02 %. **(B)** Gel SDS-PAGE (12 %) représentant le contenu des fractions de 800  $\mu$ L collectées depuis le haut d'un gradient de sucrose contenant DDM 0,05 % et SDS 0,02 %. CusA est présente dans une région étroite du gradient, en particulier dans les fractions 4, 5, et 6. **(C)** Chromatogramme ( $A_{280} = f(V_{\text{élution}})$ ) de filtration sur gel (colonne Superdex-200 – 25 mL) de la protéine CusA après purification en DDM 0,05 % et SDS 0,02 % sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> ( $V_{\text{élution}} = 9,3$  mL).

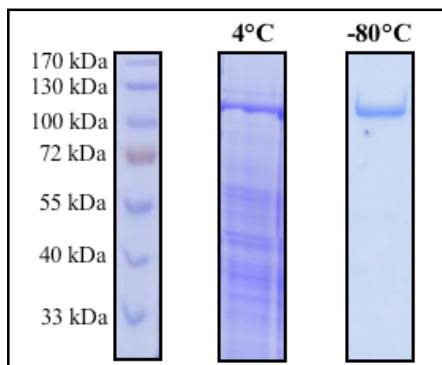
Il est également intéressant de remarquer qu'une préparation protéique obtenue après purification en DDM 0,05 % s'équilibre aussi dans une zone restreinte au sein d'un gradient de sucrose contenant DDM 0,05 % et SDS 0,02 % (Fig. 150B). La seule présence de 0,02 % de SDS permet de retrouver une population de CusA moins polydisperse.





**Figure 150** : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant le comportement d'un même échantillon protéique issu d'une purification sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> en DDM 0,05 % et déposé sur gradient de sucrose contenant (A) simplement du DDM 0,05 %, ou (B) du DDM 0,05 % et du SDS 0,02 %.

Comme lors des purifications précédentes, en DDM et fos-choline, la stabilité de la protéine purifiée en DDM/SDS a été suivie par électrophorèse SDS-PAGE. De la même façon qu'en fos-choline, la protéine se dégrade rapidement, dès 24 heures, incubée à 4°C : une multitude de bandes est visible sur le gel en figure 151. La protéine reste stable si elle est immédiatement congelée à -80°C après purification.

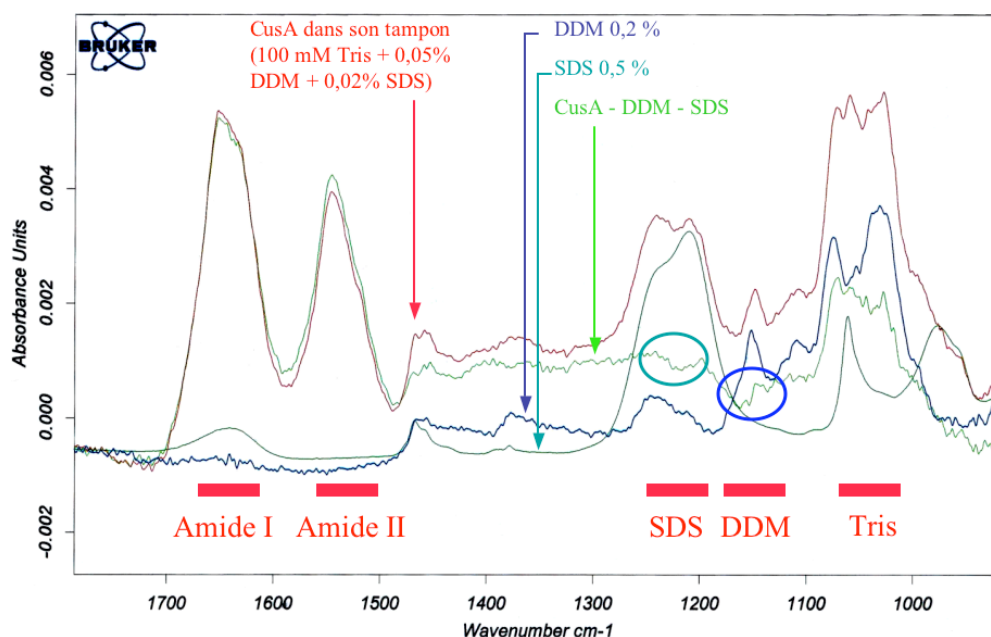


**Figure 151** : Gels SDS-PAGE (12 %) représentant la protéine CusA purifiée en DDM/SDS après incubation à 4°C pendant 24 heures, et après congélation à -80°C.

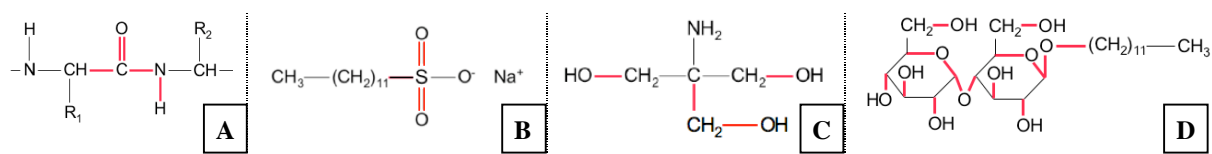
### 1.3 Dosage de détergents et de lipides par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

#### 1.3.1 Dosage de détergents

Comme décrit dans la partie « Matériel et Méthodes », les premières expériences, visant à déterminer la quantité de détergent associé aux différentes préparations de la protéine CusA, ont été effectuées dans le laboratoire d'ingénierie des systèmes macromoléculaires, à Marseille, où j'ai été accueillie et formée par James Sturgis. L'analyse par IRTF consiste d'abord à repérer les bandes d'absorbance caractéristiques des différents composants du mélange : protéine, tampon, détergent(s), lipides. Prenons l'échantillon protéique obtenu après purification par les deux détergents DDM 0,05 % et SDS 0,02 % en tampon Tris-HCl pH = 8.



**Figure 152** : Spectres infrarouge enregistrés par IRTF. Les bandes caractéristiques de chaque espèce observées lors de l'établissement des gammes étalon sont indiquées en rouge en bas des spectres. Le spectre rouge représente la protéine CusA dans son tampon. Le spectre bleu correspond à celui du DDM à une concentration de 0,2 %. Le spectre bleu-vert définit la signature spectrale du SDS à une concentration de 0,5 %. Enfin, le spectre vert représente le résultat de la soustraction du spectre de la protéine par ceux du DDM et du SDS avec un coefficient permettant l'annulation de la contribution en chaque détergent dans les régions étudiées : les cercles bleu et vert montrent respectivement la non contribution du DDM et du SDS au spectre de la protéine.



**Figure 153** : Mise en évidence (en rouge) des liaisons donnant un signal d'absorbance infrarouge au sein des molécules présentes dans la préparation protéique. (A) liaisons amide I et amide II de la liaison peptidique. (B) liaisons S=O existant au sein de la molécule de SDS. (C) liaisons C-O dans la molécule de Tris. (D) liaisons C-O dans la molécule de DDM.

Nous avons tout d'abord étudié l'évolution des spectres enregistrés pour différentes concentrations de Tris. La bande choisie, caractéristique du tampon, correspond à l'absorbance due aux liaisons C-O de la molécule (Fig. 153C) et se situe entre 1080 et 1010  $\text{cm}^{-1}$ . En fonction de l'intensité de cette bande, nous avons pu tracer une droite étalon représentant l'absorbance  $A_{\text{Tris}} = f([\text{Tris}])$ . La même démarche a été suivie afin d'obtenir la gamme étalon représentant  $A_{\text{DDM}} = f([\text{DDM}])$ . Dans ce cas, la zone du spectre caractéristique des liaisons C-O de la molécule de DDM (Fig. 28D) est comprise entre 1190 et 1120  $\text{cm}^{-1}$ . Enfin, l'enregistrement de spectres correspondant à différentes concentrations de SDS, dans le tampon d'étude (Tris 100 mM), nous a permis de tracer la gamme étalon  $A_{\text{SDS}} = f([\text{SDS}])$ , à

partir de la bande d'absorbance entre 1250 et 1200  $\text{cm}^{-1}$  (bande représentant l'absorbance due aux liaisons C-O mise en évidence sur la figure 153B).

La quantité de détergent est ensuite déterminée par soustraction du spectre de la préparation protéique par le spectre du détergent à une concentration connue. Par exemple, le spectre du DDM enregistré à la concentration de 0,2 % a été soustrait à celui de la protéine CusA de façon à ne plus observer de contribution du détergent dans la zone choisie (1190-1120  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 152 – cercle [bleu](#)). On obtient alors :

spectre de CusA -  $\alpha_{\text{DDM}}$  DDM 0,2 % = aucune contribution du DDM.

La quantité de DDM présente dans le mélange est alors égale à :  $\alpha_{\text{DDM}}$  0,2 %, soit, avec un coefficient  $\alpha_{\text{DDM}}$  égal à 1,5 dans notre cas, 0,3 % de DDM. Ceci représente 0,4 g de DDM par gramme de protéine CusA considérée trimérique, soit 1,2 % de DDM par monomère.

La même démarche a été suivie pour estimer la quantité de SDS dans la préparation protéique. Le spectre du SDS enregistré à la concentration de 0,5 % a été soustrait à celui représentant la préparation protéique jusqu'à ne plus observer de contribution du détergent (bande située entre 1250 et 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 152 – cercle [vert](#)). Le coefficient de soustraction  $\alpha_{\text{SDS}}$  est dans ce cas égal à 0,4, ce qui nous permet de conclure sur la présence de 0,2 % de SDS dans la préparation protéique de CusA. Ceci représente 0,27 g de SDS par gramme de protéine trimérique, soit 0,81 % de SDS par monomère.

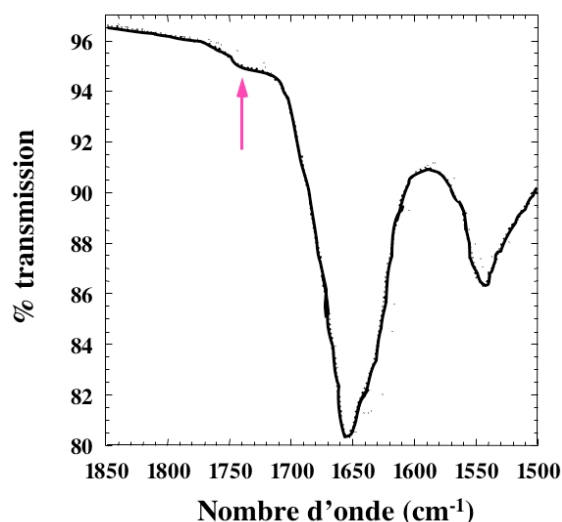
J'ai ensuite reproduit cette étude, à Grenoble, et confirmé les résultats obtenus. Les échantillons préparés en DDM seul ont à leur tour été analysés. Une quantité similaire de détergent, a été mise en évidence, en comparaison du cas précédent, soit environ 1,2 g de DDM par gramme de monomère de CusA. Ce résultat est du même ordre que celui obtenu par ultracentrifugation analytique. Le dosage du DDM par la méthode classique utilisée pour titrer les sucres (Saha, S. K. et Brewer, C. F. 1994 ; voir le chapitre « Matériel et Méthodes » – paragraphe 4.3) fournit la concentration en DDM totale, dans la préparation protéique. Les essais effectués afin de déterminer la quantité de DDM lié à la protéine par rapport à la quantité de DDM libre n'ont donné aucun résultat fiable. En se basant sur les résultats obtenus par IRTF ou UCA, la masse totale du complexe protéine-détergent avoisine alors les 500 kDa, valeur plutôt éloignée de celle prédite par filtration sur gel (600 kDa). Ceci confirme que cette dernière technique est peu adaptée à la détermination de la masse moléculaire d'un complexe protéique.

Les analyses des préparations en fos-choline 14 n'ont donné aucun résultat fiable. Le difficile repérage d'une bande d'absorption caractéristique et la très faible concentration du détergent dans la préparation protéique en sont probablement la cause.

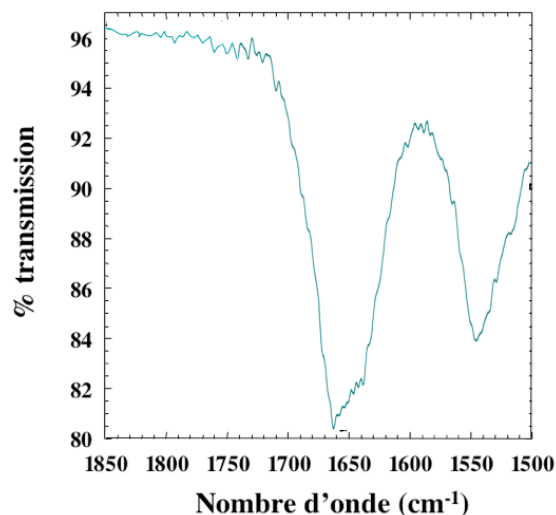
### 1.3.2 Estimation de la quantité de lipides

La présence et la quantité de lipides au sein d'une préparation protéique peuvent également être analysées par IRTF. La région caractéristique que l'on observe dans ce cas est située autour de  $1740\text{ cm}^{-1}$ , juste en amont de la bande amide I de la protéine, et correspond à l'absorbance des liaisons C=O des groupements carboxylates des fonctions esters des molécules de lipides.

La protéine purifiée en DDM 0.05% possède un spectre IR révélant une légère bande caractéristique de la liaison C=O des molécules de lipides et située à un nombre d'onde de  $1740\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 154). Le rapport des surfaces de la bande représentant la liaison C=O de la fonction amide de la protéine (centrée à  $1755\text{ cm}^{-1}$ ) et de celle définissant la liaison C=O de la fonction ester des lipides (centrée sur  $1740\text{ cm}^{-1}$ ) permet d'estimer le nombre de molécules de lipides par molécule de protéine (daCosta, C. J. et Baenziger, J. E. 2003). Dans notre cas, nous pouvons évaluer un nombre d'environ 5 à 10 molécules de lipides par molécule de CusA-DDM.



**Figure 154** : Agrandissement du spectre de la protéine CusA purifiée en DDM 0,05 %, enregistré en IRTF. La flèche indique la légère bande d'absorbance de la fonction ester caractéristique de la présence de lipides dans la préparation protéique de CusA.



**Figure 155** : Agrandissement du spectre de la protéine CusA purifiée en DDM 0,05 % et SDS 0,02 %, enregistré en IRTF. Aucune bande d'absorbance n'est visible à  $1740\text{ cm}^{-1}$ .

Le spectre enregistré à partir de la protéine purifiée en DDM 0,05 % et SDS 0,02 % ne montre, quant à lui, aucune bande d'absorbance centrée sur  $1740\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 155), ce qui suggère un nombre maximal de deux molécules de lipides autour de la protéine et donc l'élimination de la quasi totalité, voire de la totalité des molécules de lipides par l'emploi de SDS lors de la purification.

De la même façon, l'analyse IR du spectre de CusA purifiée en fos-choline 14 ne révèle aucune bande d'absorbance caractéristique de la présence de lipides autour de la protéine.

## **1.4 Etude de l'homogénéité des différentes préparations de CusA**

L'étude de l'homogénéité de la protéine après purification s'est appuyée sur différentes méthodes. Tout d'abord, nous avons tenté d'estimer ce paramètre par filtration sur gel et diffusion de lumière, ce qui n'a pu nous apporter aucun résultat, laissant présager de l'hétérogénéité des préparations. Nous nous sommes alors fondés sur l'équilibration dans un gradient de sucrose. une forte hétérogénéité. Les premières optimisations de la purification et recherches du détergent adéquat se sont fondées sur les résultats obtenus par cette méthode. L'étude a ensuite été poursuivie par microscopie électronique et affinée par ultracentrifugation analytique.

### **1.4.1 Les gradients de sucrose**

Environ 500  $\mu\text{g}$  de protéine dans 500  $\mu\text{L}$  sont déposés sur gradient de sucrose.

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine CusA est présente tout au long d'un gradient préparé en DDM 0,05 %. Elle paraît donc se trouver sous différents états oligomériques, de différents poids moléculaires, présents de la fraction 4 jusqu'au fond du tube, là où le gradient est le plus dense. Il suffit de déposer la protéine purifiée en DDM 0,05 % sur un gradient préparé en DDM 0,05 % et SDS 0,02 % pour observer l'équilibration de la protéine dans une portion restreinte du gradient. L'effet de la présence de SDS paraît éviter la formation d'agrégats et favoriser un nombre réduit d'états oligomériques, voire la prédominance d'une forme oligomérique particulière. La protéine n'est dans ce cas présente que dans les fractions 4, 5 et 6 (fractions de 800  $\mu\text{L}$ ) (Fig. 150B). La protéine étant

focalisée à un seul endroit, correspondant à la détection des premières populations protéiques sur gradient en présence de DDM, il est raisonnable de penser que l'espèce présente serait la plus légère imaginée, soit le monomère.

Lors de la purification de CusA en fos-choline 12 0,08 %, la protéine est présente dans la deuxième moitié la plus dense du gradient, ce qui laisse penser à la coexistence de plusieurs états oligomériques et d'agrégats.

Le gradient obtenu en fos-choline 14 0,025 % révèle la concentration de CusA dans une région restreinte du gradient (fractions 3 et 4 principalement) (Fig. 143). Cette masse représenterait là encore la forme monomérique de la protéine. La détection de CusA dans ces fractions du haut du gradient indique donc la présence de la plus petite structure tertiaire de la protéine, en comparaison des états oligomériques présents dans les préparations en DDM.

#### 1.4.2 La microscopie électronique

Un autre outil a été utilisé pour analyser l'homogénéité de la préparation de protéine CusA après purification : la microscopie électronique. Afin de contrôler au mieux l'influence de divers paramètres, tout un éventail d'échantillons, tous préparés de façon différente, a été examiné. Les facteurs pouvant influencer, directement ou non, sur l'homogénéité et la qualité de la préparation protéique, et qui ont été explorés sont :

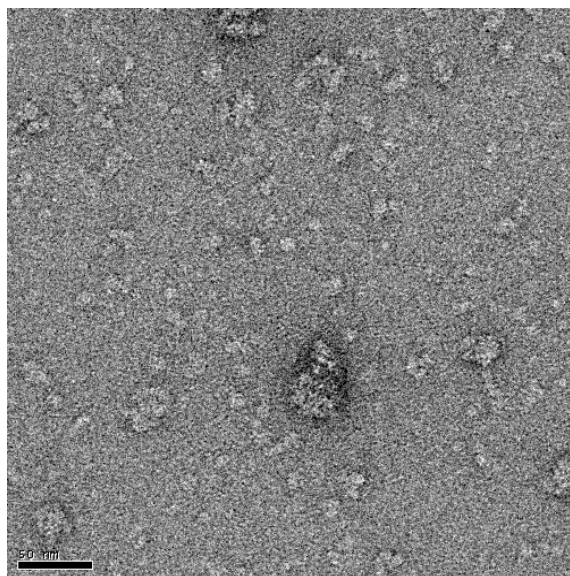
- le mode opératoire menant à l'obtention des extraits membranaires (par sonication ou presse de French)
- la nature du détergent (DDM 0,05 % ou fos-choline 14 0,025 %)
- le nombre d'étapes lors de la purification (en particulier le passage ou non par une filtration sur gel après chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>)
- la congélation à -80°C immédiatement après purification. Certains échantillons ont été congelés tout de suite après purification, d'autres ont été laissés 4 jours à 4°C avant d'être congelés à -80°C. Un dernier échantillon a été observé 4 jours après purification (incubation 4 jours à 4°C sans congélation).
- la personne purifiant la protéine (Kerstin Helbig (K) ou moi-même (V)).



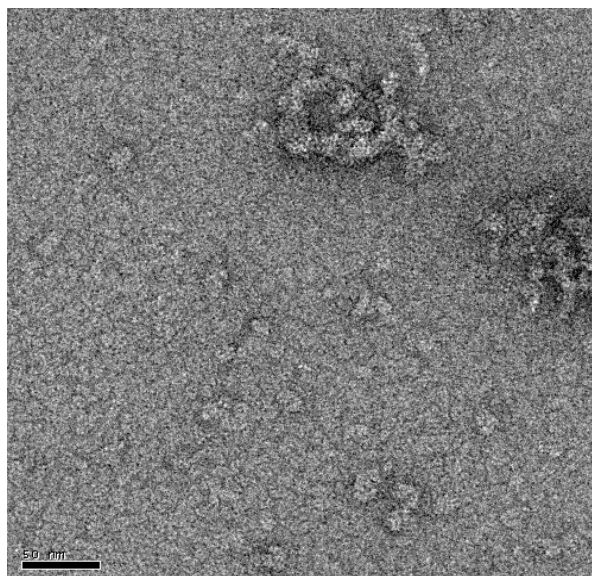
	Détergent	Préparation de l'extrait membranaire		Filtration sur gel	Congélation à -80°C immédiatement après purification	Opérateur
		Sonication	Presse de French			
1	DDM 0.05%	+	-	+	+	V
2	DDM 0.05%	-	+	+	-	V
3	DDM 0.05%	-	+	-	-	K
4	FC14 0.025%	+	-	+	+	V
5	FC14 0.025%	-	+	-	-	K

**Tableau 21** : Caractéristiques des différentes préparations de CusA observées par microscopie électronique (échantillons préparés par coloration négative)

Les échantillons de protéine CusA solubilisées en DDM ou fos-choline 14 et obtenus selon les diverses méthodes présentées dans le tableau 21 ont été observés par microscopie électronique, après avoir été préparés par coloration négative. Cette étude a été réalisée à l'Institut Curie à Paris, où j'ai été accueillie par Jean-Louis Rigaud.



**Figure 156** : CusA purifiée en DDM 0,05 % vue par microscopie électronique. La barre d'échelle noire en bas à gauche de la photo représente 50 nm.



**Figure 157** : CusA purifiée en fos-choline 14 0,025 % vue par microscopie électronique. La barre d'échelle noire en bas à gauche de la photo représente 50 nm.

Dans tous les cas, plusieurs populations protéiques sont visibles (Fig. 156 et 157) : les objets observés sont tous de tailles différentes. Des agrégats sont même présents, agrégats plus nombreux au sein des préparations protéiques en fos-choline 14, contrairement au comportement de la protéine observé en gradient de sucrose. En conséquence, on peut penser qu'il existe un biais dans l'utilisation d'une des deux méthodes. Peut-être existe-t-il une

réaction non maîtrisée entre la grille de carbone et l'échantillon, lors de la préparation de ce dernier par coloration négative, menant à l'agrégation de la protéine, à des endroits localisés et aléatoires... Outre ce phénomène, l'analyse en particule isolée, par microscopie électronique, montre que l'ensemble des préparations protéiques, quelle que soit la méthode utilisée, présentent une inhomogénéité importante. Enfin, afin de contrôler l'influence de la congélation, un échantillon de CusA a été observé 4 jours après purification, sans avoir été congelé. L'état d'agrégation est similaire à celui caractérisant les échantillons congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 1.4.3 L'ultracentrifugation analytique (UCA)

L'ultracentrifugation analytique, en condition d'analyse de vitesse de sédimentation, constitue une méthode de choix pour analyser l'homogénéité d'une préparation protéique et identifier la taille de ses constituants et leurs proportions. D'autre part, comme vu dans le chapitre « Matériel et Méthodes », il est possible d'enregistrer des données en absorbance et en interférence. L'absorbance à 280 nm reflète les variations de concentration de la protéine, le signal d'interférence celles de l'ensemble des molécules en présence.

Les études ont été effectuées sur des échantillons concentrés à environ 0,3 mg/mL.

Les préparations de CusA en DDM 0,05 % et en fos-choline 14 0,025 % ont été analysées, dans différentes conditions, par ultracentrifugation analytique afin de connaître la distribution des coefficients de sédimentation  $c(s)$  des différentes particules. Nous avons également pu estimer la quantité de détergent associé à chaque complexe membranaire.

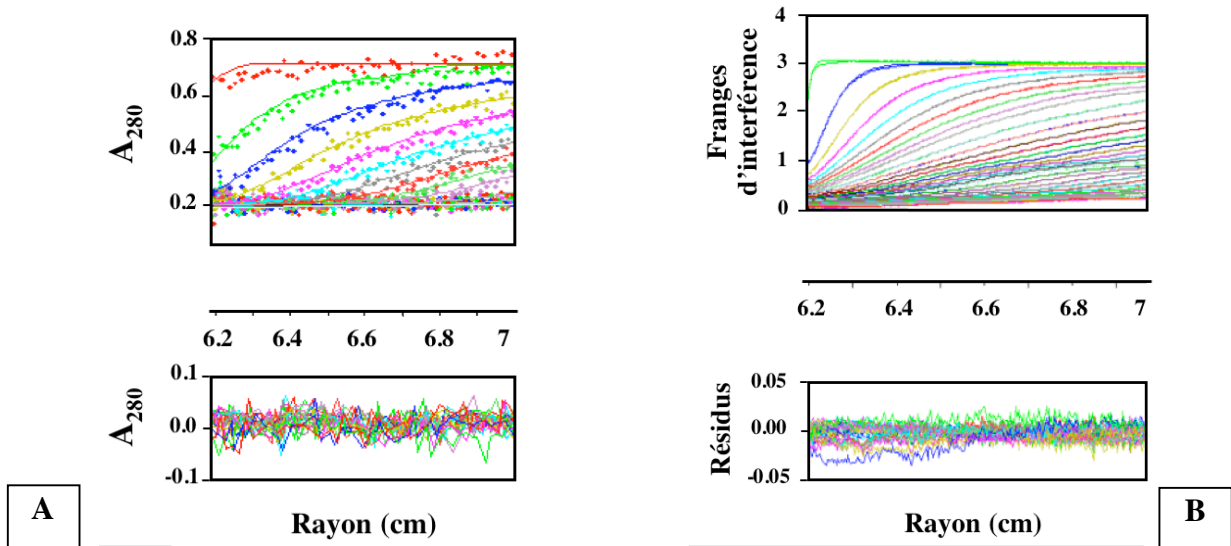
Les protéines membranaires solubilisées en détergent peuvent se présenter sous des formes complexes composées de protéine, de détergent et de lipides. Si l'on suppose la structure globulaire de la protéine et que l'on prend en compte la quantité de détergent au sein du complexe protéine-détergent, les masses moléculaires de chaque complexe présent peuvent être calculées à partir des coefficients de sédimentation. D'autre part, le rapport du signal d'interférence sur le signal d'absorbance caractérise les espèces associées à la protéine dans le complexe membranaire. En effet, le nombre de franges d'interférence  $J$  dépend de l'incrément d'indice de réfraction lors de la mise en solution d'un composé :

$J = (dn/dc)c\lambda/K$  (voir le chapitre « Matériel et Méthodes »).

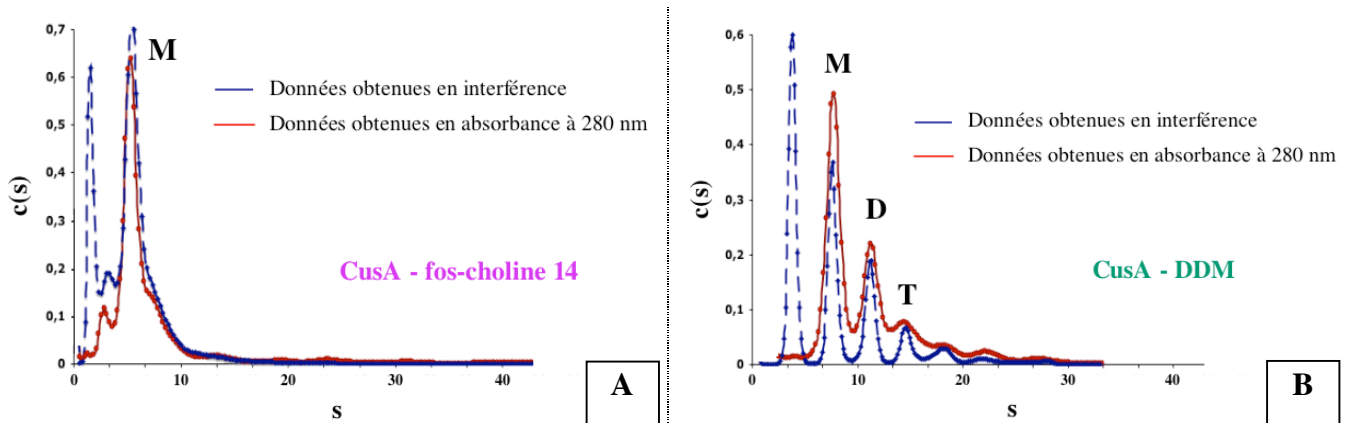
En d'autres termes,  $J$  « voit » l'ensemble des espèces alors que  $A_{280}$  ne 'voit' que la protéine. Le rapport  $J/A_{280}$  pour une protéine seule est de 2,76. Dans notre cas, un excès par rapport à



cette valeur est observé. Cet excès peut être relié à la quantité de détergent et de lipides liés à CusA, exprimée en gramme par gramme de protéine. La soustraction de la concentration en protéine aux données obtenues en interférence fournit la quantité de détergent lié à chaque complexe (Cohen, E. *et al.* 2005) (Fig. 158) (voir le chapitre « Matériel et Méthodes »).



**Figure 158** : profils des vitesses de sédimentation des préparations de CusA en DDM ou fos-choline 14. Les données ont été enregistrées (A) en absorbance à 280 nm, et (B) en interférence. Les résidus représentent la superposition des différences entre les données expérimentales et les données ajustées.



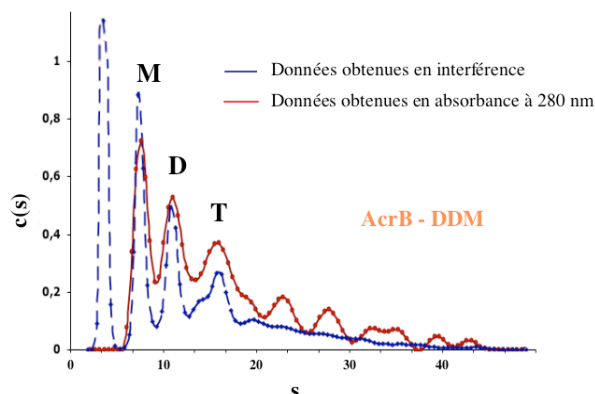
**Figure 159** : Analyse de la distribution des coefficients de sédimentation apparents  $c(s)$  pour (A) CusA 5,6  $\mu\text{M}$  en présence de fos-choline 14 0,025 % à 4°C et (B) CusA 5,6  $\mu\text{M}$  en présence de DDM 0,05 % à 6°C. Le premier pic visible en interférence (en pointillés bleux) correspond aux micelles de détergent libres. M représente le pic relatif au monomère, D au dimère, et T au trimère.

L'analyse de la protéine purifiée en fos-choline 14 0,025 % révèle la présence d'une seule espèce, caractérisée par un coefficient de sédimentation  $s = 5,5$  S (Fig. 159A). Cette espèce correspond à la protéine associée à  $1,8 \pm 0,6$  g de détergent par gramme de protéine (Fig. 158). Ceci représente une masse moléculaire compatible avec la forme monomérique de CusA, résultat en accord avec celui déduit du comportement de la protéine en gradient de sucrose.

Le profil de sédimentation s'avère beaucoup plus complexe pour CusA en DDM 0,05 %. L'examen du comportement de CusA en DDM 0,05 % montre que la protéine se trouve sous trois formes majoritaires, caractérisées par des coefficients  $s = 8$  S (pour l'espèce la plus légère),  $s = 11$  S, et  $s = 16$  S (pour l'espèce la plus lourde) (Fig. 159B). D'autres espèces, caractérisées par des coefficients de sédimentation compris entre 19 S et 47 S sont également présentes. Ces valeurs ont été obtenues à la suite de 20 expériences d'ultracentrifugation analytique, ce qui permet d'asseoir la reproductibilité des expériences et la fiabilité des résultats obtenus. Ces trois espèces majoritaires sont caractérisées par coefficients de sédimentation correspondant à des masses moléculaires compatibles avec les formes monomériques, dimériques, et trimériques de CusA, respectivement. La quantité de détergent estimée individuellement pour chaque espèce est similaire au sein de ces trois espèces majoritaires, soit  $1,5 \text{ g} \pm 0,6 \text{ g}$  de détergent associé par gramme de protéine.

Les analyses par ultracentrifugation analytique nous ont également permis de comparer l'évolution des coefficients de sédimentation  $c(s)$  pour la protéine CusA purifiée en DDM et en fos-choline 14, en fonction du temps. Les profils des coefficients  $c(s)$  relatifs à la protéine CusA en DDM restent inchangés après 4 jours, ce qui confirme la stabilité de la protéine en DDM, incubée pendant 4 jours à 4°C (voir analyse par électrophorèse SDS-PAGE - Fig. 136). Au contraire, une multiplicité de pics apparaît sur les analyses  $c(s)$  enregistrées pour la protéine en fos-choline 14, après 24 heures à 4°C. Ceci met en évidence la dégradation rapide de la protéine dans ce détergent, et rejoint l'observation faite par électrophorèse SDS-PAGE (Fig. 147).

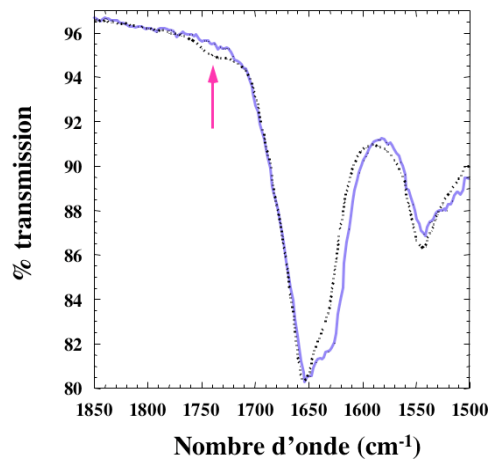
Le comportement de CusA en solution, dans différentes conditions, a été approfondi et comparé à celui de AcrB, tel que présenté dans l'article Stroebel, D. *et al.* 2007. AcrB est le seul transporteur RND dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X jusqu'à aujourd'hui. Le travail réalisé a révélé le comportement suivant (Fig. 160).



**Figure 160** : Analyse des coefficients de sédimentation apparents  $c(s)$  pour AcrB 4,9  $\mu\text{M}$  en présence de DDM 0,02 % à 6°C.

L'analyse par UCA des préparations de CusA et AcrB en DDM révèle trois espèces majoritaires caractérisées par des valeurs  $s_{20,w}$  de 8 S, 11 S et 16 S respectivement, outre plusieurs espèces plus lourdes (Fig. 159B et 160). Les valeurs  $s_{20,w}$  de ces dernières espèces n'ont pu être évaluées précisément. La quantité de détergent associé à la protéine est similaire au sein des trois espèces principales citées, soit  $1,5 \text{ g} \pm 0,6 \text{ g}$  de DDM par gramme de protéine CusA et  $1,2 \text{ g} \pm 0,4 \text{ g}$  de DDM par gramme de protéine AcrB.

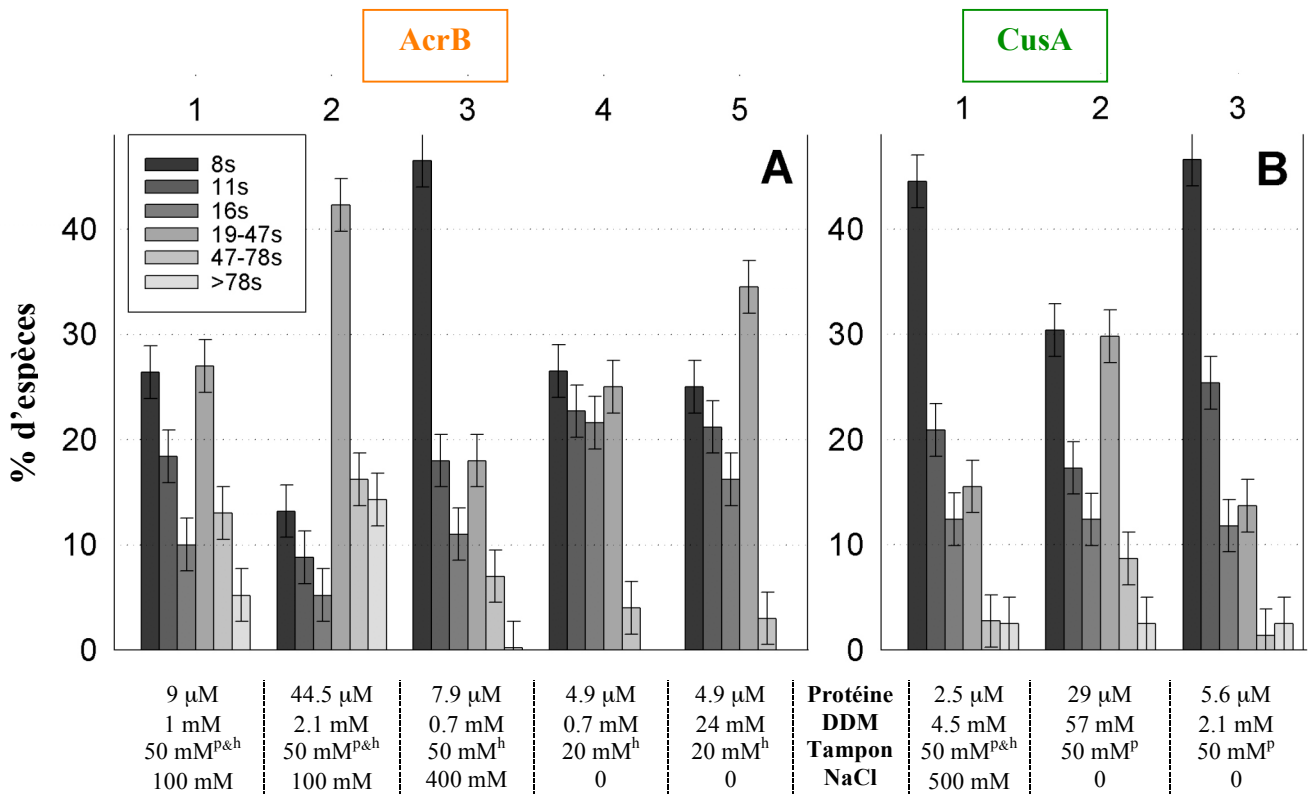
La présence et la quantité de lipides dans chacune des préparations protéiques ont été étudiées par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF) (voir paragraphe 1.4). L'analyse des spectres IR de la protéine CusA, en particulier de la région aux alentours de  $1740 \text{ cm}^{-1}$ , permet de déduire la présence de 5 à 10 molécules de lipides par molécule de protéine (da Costa, C. J. et Baenziger, J. E. 2003) (Fig. 161). Dans le cas de AcrB, aucune bande d'absorbance n'est visible à  $1740 \text{ cm}^{-1}$ , suggérant la présence de moins de 2 molécules de lipides par protéine (Fig. 161).



**Figure 161** : Agrandissement des spectres enregistrés en IRTF des protéines CusA (en pointillés) et AcrB (en violet) purifiées en DDM. La flèche indique la légère bande d'absorbance de la fonction ester caractéristique de la présence de lipides dans la préparation protéique de CusA.

A partir des quantités de détergent et de lipides déterminées, au sein des complexes protéiques, les valeurs théoriques  $s_{20,w}$  ont été calculées pour chaque complexe CusA-DDM monomérique, dimérique, et trimérique, considérés comme des particules sphériques protéine-détergent-lipides. Les valeurs obtenues sont, respectivement :  $9,2 \pm 1$  S,  $14,6 \pm 1,5$  S et  $19,7 \pm 2$  S. Ces valeurs sont très proches de celles obtenues expérimentalement et confirment par conséquent que les trois espèces majoritaires observées correspondent au monomère, au dimère et au trimère. Le même type de calcul a été réalisé dans le cas de AcrB. Les résultats fournissent des valeurs similaires :  $9 \pm 1$  S,  $14,3 \pm 1,5$  S, et  $18,8 \pm 2$  S pour chacune des espèces mises en évidence. Ceci confirme la présence des trois états oligomériques principaux et l'inhomogénéité des préparations de CusA mais aussi de la protéine AcrB.

Les signaux supplémentaires de masse moléculaires supérieures et définis par des valeurs  $s$  comprises entre 19 S et 47 S n'ont pu être séparés en signaux distincts et décrits précisément mais représenteraient un mélange de divers oligomères plus gros que les formes trimériques.



**Figure 162** : Distribution des états oligomériques de AcrB (A) et CusA (B) déduits des expériences d'ultracentrifugation analytique. Les populations ont été triées comme suit : 8 S, 11 S, et 16 S correspondent à des espèces discrètes représentant respectivement le monomère, le dimère et le trimère pour chacune des deux protéines. Les espèces plus lourdes sont rassemblées en populations définies par des coefficients  $c(s)$  compris entre les valeurs indiquées. Les pourcentages sont calculés à partir du rapport entre l'aire du pic considéré et l'aire totale de la courbe (cf Fig. 18). La concentration en protéine est estimée à partir de l'absorbance à 280 nm. La concentration en DDM libre est calculée suivant la contribution en interférence du pic représentant les micelles de détergent. Concernant les tampons, <sup>p</sup> indique l'utilisation d'un tampon phosphate pH = 7 et <sup>h</sup> l'utilisation d'un tampon hepes pH = 8. Les barres d'erreur représentent l'incertitude dans le choix des limites d'intégration de la courbe  $c(s)$  pour chaque espèce.

Les profils de sédimentation des complexes CusA-DDM et AcrB-DDM ont été comparés entre eux. Ils apparaissent très similaires. Dans chaque préparation protéique, les formes monomériques, dimériques, trimériques, et d'état oligomérique supérieur ont été observées. Cependant, la proportion relative de chaque population varie en fonction des conditions expérimentales (Fig. 162). Les oligomères de hauts poids moléculaires sont les plus abondants au sein des préparations de AcrB, excepté pour de fortes concentrations en sels. Au contraire, la forme monomérique de CusA prédomine à faibles concentrations protéiques et diminue lorsque la concentration en protéine augmente. Pour de hautes concentrations en sels, AcrB et CusA sont majoritairement présentes sous leur forme monomérique (Fig. 158A condition 3 ; Fig. 158B condition 1). La distribution des espèces AcrB-DDM est faiblement influencée par la concentration en détergent (Fig. 162A conditions 4 et 5). Aucune différence dans les profils des coefficients  $c(s)$  n'est visible dans la gamme de pH 6-8 ou après incubation pendant 72 heures à 4°C.

Une augmentation de la concentration en protéine résulte en une prédominance des espèces définies par  $s$  compris entre 19 S et 47 S, pour les deux protéines. L'effet est particulièrement net dans le cas de AcrB. Il est à noter que les paramètres représentés par la condition 4 sont très proches de ceux menant à la cristallisation de AcrB.

## **1.5 Approche structurale**

### **1.5.1 Essais de cristallogenèse**

La cristallogenèse d'une protéine nécessite inévitablement de passer par une étape de concentration de la protéine d'intérêt. La concentration d'une protéine membranaire constitue généralement une étape délicate du fait de la difficulté de concentrer la protéine sans concentrer également le détergent, de façon non contrôlée. L'agrégation de la protéine sur la membrane de concentration est aussi souvent observée. Afin d'éviter au mieux ces phénomènes, l'idée est de choisir d'utiliser des membranes de concentration dont la largeur des pores est suffisamment grande pour laisser passer les molécules de détergent tout en retenant la protéine, soit, dans notre cas, des membranes laissant passer les molécules d'une taille correspondant à un poids inférieur à 100 kDa. Néanmoins, nous atteignons une limite en concentration, voisine de 8 mg/mL, difficile à dépasser sans être confronté aux phénomènes décrits précédemment. De nombreux essais de cristallisation de la protéine CusA ont donc été effectués, en utilisant en particulier l'ensemble des kits Hampton présents à l'Institut, à cette concentration. Les différentes conditions de cristallisation testées n'ont jamais permis de mettre en évidence une ou plusieurs pistes à poursuivre pour l'obtention d'objets pouvant évoluer en cristaux de protéine. Les essais de cristallogenèse sont poursuivis actuellement au laboratoire.

### **1.5.2 Essais de reconstitution en cristaux 2D. Analyse par microscopie électronique**

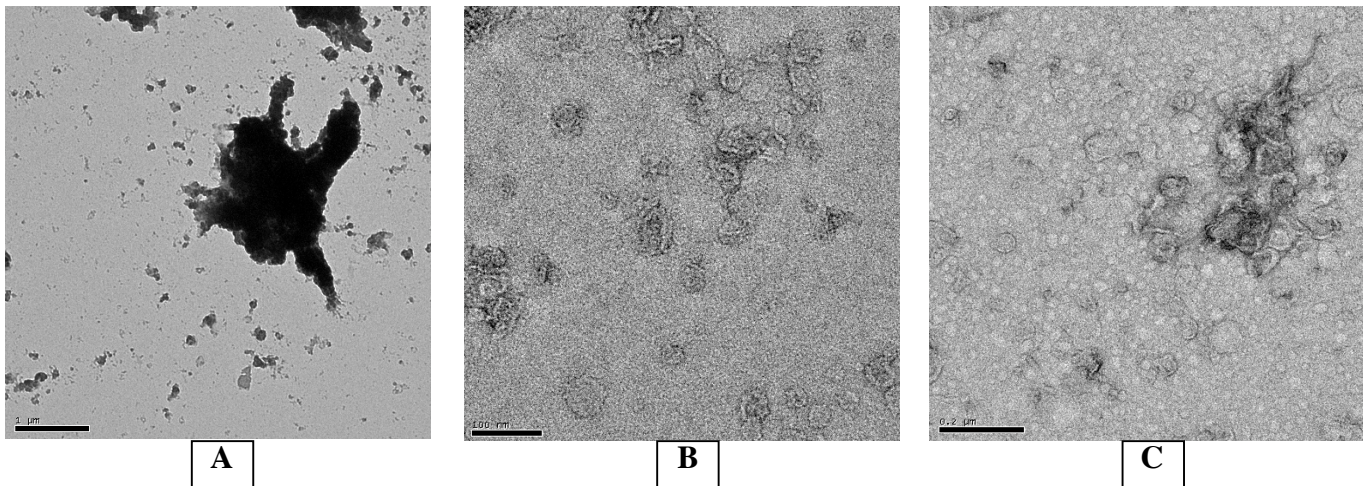
Les essais de cristallisation de la protéine CusA en trois dimensions n'aboutissant pas, nous nous sommes tournés vers une autre méthode afin de forcer l'organisation des molécules de protéine dans un plan et obtenir des cristaux en deux dimensions. La cristallisation 2D peut constituer en effet une stratégie alternative assez performante. La cristallisation 2D est basée sur la méthode générale de reconstitution en protéoliposomes grâce à la diminution progressive de la concentration en détergent (voir le chapitre « Matériel et Méthodes »). La technique de choix dans l'analyse de la cristallisation 2D est la microscopie électronique. La préparation la plus rapide des échantillons se fait par coloration négative. Même si cette méthode ne permet pas de voir des détails de haute résolution, elle assure un excellent contraste lors de l'observation des échantillons par microscopie électronique. Bien que nous ayons remarqué précédemment, comme décrit dans le paragraphe 1.3.3, l'agrégation localisée de la protéine, l'analyse de la reconstitution de la protéine en cristaux 2D reste une stratégie intéressante. L'élimination progressive du détergent a été réalisée suivant deux méthodes distinctes : l'utilisation de Biobeads, ou la dialyse. L'ensemble des échantillons préparés selon les différents protocoles présentés dans le tableau 1 (paragraphe 1.3.2) a été examiné. Dans tous les cas, la première étape a été de déterminer la nature et la quantité de lipides adéquates à la reconstitution en cristaux 2D (rapports massiques lipides/protéine compris entre 0,5 et 1 généralement). Nous avons ensuite étudié l'influence de divers paramètres tels que la température ou la présence de glycérol.

★ Elimination du détergent par Biobeads

◆ Détermination de la nature et de la quantité de lipides permettant la reconstitution en cristaux 2D de la protéine CusA purifiée en DDM ou fos-choline 14

\* Les lipides d'*E. coli*

Nous avons suivi, après ajout de Biobeads, l'évolution de solutions protéiques mises en présence de lipides d'*E. coli* selon 4 rapports massiques lipides/protéine différents : 0,25, 0,5, 1, et 2 (Fig. 163).



**Figure 163** : Essais de reconstitution de la protéine CusA en cristaux 2D à l'aide de lipides d'*E. coli*. – élimination du détergent par Biobeads. **(A)** rapport massique lipides/protéine = 0,25. Des agrégats protéiques sont nettement visibles. **(B)** rapport massique lipides/protéine compris entre 0,5 et 1 - photo prise 1 à 2 heures après l'ajout de lipides. **(C)** rapport massique lipides/protéine compris entre 0,5 et 1 - photo prise 4 heures après l'ajout de lipides. Les barres d'échelle en noir en bas à gauche des photos représentent respectivement 1  $\mu\text{m}$ , 100 nm ou 200 nm.

Dans le premier cas, aucune vésicule ne peut se former du fait du manque de molécules de lipides et la protéine s'aggrège (Fig. 163A). Dans les deux conditions où le rapport massique lipides/protéine est de 0,5 ou 1, plusieurs 'vésicules' de lipides commencent à se former après 1 à 2 heures après l'ajout de Biobeads (Fig. 163B). Cependant, ces 'vésicules' ne constituent pas des structures fermées et ressemblent plutôt à des chapelets de molécules incurvés. Après 4 heures, ces chapelets ne se sont toujours pas refermés pour former de vraies vésicules à l'intérieur desquelles les molécules de protéines pourraient s'organiser, mais deviennent plus nombreuses et se rassemblent pour former des agrégats (Fig. 163C). L'augmentation de la quantité de lipides, selon un rapport lipides/protéines de 2, n'améliore pas la formation des vésicules, étape essentielle à la reconstitution en cristaux 2D. Par conséquent, la formation inachevée des vésicules n'est pas un phénomène dû à une quantité insuffisante de lipides.



\* *Autres lipides*

Les lipides d'*E. coli* ne donnant pas de résultats probants, divers types de molécules lipidiques ont été testées afin de discriminer la nature des lipides permettant la formation de vésicules fermées menant à la cristallisation 2D de CusA. (Tab. 22). Le rapport massique lipides/protéine a été gardé constant et égal à 0,75. L'utilisation de certains lipides ne mène à la formation d'aucune vésicule. Dans le cas des autres lipides, le même phénomène de création de chapelets incurvés s'agrégeant ensuite est observé.

Lipides	Présence de « vésicules »
DOPC/DOPG 9/1 (Lipides zwitterionique/anionique) Dioléoylphosphatidylcholine / dioléoylphosphatidylglycérol	-
DMPC (Lipide zwitterionique) dimyristoylphosphatidylcholine	+
DMPC/DMPG 9/1 (Lipides zwitterionique/anionique) Dimyristoylphosphatidylcholine / dimyristoylphosphatidylglycérol	+
DMPC/DMPE 5/5 (Lipides zwitterionique/anionique) Dimyristoylphosphatidylcholine / dimyristoylphosphatidyléthanolamine	-
EPC (Lipides zwitterionique) Phosphatidylcholine d'oeuf	-
EPC/EPE 9/1 (Lipides zwitterionique/anionique) Phosphatidylcholine d'oeuf / phosphatidyléthanolamine d'oeuf	-
Lipides de levure	-
Asolectine	+
Lipides d' <i>E. Coli</i>	+

Tableau 22 : Formation des « vésicules » en fonction de la nature des lipides ajoutés

◆ **Influence de différents facteurs**

L'importance de deux principaux paramètres, la température et la présence de glycérol, a été analysée. Les échantillons protéiques correspondent à la protéine, purifiée en DDM, sans glycérol. Les lipides choisis dans ce cas sont les lipides d'*E. coli* à un rapport massique lipides/protéine de 0,75.

**\* La température**

Le comportement de molécules de lipides et de protéine a été étudié comme précédemment en fonction du temps, à deux températures différentes, à température ambiante et à 4°C. Nous avons choisi d'abaisser la température dans le but de ralentir le processus de formation des vésicules et permettre peut-être la création de vésicules complètes, fermées. Dans les deux cas cependant, nous observons à nouveau la présence de chapelets incurvés, se rassemblant et s'agréant avec le temps. Comme attendu, une température plus basse ralentit toutefois le phénomène. Cependant, le processus paraît toujours atteindre un équilibre correspondant à la formation de vésicules incomplètes (chapelets incurvés) et aucune vésicule finie n'est observée (Tab. 23).

Temps	Température ambiante (≈ 25°C)	4°C
20 min	Peu de chapelets de lipides visibles	Aucune vésicule observée
40 min	Le nombre de chapelets observés augmente légèrement	Aucune vésicule observée
1 h	Nombreux chapelets. Certains d'entre eux commencent à se rassembler	Peu de chapelets de lipides visibles
2 h	Les chapelets de lipides continuent à se rassembler	Le nombre de chapelets observés augmente légèrement
3 h	Les chapelets de lipides continuent à se rassembler et commencent à s'agréer	Nombreux chapelets. Certains d'entre eux commencent à se rassembler. Comportement identique à celui observé après 1 h à 25°C
4 h	Croissance des agrégats	Les chapelets de lipides continuent à se rassembler

**Tableau 23** : Observation du processus de reconstitution en fonction du temps, à température ambiante et à 4°C.

**\* La présence de glycérol**

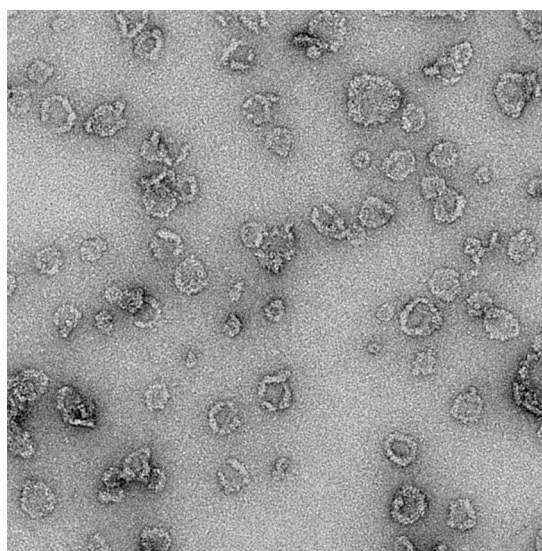
Le comportement des molécules de lipides et de protéine a également été étudié en fonction de la présence de glycérol. Le glycérol peut en effet agir comme protectant des molécules de protéine et empêcher le phénomène d'agrégation. Cependant, même si les

agrégats observés sont légèrement plus petits en présence de glycérol, ils sont toujours présents et se forment même plus rapidement que lorsque le glycérol est absent.

### ★ Elimination du détergent par dialyse

Partant de l'hypothèse que l'utilisation de Biobeads mène à une diminution trop rapide de la quantité de détergent, provoquant l'agrégation des chapelets avant que la formation des vésicules n'ait le temps de s'achever, nous avons changé le mode d'élimination du détergent en choisissant la dialyse. Les échantillons protéiques utilisés correspondent à la protéine CusA purifiée en DDM ou fos-choline 14, et mélangée aux lipides d'*E. coli* suivant un rapport massique lipides/protéine de 0,5 ou 0,75. Dans tous les cas, après 10 jours de dialyse, très peu d'agrégats sont visibles. Les structures observées ressemblent cependant aux chapelets incurvés déjà remarqués lors de l'utilisation des Biobeads. A ce stade, des Biobeads ont été ajoutés afin de s'assurer de l'élimination complète du détergent. Néanmoins, aucune évolution du processus de formation des vésicules n'a été observée après cette addition (Fig. 164). En conséquence, même si l'agrégation des chapelets a pu être évitée par dialyse, cette dernière méthode n'a pu améliorer le phénomène de reconstitution en cristaux 2D. Les structures ressemblant à des chapelets ou vésicules ouvertes paraissent correspondre à un point d'équilibre difficile à déplacer, ce qui nous a menés dans une impasse.

**Figure 164** : Essais de reconstitution de la protéine CusA en cristaux 2D à l'aide de lipides d'*E. coli* (rapport massique lipides/protéine de 0,75) – élimination du détergent par dialyse. Photo prise après 10 jours de dialyse après l'ajout de lipides



En conclusion, un grand nombre de paramètres ont été testés afin d'explorer et déterminer les conditions pouvant permettre d'améliorer l'homogénéité des préparations protéiques et la formation des vésicules menant à la reconstitution de la protéine en

cristaux 2D. A la vue des résultats obtenus, nous pouvons affirmer que la nature des deux détergents utilisés n'influe pas sur le processus de reconstitution. A 4°C, le processus est ralenti mais aboutit toujours à l'agrégation des chapelets avant qu'ils n'aient pu se refermer et former des vésicules. La présence de glycérol ne constitue pas non plus un facteur déterminant pour la reconstitution de CusA en cristaux 2D. La méthode utilisée pour la préparation des extraits membranaires (sonication ou utilisation de la presse de French) n'agit, ni de façon positive ni de façon négative, sur le processus de reconstitution. D'autres conditions auraient également pu être explorées comme le pH ou la concentration en sels afin de former des vésicules complètes et plus stables. Cependant, considérant la multiplicité des paramètres testés et le temps alloué aux travaux effectués dans le cadre d'une thèse, nous avons alors choisi de consacrer la majorité du temps restant à l'étude la protéine CopH.

Comme nous venons de le voir, nos efforts quant à l'obtention de données structurales relatives à CusA sont restés vains, quel que soit le type d'approche, en trois dimensions ou deux dimensions. Nous avons également démontré la grande difficulté à obtenir une préparation protéique de CusA homogène, ou monodisperse, paramètre a priori essentiel au processus de cristallisation d'une protéine. Dans le cadre du projet visant à étudier les relations structure-fonction des transporteurs membranaires HME-RND (Heavy Metal Efflux), CusA et CzcA, deux questions se sont alors posées : une préparation polydisperse peut-elle cristalliser ? peut-elle être fonctionnelle ?

Afin d'apporter des éléments de réponse à la première question, les travaux ont été réorientés vers l'étude du comportement comparé des protéines CusA et AcrB en présence de détergent. Cette analyse comparée, effectuée par différentes techniques et en grande partie par ultracentrifugation analytique, a été poursuivie par David Stroebel, alors post-doc au laboratoire. Le but était à la fois de mieux comprendre le comportement de CusA en solution, mais également de découvrir peut-être un facteur clé (par exemple l'homogénéité ?...) permettant l'obtention plus probable de cristaux ou étant au contraire rédhitoire à la cristallisation de la protéine CusA, voire des protéines membranaires en général. Comme décrit dans l'introduction, AcrB est la seule protéine de la famille RND, en particulier la sous-famille HAE-RND (Hydrophilic and Amphiphilic compound Efflux), dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X (Seeger, M. A. *et al.* 2006 ; Murakami, S. *et al.* 2006). Protéine homotrimérique associée à la protéine de fusion

membranaire AcrA et à la protéine de membrane externe TolC, elle représente un modèle des pompes à efflux gouverné par un gradient de protons (Nikaido, H. 1996 ; Murakami, S. *et al.* 2002 ; Tikhonova, E. B. et Zgurskaya, K. I. 2004). Il est très probable que AcrB et CusA possèdent une topologie et une structure quaternaire similaires.

Les résultats obtenus par centrifugation analytique ont été décrits dans le paragraphe 1.3.3, afin d'approfondir l'étude de l'homogénéité des préparations protéiques de CusA. L'ensemble des résultats obtenus sont regroupés dans la publication Stroebel, D. *et al.* 2007.

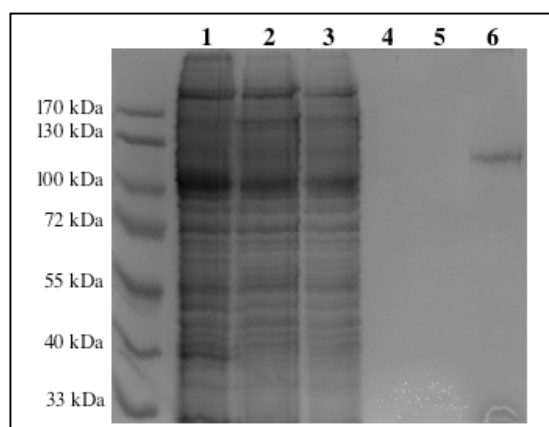
Pour répondre à la deuxième question, la protéine CzcA représentait un outil intéressant. Son étude fonctionnelle étant plus aisée à mettre en œuvre que celle de CusA qui supposait de manipuler en boîte à gants avec des ions  $\text{Cu}^+$ . L'analyse fonctionnelle de CzcA a été effectuée dans le laboratoire de D. H. Nies, en Allemagne, où j'ai été accueillie et formée pendant deux semaines. Ce séjour avait deux buts : vérifier l'activité de la protéine issue d'une préparation polydisperse, et apprendre la méthode de reconstitution en protéoliposomes suivie de la mesure d'activité de la protéine par fluorescence afin de pouvoir rapporter et développer cette technique au laboratoire. Cette étude a débuté par l'analyse du comportement de CzcA en présence de détergent, en parallèle de celle de CusA, et fait l'objet de la partie qui suit.

## II –La protéine CzcA

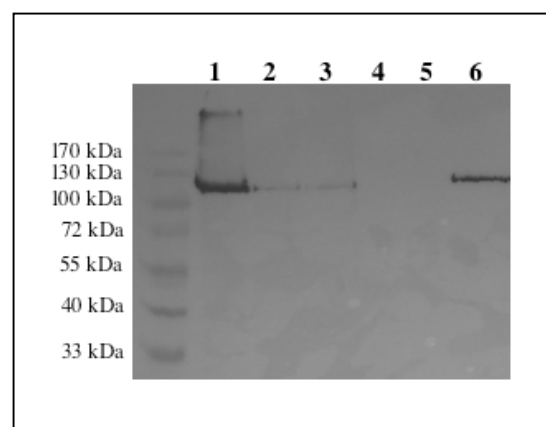
### 2.1 Surexpression et purification de CzcA en détergent

Comme pour la protéine CusA, la construction du plasmide d'expression de la protéine CzcA a été conçue selon la séquence codante du gène *czcA* au sein du vecteur pASK-IBA3 permettant d'ajouter, en C-terminal de la protéine, un strept-tag II. Le plasmide pASK-IBA3:czcA nous a également été fourni par l'équipe de D. H. Nies. Les conditions d'expression et le protocole général de purification de la protéine sont décrits dans la littérature (Goldberg, M. *et al.* 1999). L'optimisation des conditions de surexpression a permis d'obtenir une bonne surproduction de la protéine, comparable à celle de CusA dans la souche BL21(DE3)pLysS d'*E. coli*, après une induction de 3 heures à 37°C, dans du milieu TB, par 200  $\mu\text{g/L}$  d'anhydrotétracycline. Les contrôles de surexpression ont été effectués par Wester-Blot, comme dans le cas de la protéine CusA.

Les étapes de purification sont similaires à celles décrites en première partie pour purifier la protéine CusA. La présence du strep-tag II, en fusion avec la protéine, a permis d'obtenir la protéine CzcA avec un bon degré de pureté, après solubilisation de l'extrait membranaire en DDM (1 %) et chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> (IBA) (Fig. 165). Il est difficile d'être convaincu de la bonne solubilisation de CzcA en détergent et de son affinité pour la résine de la colonne utilisée. On peut en effet nettement voir une bande correspondant à une protéine de même masse que CzcA dans le surnageant obtenu après centrifugation haute vitesse des extraits membranaires solubilisés ainsi que dans la fraction non retenue (flow-through) (Fig. 165 pistes 2 et 3). La vérification de la présence de la protéine par Western-Blot (Fig. 166) révèle que CzcA ne se trouve pas dans ces fractions : la chromatographie d'affinité est donc efficace et la protéine est éluée par la desthiobiotine après lavage de la colonne (Fig. 165).

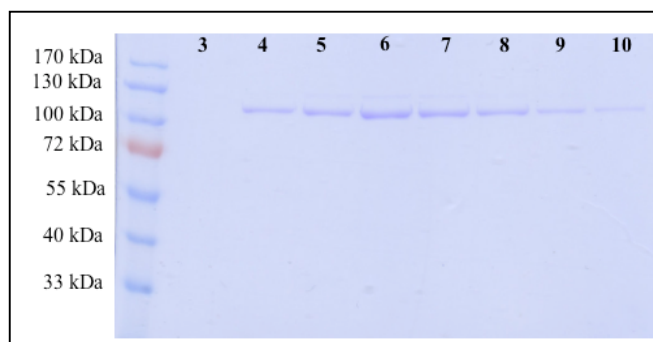


**Figure 165** : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant les différentes étapes de la purification de CzcA en DDM 0,05 %. **(1)** extrait membranaire solubilisé en DDM 1 %. **(2)** surnageant après centrifugation haute vitesse. **(3)** fraction non retenue après chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. **(4)** lavage en tampon 2 (Tris-HCl pH = 8, DDM 0,2 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(5)** lavage en tampon 3 (Tris-HCl pH = 8, DDM 0,05 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(6)** Elution de CzcA.



**Figure 166** : Western-Blot correspondant au gel SDS-PAGE en figure 165. **(1)** extrait membranaire solubilisé en DDM 1 %. **(2)** surnageant après centrifugation haute vitesse. **(3)** fraction non retenue après chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. **(4)** lavage en tampon 2 (Tris-HCl pH = 8, DDM 0,2 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(5)** lavage en tampon 3 (Tris-HCl pH = 8, DDM 0,05 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(6)** Elution de CzcA.

Le comportement de la protéine CzcA sur gradient de sucrose en DDM est similaire à celui de CusA (Fig. 167). CzcA est présente dans quasiment l'ensemble du gradient, des fractions 4 à 10, laissant penser à la coexistence de plusieurs états oligomériques dans la préparation protéique.



**Figure 167 :** Gel SDS-PAGE (12%) représentant le contenu des différentes fractions de 800  $\mu$ L collectées à partir du haut d'un gradient de sucrose contenant 0,05% DDM. L'échantillon déposé sur le gradient correspond à la protéine CzcA éluée par la desthiobiotine après chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. CzcA est présente dans quasiment l'ensemble du gradient, des fractions 4 à 10.

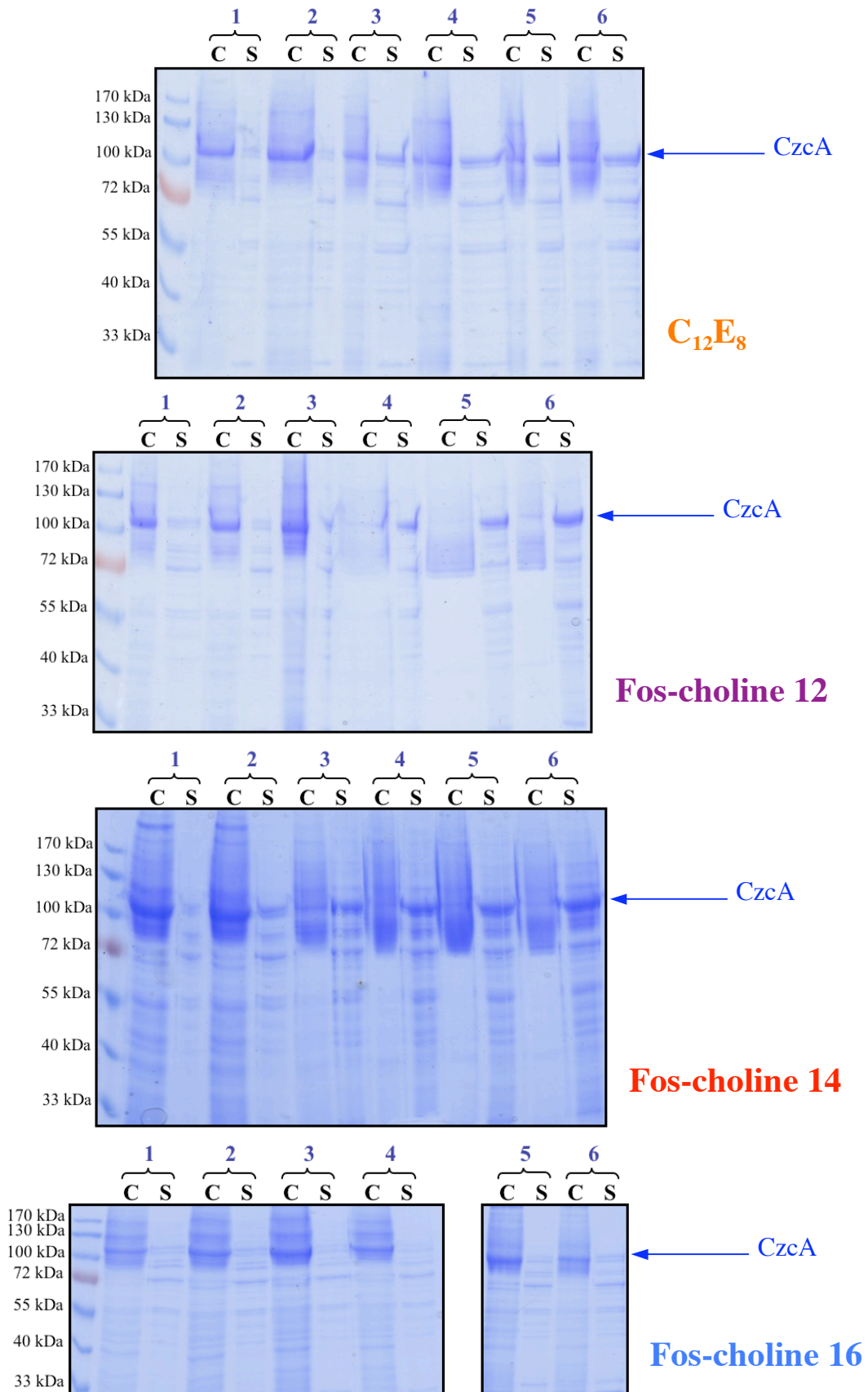
## 2.2 Solubilisation de CzcA par d'autres détergents

### 2.2.1 Détermination de détergents adéquats à la solubilisation de CzcA

A partir des résultats obtenus lors de la purification de la protéine CzcA et au vu de son comportement après équilibration sur gradient de densité de sucrose, comportement nous indiquant une grande polydispersité de la préparation protéique, nous avons cherché, comme dans le cas de la protéine CusA, à déterminer d'autres détergents permettant d'obtenir à la fois une bonne solubilisation des membranes, une préparation protéique homogène, une bonne stabilité de la protéine... Nous nous sommes également appliqués à déterminer la concentration minimale nécessaire pour réunir tous ces paramètres. Une gamme de détergents a alors été explorée ( $C_{12}E_8$  (octaéthylèneglycolmonododécyléther), FC12, FC14, FC16) (Fig. 168 et Tab. 24). Concernant l'utilisation du  $C_{12}E_8$ , on voit clairement que la protéine CzcA n'est pas totalement solubilisée même pour un rapport massique  $m_{CzcA}/m_{C_{12}E_8}$  de 0,28 (soit 5,2 x cmc). De la même façon, la fos-choline 16 ne parvient pas à solubiliser les extraits membranaires, même à une concentration voisine de 50 fois la cmc. CzcA paraît en revanche totalement solubilisée en fos-choline 12 pour un rapport massique  $m_{CzcA}/m_{fos\text{-}choline\ 12} = 0,6$ , soit 0,17 % de détergent. La fos-choline 14 s'est également révélée capable de solubiliser les extraits membranaires de CzcA à partir d'un rapport massique  $m_{protéine}/m_{détergent}$  de 1, soit 0,09 % fos-choline 14.

A la lumière de ces résultats et de ceux obtenus avec la protéine CusA, nous avons choisi d'optimiser la purification de CzcA en fos-choline 14, de la même façon qu'avec la protéine CusA.





**Figure 168** : Solubilisation ménagée des extraits membranaires de la protéine CzcA par différents détergents. **C** signifie que la protéine se trouve dans le culot après centrifugation (fraction insoluble). **S** signifie que la protéine se trouve dans le surnageant après centrifugation (fraction soluble). Les numéros correspondent aux conditions décrites dans le tableau 24.

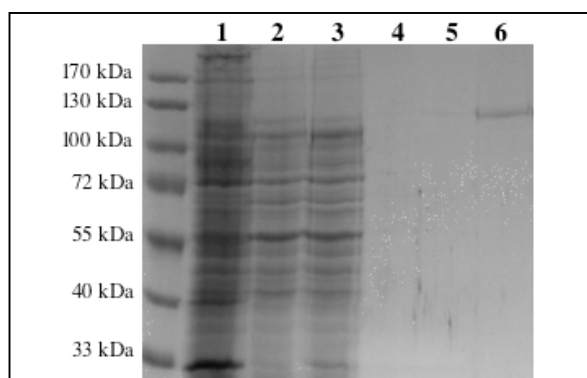


	<b>C<sub>12</sub>E<sub>8</sub></b> M = 538,8 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,048%		<b>Fos-choline 12</b> M = 351 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,05%		<b>Fos-choline 14</b> M = 379,5 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,0045%		<b>Fos-choline 16</b> M = 407,5 g.mol <sup>-1</sup> cmc = 0,00053%	
	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%	Rapport massique m <sub>prot</sub> /m <sub>dét</sub>	%
<b>1</b>	∞	0	∞	0	∞	0	∞	0
<b>2</b>	5	0,014	5	0,014	5	0,014	50	0,0014
<b>3</b>	1,4 (1× cmc)	0,048	1,67 (1,3× cmc)	0,068	1,54 (10× cmc)	0,045	13,23 (10× cmc)	0,0053
<b>4</b>	0,9	0,078	0,9	0,078	0,9	0,078	9	0,0078
<b>5</b>	0,5	0,14	0,5	0,14	0,5	0,14	5	0,014
<b>6</b>	0,28	0,25	0,28	0,25	0,28	0,25	2,8	0,025

**Tableau 24** : Conditions testées pour la solubilisation ménagée des extraits membranaires de la protéine CzcA. Les extraits obtenus ont été analysés sur gel SDS-PAGE (12 %) (voir Fig. 34).

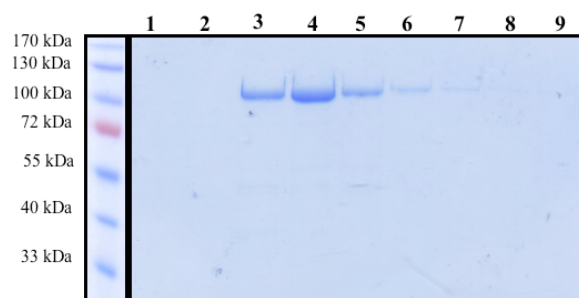
## 2.2.2 Purification en fos-choline 14

La protéine CzcA a également été purifiée en fos-choline 14 suivant le même protocole mis au point avec CusA (cf paragraphe 1.2.3), par chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. Le comportement observé est similaire à celui de CusA (Fig. 169). L'extrait membranaire est totalement solubilisé avec 0,05 % fos-choline 14. La vérification de l'affinité de la protéine pour la résine a également été effectuée par Western-Blot. La protéine est ensuite éluée par 2,5 mM desthiobiotine en tampon Tris-HCl pH = 8, fos-choline 14 0,025 %, NaCl 100 mM.



**Figure 169** : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant les différentes étapes de la purification de CzcA en fos-choline 14 0,025 %. **(1)** extrait membranaire solubilisé en fos-choline 14 0,05 %. **(2)** surnageant après centrifugation haute vitesse. **(3)** fraction non retenue après chromatographie d'affinité sur colonne *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup>. **(4)** lavage en tampon 2 (Tris-HCl pH = 8, fos-choline 14 0,025 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(5)** lavage en tampon 3 (Tris-HCl pH = 8, fos-choline 14 0,025 %, NaCl 100 mM) (10 mL). **(6)** Elution de CzcA.

CzcA possède le même comportement que CusA sur gradient de sucrose, en fos-choline 14 0,025 %. Elle s'équilibre dans une région restreinte du gradient, principalement dans les fractions 3, 4 et 5 (Fig. 170).



**CzcA** Figure 170 : Gel SDS-PAGE (12 %) représentant le contenu des fractions de 800  $\mu$ L collectées depuis le haut d'un gradient de sucrose contenant 0,025 % fos-choline 14. CzcA est présente dans une région étroite du gradient, en particulier dans les fractions 4, 5, et 6

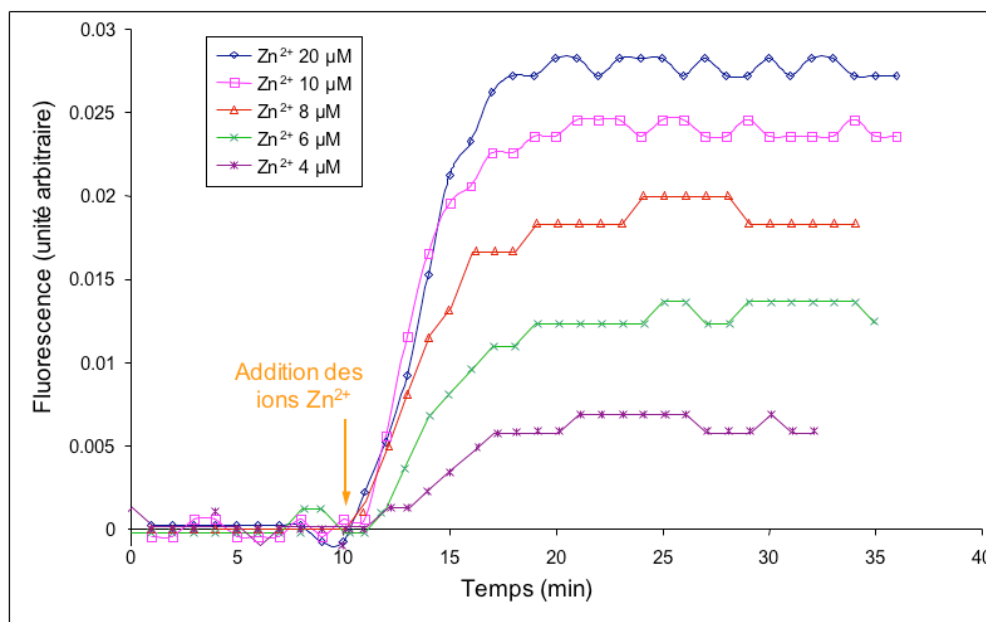
### 2.3 Etudes par microscopie électronique

Une étude similaire à celle décrite précédemment pour CusA (paragraphe 1.3.3 et 1.5.2) a été réalisée sur la protéine CzcA. De la même façon, l'analyse en particules isolées révèle également l'inhomogénéité de la préparation protéique. D'autre part, la reconstitution en cristaux 2D montre les mêmes résultats que ceux obtenus avec la protéine CusA : quelque soient les conditions de préparation des échantillons (voir Tab. 1), aucune forme de vésicules fermées n'est visible et l'organisation des molécules de protéine en deux dimensions n'est pas observée.

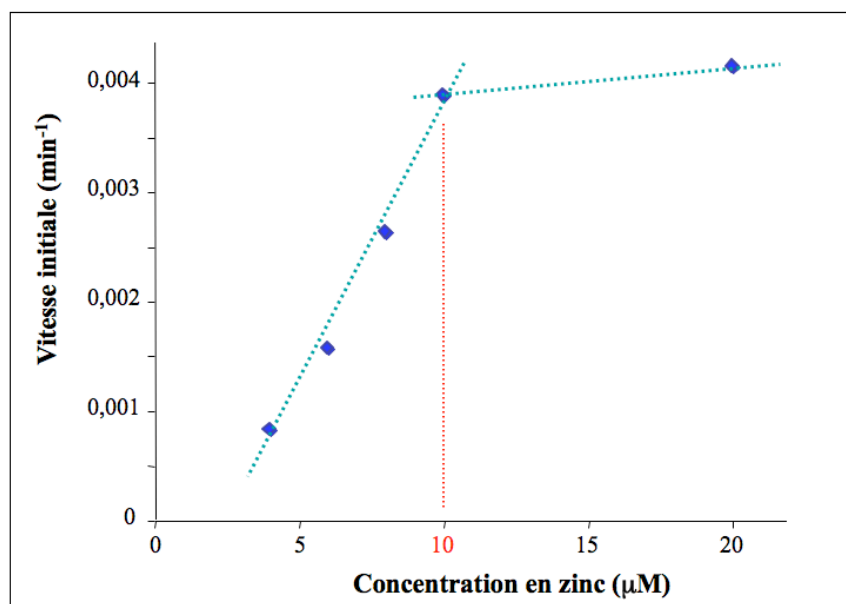
### 2.4 Approche fonctionnelle : reconstitution en protéoliposomes et mesure d'activité

Les protéines CusA et CzcA possèdent *in vivo* une activité de transporteur d'ions  $\text{Cu}^+/\text{Ag}^+$  ou  $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ , respectivement, couplée à un antiport de protons. Nous avons choisi d'étudier l'activité du transporteur CzcA car la mesure du transport des ions  $\text{Zn}^{2+}$  est plus aisée à mettre en œuvre que les ions  $\text{Cu}^+$  nécessitant une atmosphère inerte permettant de maintenir des conditions réductrices. Nous nous sommes ainsi appliqués à tester le transport des ions  $\text{Zn}^{2+}$  par la protéine, par détection de fluorescence après reconstitution de CzcA en protéoliposomes. La reconstitution d'une protéine membranaire en protéoliposomes est une méthode visant à introduire la protéine dans des membranes lipidiques formant des vésicules. La protéine se trouve ainsi dans une structure proche de son environnement natif où il est possible d'étudier son activité.

La reconstitution en protéoliposomes et les tests d'activité ont été effectués immédiatement après purification de la protéine CzcA. Ces expériences ont été menées avec Markus Otto, alors post-doc à l'Institut de Microbiologie, à l'Université de Halle, en Allemagne, où j'ai été accueillie par le Professeur D. H. Nies. La mesure d'activité est basée sur la détection de la fluorescence du fluorophore NG (New port Green DCF) incorporé à l'intérieur des protéoliposomes lors de leur conception. La fluorescence augmente lorsque le fluorophore se lie aux ions  $Zn^{2+}$  importés à l'intérieur des protéoliposomes par la protéine CzcA. Après avoir défini une ligne de base correspondant aux protéoliposomes dans le tampon de travail, des quantités croissantes d'ions  $Zn^{2+}$  sont ajoutées à plusieurs solutions de protéoliposomes, de 200 nm de diamètre, fraîchement préparés, afin de connaître la capacité de transport de la protéine CzcA reconstituée (Fig. 171). Les mesures d'activité sont réalisées immédiatement après la préparation des protéoliposomes. Plus aucune fluorescence n'est détectée 4 heures après la préparation des protéoliposomes. Ceci pourrait être dû à la faible stabilité du fluorophore à la lumière et/ou des protéoliposomes à 4°C. La fluorescence détectée augmente de façon linéaire avec la quantité d'ions  $Zn^{2+}$  importés au sein des protéoliposomes. Elle atteint un plateau à partir de 10  $\mu M$  d'ions  $Zn^{2+}$  présents dans le milieu extérieur (Fig. 172).



**Figure 171** : Mesure d'activité par fluorescence de la protéine CzcA. Représentation de la fluorescence en fonction du temps pour différentes concentrations de zinc ajoutées dans le milieu. La fluorescence détectée augmente avec la quantité d'ions  $Zn^{2+}$  importés au sein des protéoliposomes.



**Figure 172** : Représentation des vitesses initiales de transport en fonction de la concentration en zinc. La vitesse initiale de transport diminue de façon drastique au-delà de 10 μM de zinc dans le milieu extérieur.

Les expériences n'ont pu être finalisées faute de temps. Il est cependant possible d'affirmer que le transporteur CzcA, purifié en DDM et reconstitué en protéoliposomes, est actif et capable de transporter les ions  $Zn^{2+}$ .

## Conclusion

L'étude des transporteurs HME-RND, CusA et CzcA, visant initialement l'obtention de la structure des protéines par cristallographie, a nécessité l'analyse de la solubilisation des extraits membranaires relatifs à chaque protéine par différents détergents, puis la mise au point du protocole de purification en fonction des détergents retenus, en particulier DDM 0,05 % et fos-choline 14 0,025 %. Les deux protéines révèlent un comportement similaire en détergent, comme le présageaient leurs grands pourcentages d'identité (34 %) et de similarité (70 %). La préparation protéique apparaît dans les deux cas plus polydispense en DDM qu'en fos-choline 14, sur gradient de sucrose comme en ultracentrifugation analytique. L'étude par ultracentrifugation analytique de la protéine CzcA n'a pas été réalisée. Cependant, les analyses par gradient de sucrose et microscopie électronique laissent présager des profils de distribution des coefficients de sédimentation  $c(s)$  semblables à ceux enregistrés pour CusA et montrant la coexistence de différentes formes oligomériques correspondant principalement aux monomère, dimère et trimère, suivies de formes plus lourdes.

Les contrôles réalisés au cours de la purification concernaient, dans chacun des cas, l'analyse de l'homogénéité de la préparation protéique, critère a priori essentiel à la cristallisation d'une protéine. Les différentes approches structurales de la protéine CusA, en trois dimensions ou deux dimensions, se sont cependant révélées infructueuses. L'étude de l'homogénéité, riche des diverses méthodes utilisées pour caractériser les différentes populations protéiques en présence et estimer la quantité de détergent et de lipides propre à chaque complexe membranaire, a ensuite été approfondie par la comparaison du comportement de CusA et AcrB en présence de détergent.

Enfin, afin de valider nos préparations protéiques par une mesure d'activité, nous avons réalisé une étude fonctionnelle de la protéine CzcA, transporteur d'ions  $Zn^{2+}$ . Les mesures d'activité, effectuées par fluorescence, ont permis de montrer que la protéine CzcA, purifiée en DDM et reconstituée en protéoliposomes de 200 nm de diamètre, était capable de transporter les ions  $Zn^{2+}$ .



*Les transporteurs membranaires*

*CusA et CzcA*

*Discussion*





## Discussion

La recherche d'informations structurales et fonctionnelles sur les protéines membranaires HME-RND, CusA et CzcA, nécessitait l'obtention d'une protéine pure, soluble, stable, et sous forme native, *in vitro*. Le travail sur ces protéines a débuté par l'optimisation de leur surexpression chez *E. coli*. Il a inclus la mise au point des conditions de solubilisation dans différents détergents, puis l'établissement d'un protocole de purification adapté. CusA et CzcA se sont révélées pures et solubles en présence de détergent, par exemple 0,05 % de DDM. Cependant, leur comportement en solution, difficile à comprendre, a posé problème et s'est révélé un obstacle dans la recherche d'une préparation protéique homogène. Tous nos efforts pour obtenir une préparation monodisperse, critère *a priori* essentiel à l'étude structurale d'une protéine, sont restés vains.

Plusieurs questions se sont alors posées : une préparation polydisperse peut-elle être fonctionnelle ? Peut-elle cristalliser ? La recherche de la monodispersité d'une préparation protéique avant toute étude structurale constitue-t-elle une bonne stratégie ?

Pour répondre à la première question, la protéine CzcA constituait un outil intéressant. Son étude fonctionnelle est plus facile à mettre en œuvre que celle de CusA qui suppose de manipuler en boîte à gants avec des ions Cu(I). L'étude fonctionnelle de CzcA a été effectuée dans le laboratoire de D. H. Nies, en Allemagne, où j'ai été accueillie et formée pendant deux semaines. Nous avons montré que la protéine CzcA était capable de transporter les ions  $Zn^{2+}$  et donc mis en évidence que la préparation protéique, polydisperse, était fonctionnelle.

Concernant la deuxième question, le fait qu'aucun essai de cristallogenèse de la protéine CusA n'ait pu permettre d'obtenir des cristaux soutient l'idée communément admise qu'une préparation protéique doit être la plus monodisperse possible pour cristalliser. Afin de mieux comprendre le comportement des deux protéines en présence de détergent, nous avons mené une étude comparative de leurs propriétés par rapport à celles de AcrB, seule protéine RND de structure connue. L'analyse par équilibration sur gradient de sucrose, diffusion de lumière, microscopie électronique et ultracentrifugation analytique des deux protéines CusA et CzcA a révélé une grande polydispersité des préparations, en particulier en DDM. Il est à noter ici que, dans nos conditions expérimentales, la technique de chromatographie d'exclusion de taille était incapable de distinguer les diverses populations protéiques en présence, de poids moléculaires différents. Les profils de chromatographie enregistrés étaient

tous identiques, quelles que soient les conditions de purification et le ou les détergents utilisés, montrant un pic unique centré sur un volume d'éluion de 9,3 mL (correspondant à un complexe de masse voisine de 600 kDa), proche du volume mort. Cette technique est fréquemment utilisée pour estimer l'état oligomérique de complexes protéiques. Toutefois, dans notre cas, en présence de détergent(s), elle ne semble pas adaptée. Nous pouvons tenter d'expliquer cette observation en supposant que le complexe protéine-détergent serait exclu spécifiquement de la résine, pour une raison inconnue, indépendamment du type de détergent utilisé. Le complexe serait alors élué avec un volume proche du volume mort. Une autre explication pourrait venir des conditions imposées par les cycles de concentration/dilution de l'échantillon, avant chromatographie. En effet, comme décrit plus loin, CusA est très sensible à cette étape qui tend à provoquer son agrégation.

Il est possible de favoriser la monomérisation de la protéine en présence d'un détergent au fort pouvoir dissociant. En effet, le SDS, ou même la fos-choline 14, sont capables d'affecter l'équilibre d'oligomérisation de la protéine dans le sens de l'obtention de la forme la plus simple, c'est-à-dire le monomère. L'analyse par ultracentrifugation analytiques des échantillons préparés en fos-choline 14 montre la prédominance de la forme monomérique (Fig. 159A). L'observation de l'effet de la présence de SDS par électrophorèse native (Fig. 148) confirme cette idée : l'ajout progressif de SDS tend à diminuer le nombre d'oligomères en présence, en favorisant la prédominance du monomère.

L'étude plus approfondie du comportement de CusA en détergent s'est appuyée sur l'analyse de la distribution des coefficients de sédimentation, par ultracentrifugation analytique de la protéine CusA, purifiée en DDM. Elle a permis de distinguer plusieurs populations correspondant majoritairement aux formes monomériques, dimériques et trimériques, suivies de formes plus lourdes. Ce comportement n'est pas unique à CusA. La même étude réalisée sur la protéine AcrB montre que la protéine purifiée en DDM se présente également en solution sous la forme de plusieurs espèces représentant principalement les monomère, dimère et trimère, mais également des oligomères plus gros. Si l'on ne considère que les formes monomériques (8 S), dimériques (11 S) et trimériques (16 S), il est à noter que les coefficients de sédimentation caractérisant chacune d'elles restent identiques quelles que soient les conditions (Fig. 162). Leurs proportions restent d'autre part stables dans le temps, jusqu'à 72 heures, et ne dépendent pas de la concentration en protéine (Fig. 162). Nous pouvons alors penser à l'existence d'un équilibre lent d'association et dissociation entre les différentes formes oligomériques, y compris avec les formes plus lourdes (Fig. 173) (Schuck, P. 2003). Cet équilibre n'apparaît pas comme rédhibitoire à la cristallisation de la

protéine AcrB. Nous pouvons même avancer qu'il représenterait une condition essentielle à la formation de cristaux. En effet, l'observation des coefficients de sédimentation  $c(s)$  relatifs à CusA et AcrB, en DDM, révèle la présence, dans les deux cas, de formes oligomériques plus lourdes que le trimère ( $19 S < S < 47 S$ ). Dans le cas de AcrB, ces formes prédominent même dans les conditions menant à la cristallisation de la protéine. Ceci suggère que ces formes oligomériques ne correspondent pas à un état dénaturé ou agrégé de la protéine mais joueraient un rôle important en tant qu'intermédiaires dans le processus de cristallisation (Fig. 173). Cette augmentation de l'indice de polydispersité avec la concentration en protéine a déjà été observé chez plusieurs protéines membranaires (Zouni, A. *et al.* 2005) ainsi que chez les protéines solubles.

Les deux protéines CusA et AcrB possèdent donc un comportement très similaire en présence de détergent, en se présentant sous la forme d'une large gamme de formes oligomériques coexistant en solution. Or, ces deux protéines appartiennent à des familles différentes au sein de la superfamille des protéines RND d'une part, et leur homologie de séquence est faible (seulement 22 % d'identité de séquence). On peut donc penser que ce comportement est une caractéristique générale à tous les membres de la superfamille des transporteurs RND.

Toutefois, tous nos efforts quant à l'obtention de cristaux de CusA sont restés vains jusqu'à aujourd'hui. Ceci peut s'expliquer par le faible pourcentage d'identité entre les deux protéines, induisant des différences au niveau des surfaces exposées au solvant. Nous pouvons noter d'autres différences entre les deux protéines.

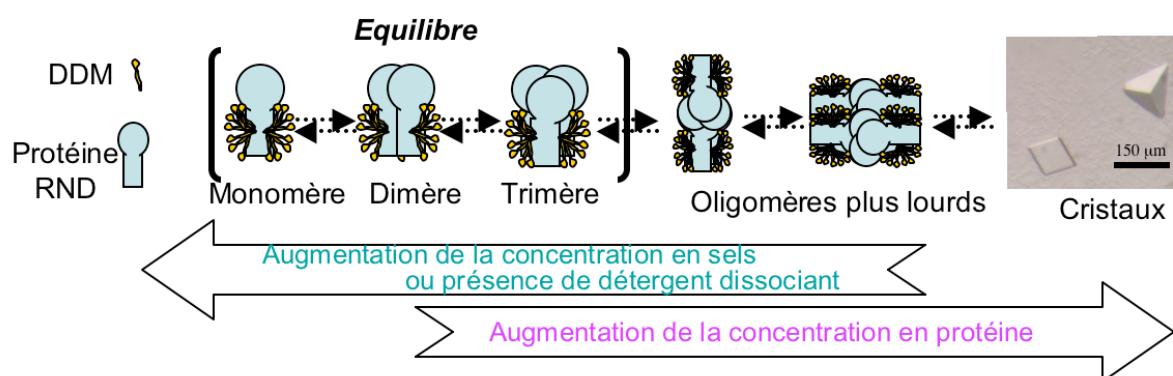
Il est tout d'abord impossible de concentrer la protéine CusA sans concentrer en même temps une partie du détergent. En revanche, AcrB se concentre facilement. Cette observation peut être reliée au fait que CusA purifiée contient quelques molécules de lipides, comme nous l'a révélée l'analyse par IRTF. En effet, nous pouvons formuler l'hypothèse que la présence de lipides gonflerait la micelle de détergent. Dans ce cas, le complexe protéine-lipides-détergent serait plus gros et ses propriétés seraient modifiées. Il est également possible que les lipides aient un léger effet sur la conformation du complexe. Ainsi, au cours de la concentration, les molécules de lipides auraient tendance à se rapprocher, ce qui aurait pour conséquence de changer les coordonnées du point définissant le système au sein du diagramme de phase. Le complexe se retrouverait dans un environnement de phases mixtes, ce qui provoquerait son agrégation sur la membrane.

D'autre part, à faible concentration en protéine, la proportion en forme monomérique CusA-DDM est supérieure à celle du monomère AcrB-DDM (Fig. 162). Cette observation pourrait

constituer une autre raison expliquant la difficile cristallisation de CusA. Par ailleurs, il est à noter qu'en présence de fos-choline 14, détergent possédant un effet dissociant plus fort que le DDM, les préparations CusA-FC14 révèlent une prédominance de la forme monomérique, plus sensible à la dégradation. Il en est de même lorsque la protéine est purifiée en présence de DDM et SDS.

En conséquence, nous pouvons penser, à partir des résultats obtenus, que l'hétérogénéité des préparations de AcrB ne représente pas une contre-indication à la cristallisation. Au contraire, le comportement du complexe AcrB-DDM dans les conditions menant à l'obtention de cristaux de la protéine suggère qu'il est non seulement nécessaire d'éviter la monomérisation (en évitant l'emploi de détergents dissociants ou de hautes concentrations en sels) mais qu'il est également indispensable d'atteindre une concentration en protéine permettant la formation de plusieurs états oligomériques, y compris d'oligomères de masses plus élevées, dont la présence pourrait favoriser la nucléation. En d'autres termes, la recherche d'une bonne monodispersité protéique, sur laquelle nous avons concentré tous nos efforts, ne représente pas une bonne stratégie pour la cristallisation de CusA, comme le montre la comparaison avec AcrB.

A partir de ces résultats, et considérant le temps imparti pour une thèse, nous nous sommes posé la question de la poursuite de ce projet. Nous avons fait le choix de continuer en me focalisant sur l'étude d'une nouvelle protéine, périplasmique, et impliquée également dans la résistance au cuivre chez *C. metallidurans* CH34 : la protéine CopH, qui a fait l'objet du chapitre précédent.



**Figure 173** : Représentation schématique de l'équilibre oligomérique menant à la cristallisation des transporteurs de la famille RND (adapté de Stroebel, D. *et al.* 2007).

*Conclusion générale*

*Perspectives*



## Conclusion générale

### Perspectives

Le travail effectué sur les deux protéines membranaires, CusA et CzcA, a concerné mon projet de thèse initial. Il s'est essentiellement concentré sur la recherche d'un protocole adapté assurant l'obtention d'une préparation protéique homogène. Nous avons ensuite pu montrer, grâce au concours des résultats obtenus par centrifugation analytique, que la monodispersité ne représentait pas forcément un critère absolu pour l'étude structurale d'une protéine, AcrB fournissant un excellent contre-exemple.

L'étude de la protéine CopH a débuté ensuite, sur un terrain vierge de toute expérience sur les protéines à cuivre au sein du laboratoire. Du clonage à la protéine et jusqu'à la caractérisation physicochimique approfondie de CopH, nous avons utilisé diverses méthodes complémentaires afin de définir les sites de fixation des ions Cu(II) du point de vue de la stoechiométrie, de l'affinité de l'interaction CopH-Cu, ainsi que de la nature des ligands et de la structure des sites cuivre.

Bien que nos essais concernant la détermination d'éventuels partenaires solubles de la protéine CopH soient restés sans résultat, l'existence d'un réseau de protéines codées par les 19 gènes du cluster *cop* ne fait nul doute. Ces protéines, solubles et membranaires, jouent certainement un rôle essentiel tout en agissant de conserve à la résistance au cuivre chez la souche *C. metallidurans* CH34.

D'autre part, l'examen du génome de *C. metallidurans* CH34 révèle la présence des gènes *copRSABCD* sur le mégaplasmide mais également sur le plasmide pMOL30. Sur ce dernier, ces ORFs sont accompagnés du gène *copI* en aval. Plusieurs questions s'imposent alors à l'esprit : pourquoi ce doublon ? Quelle est son utilité ? Quelle est la fonction de CopI ? Chez la bactérie *A. veronii*, CopI jouerait un rôle homologue à celui des oxydoréductases. Les gènes *copRSABCDI* interviendraient de façon encore mystérieuse dans la détoxification périplasmique et le transport du cuivre.

Enfin, force est de constater la difficulté de clarifier l'état de l'art concernant la régulation du cuivre chez les bactéries, et ce pour deux raisons principales. La résistance aux métaux chez les bactéries est un domaine très vaste, encore mal exploré. Très peu de systèmes sont réellement connus. La littérature à ce sujet est ainsi peu fournie. Une seule revue a tenté de faire le point sur les différents systèmes connus, ou tout du moins décrits, chez les bactéries. Il apparaît cependant clairement que de nombreux systèmes ou interactions sont représentés par un point d'interrogation et qu'aucune classification de ces systèmes n'existe. Par exemple, plusieurs protéines portent le même nom, chez des bactéries différentes, bien qu'elles ne possèdent pas la même fonction...

Concernant plus particulièrement le cluster *cop*, deux protéines sont aujourd'hui en partie caractérisées, CopK dont la structure a été résolue par RMN et CopH dont il reste à obtenir la structure, ce qui permettra d'achever l'étude de son interaction avec les ions Cu(II) et de mieux comprendre sa fonction. Seules dix-sept protéines restent donc encore mystérieuses et prêtes à dévoiler leurs secrets...



# *Bibliographie*



## Bibliographie

### A

- Andersen, C., Hughes, C. and Koronakis, V. (2000). "Channel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels." *EMBO Rep* **1**(4): 313-8.
- Andrews, N. C. and Schmidt, P. J. (2007). "Iron homeostasis." *Annu Rev Physiol* **69**: 69-85.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Mangani, S. and Thompsett, A. R. (2003). "A redox switch in CopC: an intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3814-9.
- Aronoff-Spencer, E., Burns, C. S., Avdievich, N. I., Gerfen, G. J., Peisach, J., Antholine, W. E., Ball, H. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. and Millhauser, G. L. (2000). "Identification of the Cu<sup>2+</sup> binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy." *Biochemistry* **39**(45): 13760-71.
- Ascone, I., Longo, A., Dexpert, H., Ciriolo, M. R., Rotilio, G. and Desideri, A. (1993). "An X-ray absorption study of the reconstitution process of bovine Cu,Zn superoxide dismutase by Cu(I)-glutathione complex." *FEBS Lett* **322**(2): 165-7.
- Astashkin, A. V., Raitsimring, A. M., Walker, F. A., Rensing, C. and McEvoy, M. M. (2005). "Characterization of the copper(II) binding site in the pink copper binding protein CusF by electron paramagnetic resonance spectroscopy." *J Biol Inorg Chem* **10**(3): 221-30.

### B

- Banci, L., Pierattelli, R. and Vila, A. J. (2002). "Nuclear magnetic resonance spectroscopy studies on copper proteins." *Adv Protein Chem* **60**: 397-449.
- Bender, C. L. and Cooksey, D. A. (1986). "Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. tomato: conjugative transfer and role in copper resistance." *J Bacteriol* **165**(2): 534-41.
- Berks, B. C., Sargent, F. and Palmer, T. (2000). "The Tat protein export pathway." *Mol Microbiol* **35**(2): 260-74.

Bersch, B. and al. (en préparation).

Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Parkinson, J. A., Robinson, A. K., Cavet, J. S., Robinson, N. J. and Sadler, P. J. (2001). "A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9593-8.

Borremans, B., Hobman, J. L., Provoost, A., Brown, N. L. and van Der Lelie, D. (2001). "Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34." *J Bacteriol* **183**(19): 5651-8.

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**: 248-54.

Brown, N. L., Shih, Y. C., Leang, C., Glendinning, K. J., Hobman, J. L. and Wilson, J. R. (2002). "Mercury transport and resistance." *Biochem Soc Trans* **30**(4): 715-8.

Brown, P. H. and Schuck, P. (2006). "Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation." *Biophys J* **90**(12): 4651-61.

Bryce, G. F., Roeske, R. W. and Gurd, F. R. (1965). "Cupric ion complexes of histidine-containing peptides." *J Biol Chem* **240**(10): 3837-46.

Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C. M., Lario, P., Avdievich, N. I., Antholine, W. E., Olmstead, M. M., Vrielink, A., Gerfen, G. J., Peisach, J., Scott, W. G. and Millhauser, G. L. (2002). "Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein." *Biochemistry* **41**(12): 3991-4001.

Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S. B., Antholine, W. E., Gerfen, G. J., Peisach, J. and Millhauser, G. L. (2003). "Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein." *Biochemistry* **42**(22): 6794-803.

## C

Calzolari, L., Lysek, D. A., Perez, D. R., Guntert, P. and Wuthrich, K. (2005). "Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 651-5.

- Cereghetti, G. M., Schweiger, A., Glockshuber, R. and Van Doorslaer, S. (2003). "Stability and Cu(II) binding of prion protein variants related to inherited human prion diseases." *Biophys J* **84**(3): 1985-97.
- Cerpa, W. F., Barria, M. I., Chacon, M. A., Suazo, M., Gonzalez, M., Opazo, C., Bush, A. I. and Inestrosa, N. C. (2004). "The N-terminal copper-binding domain of the amyloid precursor protein protects against Cu<sup>2+</sup> neurotoxicity in vivo." *Faseb J* **18**(14): 1701-3.
- Cha, J. S. and Cooksey, D. A. (1991). "Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(20): 8915-9.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V. and Mondragon, A. (2003). "Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR." *Science* **301**(5638): 1383-7.
- Chattopadhyay, M., Walter, E. D., Newell, D. J., Jackson, P. J., Aronoff-Spencer, E., Peisach, J., Gerfen, G. J., Bennett, B., Antholine, W. E. and Milhauser, G. L. (2005). "The octarepeat domain of the prion protein binds Cu(II) with three distinct coordination modes at pH 7.4." *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 12647-12656.
- Chelly, J. and Monaco, A. P. (1993). "Cloning the Wilson disease gene." *Nat Genet* **5**(4): 317-8.
- Choi, D. W., Zea, C. J., Do, Y. S., Semrau, J. D., Antholine, W. E., Hargrove, M. S., Pohl, N. L., Boyd, E. S., Geesey, G. G., Hartsel, S. C., Shafe, P. H., McEllistrem, M. T., Kisting, C. J., Campbell, D., Rao, V., de la Mora, A. M. and Dispirito, A. A. (2006). "Spectral, kinetic, and thermodynamic properties of Cu(I) and Cu(II) binding by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Biochemistry* **45**(5): 1442-53.
- Cobbett, C. S. (1999). "A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species." *Trends Plant Sci* **4**(9): 335-337.
- Cobbett, C. S. (2000). "Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification." *Plant Physiol* **123**(3): 825-32.
- Cohen, E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D. M., Ebel, C., le Maire, M. and Karlish, S. J. (2005). "Purification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions." *J Biol Chem* **280**(17): 16610-8.
- Cooksey, D. A. (1994). "Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria." *FEMS Microbiol Rev* **14**(4): 381-6.

- Corbisier, P. (1997). "Bacterial metal-lux biosensors for a rapid determination of the heavy metal bioavailability and toxicity in solid samples." 534-536.
- Cowan, J. A. (1993). Inorganic Biochemistry: An Introduction. New York, VCH Publishers.
- Cowan, J. A. (1993). "Metallobiochemistry of RNA. Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>(3+) as a probe for Mg<sup>2+</sup>(aq) binding sites." *J Inorg Biochem* **49**(3): 171-5.

## D

- daCosta, C. J. and Baenziger, J. E. (2003). "A rapid method for assessing lipid:protein and detergent:protein ratios in membrane-protein crystallization." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 1): 77-83.
- Dameron, C. T. and Harrison, M. D. (1998). "Mechanisms for protection against copper toxicity." *Am J Clin Nutr* **67**(5 Suppl): 1091S-1097S.
- Daniele, P. G., Prenesti, E. and Ostacoli, G. (1996). "Ultraviolet-circular dichroism spectra for structural analysis of copper(II) complexes with aliphatic and aromatic ligands in aqueous solution." *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 3269-3275
- Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H. and Jones, K. M. (1986). Data for Biochemical Research. Oxford, U.K., Clarendon.
- Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (2003). "Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease." *Science* **302**(5646): 819-22.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995). "NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." *J. Biomol. NMR* **6**: 277-293.
- Diels, L., De Smet, M., Hooyberghs, L. and Corbisier, P. (1999). "Heavy metals bioremediation of soil." *Mol Biotechnol* **12**(2): 149-58.
- Diels, L., Dong, Q., van der Lelie, D., Baeyens, W. and Mergeay, M. (1995). "The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals." *J Ind Microbiol* **14**(2): 142-53.
- Diels, L., Sadouk, A. and Mergeay, M. (1989). "Large plasmids governing multiple resistances to heavy metals: a genetic approach." *Toxicol. Environ. Chem.* **23**: 79-89.
- Djoko, K. Y., Xiao, Z., Huffman, D. L. and Wedd, A. G. (2007). "Conserved mechanism of copper binding and transfer. A comparison of the copper-resistance proteins PcoC

from Escherichia coli and CopC from Pseudomonas syringae." *Inorg Chem* **46**(11): 4560-8.

Dong, M., Baggetto, L. G., Falson, P., Le Maire, M. and Penin, F. (1997). "Complete removal and exchange of sodium dodecyl sulfate bound to soluble and membrane proteins and restoration of their activities, using ceramic hydroxyapatite chromatography." *Anal Biochem* **247**(2): 333-41.

Dong, M., Penin, F. and Baggetto, L. G. (1996). "Efficient purification and reconstitution of P-glycoprotein for functional and structural studies." *J Biol Chem* **271**(46): 28875-83.

## E

Eide, D. J. (2001). "Functional genomics and metal metabolism." *Genome Biol* **2**(10): REVIEWS1028.

Elinder, C. G. (1985). Cadmium: uses, occurrences, and intake. Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.

Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M. K., Hughes, C. and Koronakis, V. (2004). "Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps." *Curr Opin Struct Biol* **14**(6): 741-7.

Ettema, T. J., Huynen, M. A., de Vos, W. M. and van der Oost, J. (2003). "TRASH: a novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance." *Trends Biochem Sci* **28**(4): 170-3.

## F

Fawcett, T. G., Bernarducci, E. E., Krogh-Jespersen, K. and Schugar, H. J. (1980) "Charge-Transfer Absorption of Cu(II)-Imidazole and Cu(II)-Imidazole Chromophores." *J. Am. Chem. Soc.* **102**:2598-2604

Francki, K. T., Chang, B. J., Mee, B. J., Collignon, P. J., Susai, V. and Keese, P. K. (2000). "Identification of genes associated with copper tolerance in an adhesion-defective

mutant of *Aeromonas veronii* biovar *sobria*." *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**(2): 115-21.

Franke, S., Grass, G., Rensing, C. and Nies, D. H. (2003). "Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **185**(13): 3804-12.

Frausto da Silva, J. J. R. and Williams, R. J. P. (1991). Copper: extracytoplasmic oxidases and matrix formation: 388-400.

## G

Gaballa, A., Cao, M. and Helmann, J. D. (2003). "Two MerR homologues that affect copper induction of the *Bacillus subtilis* *copZA* operon." *Microbiology* **149**(Pt 12): 3413-21.

Gaggelli, E., Kozłowski, H., Valensin, D. and Valensin, G. (2006). "Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis)." *Chem Rev* **106**(6): 1995-2044.

Garcia-Dominguez, M., Lopez-Maury, L., Florencio, F. J. and Reyes, J. C. (2000). "A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *J Bacteriol* **182**(6): 1507-14.

Garnett, A. P. and Viles, J. H. (2003). "Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism." *J Biol Chem* **278**(9): 6795-802.

Gatti, D., Mitra, B. and Rosen, B. P. (2000). "*Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases." *J Biol Chem* **275**(44): 34009-12.

Geerlof, A., Brown, J., Coutard, B., Egloff, M. P., Enguita, F. J., Fogg, M. J., Gilbert, R. J., Groves, M. R., Haouz, A., Nettleship, J. E., Nordlund, P., Owens, R. J., Ruff, M., Sainsbury, S., Svergun, D. I. and Wilmanns, M. (2006). "The impact of protein characterization in structural proteomics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 10): 1125-36.

Giese, A., Levin, J., Bertsch, U. and Kretzschmar, H. (2004). "Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein." *Biochem Biophys Res Commun* **320**(4): 1240-6.



- Goldberg, M., Pribyl, T., Juhnke, S. and Nies, D. H. (1999). "Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family." *J Biol Chem* **274**(37): 26065-70.
- Gonen, T., Sliz, P., Kistler, J., Cheng, Y. and Walz, T. (2004). "Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore." *Nature* **429**(6988): 193-7.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H. and Rensing, C. (2001). "ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in Escherichia coli." *J Bacteriol* **183**(15): 4664-7.
- Grass, G. and Rensing, C. (2001). "CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in Escherichia coli." *Biochem Biophys Res Commun* **286**(5): 902-8.
- Grass, G., Thakali, K., Klebba, P. E., Thieme, D., Muller, A., Wildner, G. F. and Rensing, C. (2004). "Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in Escherichia coli." *J Bacteriol* **186**(17): 5826-33.
- Grill, E. (1987). "Phytochelatin, the heavy metal binding peptides of plants: characterization and sequence determination." *Experientia Suppl* **52**: 317-22.
- Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H. (1987). "Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(2): 439-443.
- Grosse, C., Anton, A., Hoffmann, T., Franke, S., Schleuder, G. and Nies, D. H. (2004). "Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*." *Arch Microbiol* **182**(2-3): 109-18.
- Grosse, C., Grass, G., Anton, A., Franke, S., Navarrete Santos, A., Lawley, B., Brown, N. I. and Nies, D. H. (1999). "Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*." *Journal of Bacteriology* **191**(8): 2385-2393.

## H

- Haire, L. F., Whyte, S. M., Vasisht, N., Gill, A. C., Verma, C., Dodson, E. J., Dodson, G. G. and Bayley, P. M. (2004). "The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein." *J Mol Biol* **336**(5): 1175-83.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." *Methods Enzymol* **186**: 1-85.
- Hamza, I., Klomp, L. W., Gaedigk, R., White, R. A. and Gitlin, J. D. (2000). "Structure, expression, and chromosomal localization of the mouse Atox1 gene." *Genomics* **63**(2): 294-7.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* **297**(5580): 353-6.
- Hellman, N. E. and Gitlin, J. D. (2002). "Ceruloplasmin metabolism and function." *Annu Rev Nutr* **22**: 439-58.
- Hjerten, S., Sparrman, M. and Liao, J. (1988). "Purification of membrane proteins in SDS and subsequent renaturation." *Biochim Biophys Acta* **939**(3): 476-84.
- Holm, R. H., Kennepohl, P. and Solomon, E. I. (1996). "Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology." *Chem Rev* **96**(7): 2239-2314.
- Horitsu, H., Yamamoto, K., Wachi, S., Kawai, K. and Fukuchi, A. (1986). "Plasmid-determined cadmium resistance in *Pseudomonas putida* GAM-1 isolated from soil." *J Bacteriol* **165**(1): 334-5.

## I

- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.

J

- Jelesarov, I. and Bosshard, H. R. (1999). "Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition." *J Mol Recognit* **12**(1): 3-18.
- Jensen, L. T., Howard, W. R., Strain, J. J., Winge, D. R. and Culotta, V. C. (1996). "Enhanced effectiveness of copper ion buffering by CUP1 metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **271**(31): 18514-9.
- Johnson, B. A. and Blevins, R. A. (1994). "NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data." *J. Biomol. NMR* **4**: 603-614.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. and Johnson, M. K. (2005). "Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters." *Annu Rev Biochem* **74**: 247-81.
- Jones, C. E., Klewpatinond, M., Abdelraheim, S. R., Brown, D. R. and Viles, J. H. (2005). "Probing copper<sup>2+</sup> binding to the prion protein using diamagnetic nickel<sup>2+</sup> and <sup>1</sup>H NMR: the unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper<sup>2+</sup> ions at physiological concentrations." *J Mol Biol* **346**(5): 1393-407.

K

- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." *Nature* **392**(6676): 605-8.
- Kittleson, J. T., Loftin, I. R., Hausrath, A. C., Engelhardt, K. P., Rensing, C. and McEvoy, M. M. (2006). "Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI." *Biochemistry* **45**(37): 11096-102.
- Koay, M., Zhang, L., Yang, B., Maher, M. J., Xiao, Z. and Wedd, A. G. (2005). "CopC protein from *Pseudomonas syringae*: intermolecular transfer of copper from both the copper(I) and copper(II) sites." *Inorg Chem* **44**(15): 5203-5.
- Kohler, T., Pechere, J. C. and Plesiat, P. (1999). "Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance." *Cell Mol Life Sci* **56**(9-10): 771-8.

- Korndorfer, I. P. and Skerra, A. (2002). "Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site." *Protein Sci* **11**(4): 883-93.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. and Hughes, C. (2000). "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export." *Nature* **405**(6789): 914-9.

£

- Lacapere, J. J., Pebay-Peyroula, E., Neumann, J. M. and Etchebest, C. (2007). "Determining membrane protein structures: still a challenge!" *Trends Biochem Sci* **32**(6): 259-70.
- Ladbury, J. E. and Doyle, M. L. (2004). Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences. Chichester, U.K., John Wiley and Sons, Ltd.
- Lane, T. W., Saito, M. A., George, G. N., Pickering, I. J., Prince, R. C. and Morel, F. M. (2005). "Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom." *Nature* **435**(7038): 42.
- Lau, S. J., Kruck, T. P. and Sarkar, B. (1974). "A peptide molecule mimicking the copper(II) transport site of human serum albumin. A comparative study between the synthetic site and albumin." *J Biol Chem* **249**(18): 5878-84.
- le Maire, M., Champeil, P. and Moller, J. V. (2000). "Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents." *Biochim Biophys Acta* **1508**(1-2): 86-111.
- Leavitt, S. and Freire, E. (2001). "Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry." *Curr Opin Struct Biol* **11**(5): 560-6.
- Leslie, R. A. (2002). *Trends Neurosci.* **25**: 232.
- Li, X., Wei, Z., Zhang, M., Peng, X., Yu, G., Teng, M. and Gong, W. (2007). "Crystal structures of E. coli laccase CueO at different copper concentrations." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(1): 21-6.
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D. J. and Rea, P. A. (1997). "A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1): 42-7.

- Linder, M. C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R. and Lomeli, N. (1998). "Copper transport." *Am J Clin Nutr* **67**(5 Suppl): 965S-971S.
- Lippard, S. J. (1999). "Free copper ions in the cell?" *Science* **284**(5415): 748-749.
- Loftin, I. R., Franke, S., Roberts, S. A., Weichsel, A., Heroux, A., Montfort, W. R., Rensing, C. and McEvoy, M. M. (2005). "A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF." *Biochemistry* **44**(31): 10533-40.
- Lopez Garcia, F., Zahn, R., Riek, R. and Wuthrich, K. (2000). "NMR structure of the bovine prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8334-9.
- Luczkowski, M., Kozłowski, H., Legowska, A., Rolka, K. and Remelli, M. (2003). "The possible role of Gly residues in the prion octarepeat region in the coordination of the Cu<sup>2+</sup> ions." *The Royal Society of Chemistry Dalton Trans.*: 619-624.
- Luczkowski, M., Kozłowski, H., Stawikowski, M., Rolka, K., Gaggelli, E., Valensin, D. and Valensin, G. (2002). "Is the monomeric prion octapeptide repeat PHGGGWGQ a specific ligand for Cu<sup>2+</sup> ions?" *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*: 2269-2274.
- Lund, P. A., Ford, S. J. and Brown, N. L. (1986). "Transcriptional regulation of the mercury-resistance genes of transposon Tn501." *J Gen Microbiol* **132**(2): 465-80.
- Lutsenko, S. and Petris, M. J. (2002). "Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biological approaches." *J. Membrane Biol.* **191**: 1-12.
- Lutsenko, S. and Petris, M. J. (2003). "Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biological approaches." *J Membr Biol* **191**(1): 1-12.

## M

- Macomber, L., Rensing, C. and Imlay, J. A. (2007). "Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in Escherichia coli." *J Bacteriol* **189**(5): 1616-26.
- Magnani, D. and Solioz, M. (2005). "Copper chaperone cycling and degradation in the regulation of the cop operon of Enterococcus hirae." *Biometals* **18**(4): 407-12.
- Magnani, D. and Solioz, M. (2007). "How bacteria handle copper." *Microbiol. Monogr.*

- Martell, A. E., Smith, R. M. and Motekaitis, R. J. (2004). Database 46: NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, version 8.0 For Windows.
- Mellano, M. A. and Cooksey, D. A. (1988). "Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*." *J Bacteriol* **170**(9): 4399-401.
- Mellano, M. A. and Cooksey, D. A. (1988). "Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato." *J Bacteriol* **170**(6): 2879-83.
- Meloni, G., Faller, P. and Vasak, M. (2007). "Redox silencing of copper in metal-linked neurodegenerative disorders: reaction of Zn7metallothionein-3 with Cu<sup>2+</sup> ions." *J Biol Chem*.
- Mercer, J. F., Livingston, J., Hall, B., Paynter, J. A., Begy, C., Chandrasekharappa, S., Lockhart, P., Grimes, A., Bhave, M., Siemieniak, D. and et al. (1993). "Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning." *Nat Genet* **3**(1): 20-5.
- Mergeay, M. (2000). Bacteria adapted to industrial biotopes: metal-resistant bacteria *Ralstonia* in bacterial stress response. eds. Washington D.C., G. a. H.-A. S. ASM press, R.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D. and Wattiez, R. (2003). "*Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes." *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 385-410.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P. and Van Gijsegem, F. (1985). "*Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals." *J Bacteriol* **162**(1): 328-34.
- Mills, S. D., Lim, C. K. and Cooksey, D. A. (1994). "Purification and characterization of CopR, a transcriptional activator protein that binds to a conserved domain (cop box) in copper-inducible promoters of *Pseudomonas syringae*." *Mol Gen Genet* **244**(4): 341-51.
- Miroux, B. and Walker, J. E. (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." *J Mol Biol* **260**(3): 289-98.
- Miura, T., Hori-i, A., Mototani, H. and Takeuchi, H. (1999). "Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence." *Biochemistry* **38**(35): 11560-9.

- Monchy, S., Benotmane, M. A., Wattiez, R., van Aelst, S., Auquier, V., Borremans, B., Mergeay, M., Taghavi, S., van der Lelie, D. and Vallaey, T. (2006). "Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34." *Microbiology* **152**(Pt 6): 1765-76.
- Montserret, R., McLeish, M. J., Bockmann, A., Geourjon, C. and Penin, F. (2000). "Involvement of electrostatic interactions in the mechanism of peptide folding induced by sodium dodecyl sulfate binding." *Biochemistry* **39**(29): 8362-73.
- Morris, P. J. and Martin, R. B. (1971). "Dipeptide complexes of cobalt(II) and cobalt(III)." *Inorg Chem* **10**(5): 964-968.
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W. and O'Halloran, T. V. (2000). "Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* **182**(20): 5864-71.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. and Yamaguchi, A. (2006). "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism." *Nature* **443**(7108): 173-9.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. and Yamaguchi, A. (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." *Nature* **419**(6907): 587-93.
- Murakami, S. and Yamaguchi, A. (2003). "Multidrug-exporting secondary transporters." *Curr Opin Struct Biol* **13**(4): 443-52.

## N

- Nelson, N. (1999). "Metal ion transporters and homeostasis." *Embo J* **18**(16): 4361-71.
- Nies, D. H. (1999). "Microbial heavy-metal resistance." *Appl Microbiol Biotechnol* **51**(6): 730-50.
- Nies, D. H. (2000). "Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34." *Extremophiles* **4**(2): 77-82.
- Nies, D. H. (2003). "Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes." *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 313-39.
- Nies, D. H., Nies, A., Chu, L. and Silver, S. (1989). "Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(19): 7351-5.

Nikaido, H. (1996). "Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria." *J Bacteriol* **178**(20): 5853-9.

Nishina, K., Jenks, S. and Supattapone, S. (2004). "Ionic strength and transition metals control PrPSc protease resistance and conversion-inducing activity." *J Biol Chem* **279**(39): 40788-94.

## O

O'Halloran, T. V. and Culotta, V. C. (2000). "Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions." *J Biol Chem* **275**(33): 25057-60.

Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R. and Solioz, M. (1992). "An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*." *Ann N Y Acad Sci* **671**: 484-6.

Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R. and Solioz, M. (1993). "Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*." *J Biol Chem* **268**: 12775-12779.

Opazo, C., Barria, M. I., Ruiz, F. H. and Inestrosa, N. C. (2003). "Copper reduction by copper binding proteins and its relation to neurodegenerative diseases." *Biometals* **16**(1): 91-8.

Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A. and O'Halloran, T. V. (2001). "The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **276**(33): 30670-7.

Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J. and O'Halloran, T. V. (2000). "Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR." *J Biol Chem* **275**(40): 31024-9.

## P

Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P. and Salemme, F. R. (2001). "High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery." *J. Biomol. Screen.* **6**(6): 429-440.



- Park, H., Song, B. and Morel, F. M. (2007). "Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters." *Environ Microbiol* **9**(2): 403-13.
- Pearson, C. A. and Prozialeck, W. C. (2001). "E-Cadherin, beta -Catenin and cadmium carcinogenesis." *Med Hypotheses* **56**(5): 573-81.
- Pearson, R. G. (1963). "Hard and soft acids and bases." *Journal of the American Society* **85**(22): 3533-3539.
- Peisach, J. et Blumberg, W. E. (1974). "Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper protéins." *Arch Biochem Biophys* **165**(2):691-708.
- Pena, M. M., Lee, J. and Thiele, D. J. (1999). "A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution." *J Nutr* **129**(7): 1251-60.
- Petris, M. J., Mercer, J. F., Culvenor, J. G., Lockhart, P., Gleeson, P. A. and Camakaris, J. (1996). "Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking." *Embo J* **15**(22): 6084-95.
- Pos, K. M., Schiefner, A., Seeger, M. A. and Diederichs, K. (2004). "Crystallographic analysis of AcrB." *FEBS Lett* **564**(3): 333-9.
- Presta, A. and Stillman, M. J. (1997). "Incorporation of copper into the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of Cu(I)--metallothionein in intact yeast cells." *J Inorg Biochem* **66**(4): 231-40.
- Prusiner, S. B. (1998). "Prions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13363-83.
- Puig, S. and Thiele, D. J. (2002). "Molecular mechanisms of copper uptake and distribution." *Curr Opin Chem Biol* **6**(2): 171-80.

## R

- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. and O'Halloran, T. V. (1999). "Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase." *Science* **284**(5415): 805-8.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B. and Rosen, B. P. (2000). "CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 652-6.

- Rensing, C. and Grass, G. (2003). "Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment." *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 197-213.
- Rensing, C., Pribyl, T. and Nies, D. H. (1997). "New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter." *J Bacteriol* **179**(22): 6871-9.
- Rigaud, J. L. (2002). "Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals." *Braz J Med Biol Res* **35**(7): 753-66.
- Roberts, S. A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J. T., Tollin, G., Rensing, C. and Montfort, W. R. (2002). "Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2766-71.
- Robinson, N. J., Whitehall, S. K. and Cavet, J. S. (2001). "Microbial metallothioneins." *Adv Microb Physiol* **44**: 183-213.
- Rodriguez-Montelongo, L., Volentini, S. I., Farias, R. N., Massa, E. M. and Rapisarda, V. A. (2006). "The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of Escherichia coli improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide." *Arch Biochem Biophys* **451**(1): 1-7.
- Rooney, J. P. (2007). "The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury." *Toxicology* **234**(3): 145-56.
- Rouch, D., Camakaris, J., Lee, B. T. and Luke, R. K. (1985). "Inducible plasmid-mediated copper resistance in Escherichia coli." *J Gen Microbiol* **131**(4): 939-43.
- Rouch, D. A. and Brown, N. L. (1997). "Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the Escherichia coli copper resistance determinant pco." *Microbiology* **143** ( Pt 4): 1191-202.
- Rouch, D. A., Lee, B. T. and Morby, A. P. (1995). "Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance." *J Ind Microbiol* **14**(2): 132-41.
- Ruiz, N., Kahne, D. and Silhavy, T. J. (2006). "Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis." *Nat Rev Microbiol* **4**: 57-66.

S

- Saha, S. K. and Brewer, C. F. (1994). "Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method." *Carbohydr Res* **254**: 157-67.
- Saier, M. H., Jr., Tam, R., Reizer, A. and Reizer, J. (1994). "Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport." *Mol Microbiol* **11**(5): 841-7.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. and Boucher, C. A. (2002). "Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*." *Nature* **415**(6871): 497-502.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. New York, Col Spring Harbor Laboratory Press.
- Sankaramakrishnan, R., Verma, S. and Kumar, S. (2005). "ATCUN-like metal-binding motifs in proteins: identification and characterization by crystal structure and sequence analysis." *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **58**: 211-221.
- Sarkar, B. (1995). "Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and its relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation." *Nutrition* **11**(5 Suppl): 646-9.
- Sarkar, B. and Wigfield, Y. (1968). "Evidence for albumin--cu(II)--amino acid ternary complex." *Can J Biochem* **46**(6): 601-7.
- Savolainen, H. (1996). "Biochemical and clinical aspects of nickel toxicity." *Rev Environ Health* **11**: 167-173.
- Schanda, P., Forge, V. and Brutscher, B. (2006). "HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains." *Magn. Reson. Chem.* **45**(14): 5510-5520.
- Schuck, P. (2000). "Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling." *Biophys J* **78**(3): 1606-19.
- Schuldiner, S. (2006). "Structural biology: the ins and outs of drug transport." *Nature* **443**(7108): 156-7.

- Seeger, M. A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K. and Pos, K. M. (2006). "Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism." *Science* **313**(5791): 1295-8.
- Sendra, V., Cannella, D., Bersch, B., Fieschi, F., Menage, S., Lascoux, D. and Coves, J. (2006). "CopH from *Cupriavidus metallidurans* CH34. A novel periplasmic copper-binding protein." *Biochemistry* **45**(17): 5557-66.
- Sigel, H. and Martin, R. B. (1982). "Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands." *Chem. Rev.* **82**: 385-426.
- Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C. and Montfort, W. R. (2004). "Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **186**(22): 7815-7.
- Solioz, M. and Vulpe, C. (1996). "CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals." *Trends Biochem Sci* **21**(7): 237-41.
- Solomon, E. I. (2006). "Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry: blue to green to red copper sites." *Inorg Chem* **45**(20): 8012-25.
- Solomon, E. I., Szilagy, R. K., DeBeer George, S. and Basumallick, L. (2004). "Electronic structures of metal sites in proteins and models: contributions to function in blue copper proteins." *Chem Rev* **104**(2): 419-58.
- Stockel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). "Prion protein selectively binds copper(II) ions." *Biochemistry* **37**(20): 7185-93.
- Stoyanov, J. V., Magnani, D. and Solioz, M. (2003). "Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **546**(2-3): 391-4.
- Stroebel, D., Sendra, V., Cannella, D., Helbig, K., Nies, D. H. and Coves, J. (2007). "Oligomeric behavior of the RND transporters CusA and AcrB in micellar solution of detergent." *Biochim Biophys Acta*.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* **189**(1): 113-130.
- Sundberg, R. J. and Martin, R. B. (1974). "Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems." *Chem Rev* **74**(4): 471-517.

T

- Taghavi, S., Mergeay, M., Nies, D. and van der Lelie, D. (1997). "Alcaligenes eutrophus as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment." *Res Microbiol* **148**(6): 536-51.
- Taghavi, S., Mergeay, M. and van der Lelie, D. (1997). "Genetic and physical maps of the Alcaligenes eutrophus CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality." *Plasmid* **37**(1): 22-34.
- Tanzi, R. E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J. L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D. M., Parano, E., Pavone, L., Brzustowicz, L. M. and et al. (1993). "The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene." *Nat Genet* **5**(4): 344-50.
- Tapia, L., Gonzalez-Aguero, M., Cisternas, M. F., Suazo, M., Cambiazo, V., Uauy, R. and Gonzalez, M. (2004). "Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels." *Biochem J* **378**(Pt 2): 617-24.
- Terada, K., Aiba, N., Yang, X. L., Iida, M., Nakai, M., Miura, N. and Sugiyama, T. (1999). "Biliary excretion of copper in LEC rat after introduction of copper transporting P-type ATPase, ATP7B." *FEBS Lett* **448**(1): 53-6.
- Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L. and van der Lelie, D. (2001). "A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants." *Environ Pollut* **113**(1): 19-26.
- Tikhonova, E. B. and Zgurskaya, H. I. (2004). "AcrA, AcrB, and TolC of Escherichia coli Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex." *J Biol Chem* **279**(31): 32116-24.
- Tricot, C., van Aelst, S., Wattiez, R., Mergeay, M., Stalon, V. and Wouters, J. (2005). "Overexpression, purification, crystallization and crystallographic analysis of CopK of Cupriavidus metallidurans." *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**(Pt 9): 825-7.
- Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A. and Saier, M. H., Jr. (1999). "The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins." *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**(1): 107-25.

- Tsenkova, R. N., Iordanova, I. K., Toyoda, K. and Brown, D. R. (2004). "Prion protein fate governed by metal binding." *Biochem Biophys Res Commun* **325**(3): 1005-12.
- Turnbull, S., Tabner, B. J., Brown, D. R. and Allsop, D. (2003). "Copper-dependent generation of hydrogen peroxide from the toxic prion protein fragment PrP106-126." *Neurosci Lett* **336**(3): 159-62.

## V

- Valls, M. and de Lorenzo, V. (2002). "Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution." *FEMS Microbiol Rev* **26**(4): 327-38.
- van der Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Baeyens, W., Mergeay, M. and Nies, D. H. (1997). "Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*." *Mol Microbiol* **23**(3): 493-503.
- Van Doorslaer, S., Cereghetti, G. M., Glockshuber, R. and Schweiger, A. (2001). "Unraveling the Cu<sup>2+</sup> binding sites in the C-terminal domain of the murine Prion protein: a pulse EPR and ENDOR study." *J. Phys. Chem. B* **105**: 1631-1639.
- Viles, J. H., Donne, D., Kroon, G., Prusiner, S. B., Cohen, F. E., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (2001). "Local structural plasticity of the prion protein. Analysis of NMR relaxation dynamics." *Biochemistry* **40**(9): 2743-53.
- Voloudakis, A. E., Reignier, T. M. and Cooksey, D. A. (2005). "Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*." *Appl Environ Microbiol* **71**(2): 782-9.
- Voss, S. and Skerra, A. (1997). "Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification." *Protein Eng* **10**(8): 975-82.

## W

- Wang, Y. and Kim, K. S. (2002). "Role of OmpA and IdeB in Escherichia coli K1 invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo." *Pediatr Res* **51**: 559-563.
- Williams, R. J. P. and Frausto da Silva, J. J. R. (2006). The Chemistry of Evolution: The Development of Our Ecosystem.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. and Lin, L. N. (1989). "Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter." *Anal Biochem* **179**(1): 131-7.

## X

- Xiang, J., Fan, J. B., Chen, N., Chen, J. and Liang, Y. (2006). "Interaction of cellulase with sodium dodecyl sulfate at critical micelle concentration level." *Colloids Surf B Biointerfaces* **49**(2): 175-80.

## Y

- Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2005). "Transcriptional response of Escherichia coli to external copper." *Mol Microbiol* **56**(1): 215-27.
- Yatsunyk, L. A. and Rosenzweig, A. C. (2007). "Cu(I) binding and transfer by the N terminus of the Wilson disease protein." *J Biol Chem* **282**(12): 8622-31.

## Z

- Zacharias, P. S. and Ramachandraiah, A. (1985). "Identification of Cu(II)/Cu(III) couples in binuclear copper(II) complexes." *Polyhedron* **4**(6): 1013-1017.
- Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H. (2000). "Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes." *Mol Microbiol* **37**(2): 219-25.

- Zhang, L., Koay, M., Maher, M. J., Xiao, Z. and Wedd, A. G. (2006). "Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms." *J Am Chem Soc* **128**(17): 5834-50.
- Zhang, Y. and Wilcox, D. E. (2002). "Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin." *J Biol Inorg Chem* **7**(3): 327-37.
- Zhong, L. and Johnson, W. C., Jr. (1992). "Environment affects amino acid preference for secondary structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4462-5.
- Zoropogui, A., Gambarelli, S. and Coves, J. (soumis). "Which kind of metal-binding protein is CzcE from *Cupriavidus metallidurans* CH34?" *FEBS Lett*.
- Zouni, A., Kern, J., Frank, J., Hellweg, T., Behlke, J., Saenger, W. and Irrgang, K. D. (2005). "Size determination of cyanobacterial and higher plant photosystem II by gel permeation chromatography, light scattering, and ultracentrifugation." *Biochemistry* **44**(11): 4572-81.

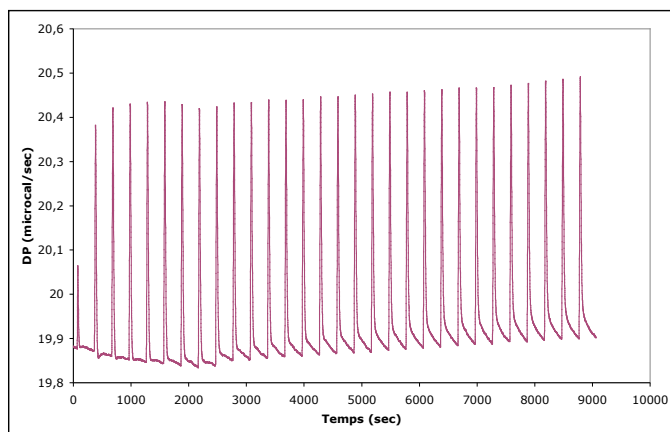


# *Annexes*

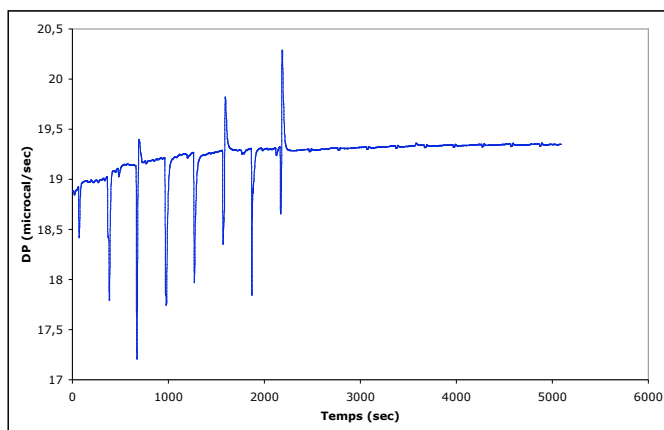


## Annexe

### Microcalorimétrie : mise au point du choix du tampon



**Figure 1** : Ajout de  $\text{CuCl}_2$  dissout dans l'eau dans du MOPS 20 mM pH = 7,5



**Figure 2** : Ajout de  $\text{CuCl}_2$  dissout dans MOPS 20 mM pH = 7,5 dans CopH 100  $\mu\text{M}$  dans MOPS 20 mM pH = 7,5



## CopH from *Cupriavidus metallidurans* CH34. A Novel Periplasmic Copper-Binding Protein

Véronique Sendra,<sup>†,‡</sup> Dominique Cannella,<sup>‡</sup> Beate Bersch,<sup>§</sup> Franck Fieschi,<sup>‡</sup> Stéphane Ménage,<sup>||</sup> David Lascoux,<sup>⊥</sup> and Jacques Covès<sup>\*,‡</sup>

Laboratoire des Protéines Membranaires, Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire, and Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines, Institut de Biologie Structurale-Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France, and Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Rédox Biologiques, CEA-Grenoble, DBMS/CB, UMR 5047 CNRS-CEA-UJF, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

Received February 16, 2006; Revised Manuscript Received March 10, 2006

**ABSTRACT:** The *copH* gene is one of the 19 open reading frames (ORFs) found in the *cop* cluster borne by the large plasmid pMol30 in *Cupriavidus metallidurans* CH34. The entire cluster is involved in detoxification of copper from the cytoplasm as well as from the periplasm. The function of the corresponding protein, CopH, is not yet clear, but it seems to be involved in the late response phase. We have cloned *copH* and overproduced and purified the corresponding protein. CopH is rather unique as only one paralog can be found in the databases. It is a dimeric protein with a molecular mass of 13 200 Da per subunit and located in the periplasm. The metal binding properties of CopH were examined by using a series of techniques such as UV–visible spectroscopy, circular dichroism (CD), electron paramagnetic resonance (EPR), surface plasmon resonance (SPR), mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance (NMR). All together, the corresponding data are consistent with a dimeric protein containing one metal-binding site per subunit. These sites have a high affinity for Cu(II) but can also bind zinc or nickel. CopH does not contain any cysteines or methionines but contains two histidines. EPR and UV–visible features are consistent with the presence of Cu(II) type 2 centers in a nitrogen ligand field. SPR data confirm the involvement of the histidine residues in copper binding. CD and NMR data reveal that CopH is partially unfolded.

Because copper is both an essential element for living organisms and a redox-active transition metal, a strict control of its intracellular concentration is required to regulate homeostasis and to manage conditions of copper excess (1, and references therein). Genetic determinants for copper homeostasis and resistance exist in a variety of organisms. They include the *pcoABCDpcoRSpcoE* and *copABCDcopRS* loci found in an *Escherichia coli* strain isolated from feces of copper-fed pigs and in the *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* isolated from crop vegetables subjected to copper-based antifungal treatments, respectively (2–5). The involvement in copper homeostasis of the different elements of the *cop* clusters is relatively well understood for these Gram-negative strains (1). For Gram-positive strains, a detailed literature exists for the *copYZAB* operon responsible for copper homeostasis in *Enterococcus hirae* (6).

In *Cupriavidus metallidurans* CH34 (formerly *Ralstonia metallidurans* CH34), a facultative autotrophic Gram-negative microorganism characteristic of metal-contaminated biotopes (7, 8), a high level of complexity is reached (9). *C. metallidurans* CH34 is exceptionally well equipped to resist high copper concentrations. It contains two clusters related to the *pcoABCDpcoRSpcoE* and *copABCDcopRS* loci. These two clusters have the divergent organization *copSRcopABCD* also found in the related plant pathogen *Ralstonia solanacearum* (10). One cluster is located on a megaplasmid, and the second is found on the pMol30 plasmid as part of a large cluster that consists of 19 genes according to a recent reassessment (11). Transcriptomic and proteomic data demonstrated that all of the 19 ORFs<sup>1</sup> (*orfV copT orfM copK orfN copSR copABCDI copJGF copL orfQ copH orfE*) of the pMol30 *cop* cluster are differentially expressed when the cells are faced with copper stress (11). It has been found that the expression of the individual *cop* genes depends on both Cu(II) concentration and exposure time. A better understanding of the role and the structure of the 19 individual products of the genes constituting the *cop* cluster

<sup>†</sup> V.S. is a Ph.D. fellow of the French National Program of Environmental Nuclear Toxicology.

\* To whom correspondence should be addressed. Telephone: 33-(0)4-38-78-24-03. Fax: 33-(0)4-38-78-54-94. E-mail: jacques.coves@ibs.fr.

<sup>‡</sup> Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale-Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF.

<sup>§</sup> Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire, Institut de Biologie Structurale-Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF.

<sup>||</sup> CEA-Grenoble, DBMS/CB, UMR 5047 CNRS-CEA-UJF.

<sup>⊥</sup> Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines, Institut de Biologie Structurale-Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF.

<sup>1</sup> Abbreviations: CD, circular dichroism; EPR, electron paramagnetic resonance; HET-SOFAST HMQC, heterogeneity band-selective optimized-flip-angle short-transient heteronuclear multiple-quantum correlation; HSQC, heteronuclear single-quantum coherence; NMR, nuclear magnetic resonance; ORF, open reading frame; SPR, surface plasmon resonance.

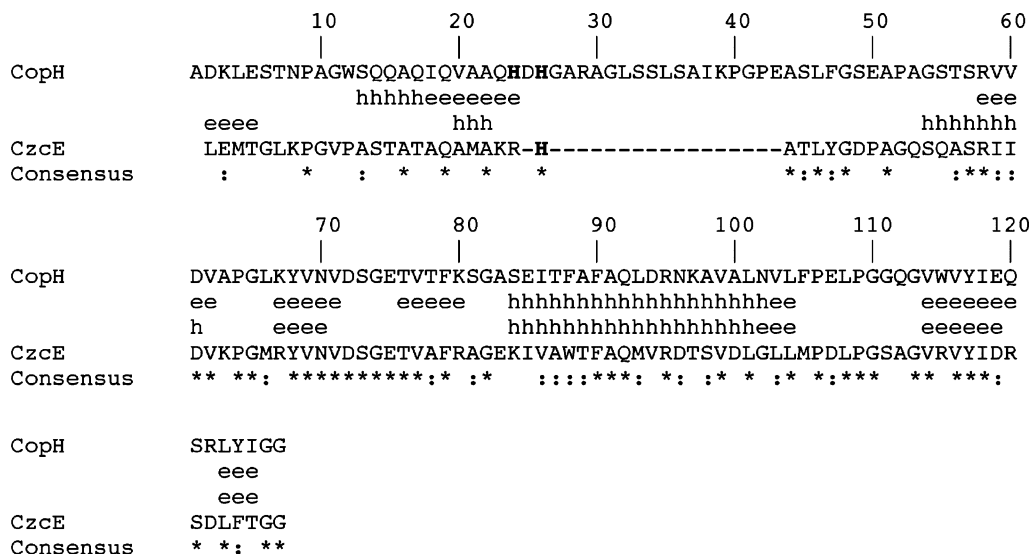


FIGURE 1: Sequence alignment of CopH and CzcE and secondary structure predictions. Asterisks denote identical amino acids, and similarities are identified with colons. Histidines are bold. Secondary structure predictions were obtained by submitting the corresponding sequences to the SOPMA server (19) found in the ExPASy tools (<http://www.expasy.org/tools/>).

is necessary before the question of the interplay of these different actors in the management of copper trafficking can be addressed.

*copH* is probably involved in the late resistance mechanism as its maximum expression (~100-fold mRNA induction for 0.4 mM copper) occurred after 1 h, while all the other genes were optimally induced 30 min after copper exposition (11). In this study, we have overexpressed and characterized CopH, the corresponding protein for which no functional or structural data exist. The only protein found in the databases that is significantly homologous with CopH is CzcE (Figure 1), which is a paralog from *C. metallidurans* CH34. CzcE was identified as a periplasmic metal-binding protein involved in a nonessential metal-dependent induction of the *czc* operon (12), itself essential for survival of *C. metallidurans* CH34 at high cobalt, zinc, or cadmium concentrations. It has been postulated that the role of CzcE should be to sense the periplasmic metal cation concentration and then to trigger, by inhibition of the phosphorylation of the regulatory protein CzcS, a signal transduction chain leading to the control of the cytoplasmic *czcNp* promoter. The only histidine residue present in mature CzcE has been shown to be involved in metal binding.

Here we demonstrate that CopH is a dimeric periplasmic protein able to specifically bind two copper ions per dimer with a high affinity. We also show that the two histidine residues of CopH are both involved in copper binding probably along with carboxylates. These data allow us to speculate about the role of this protein in copper homeostasis.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Construction of the Expression Plasmid and Expression and Purification of the Recombinant CopH Protein.** The DNA fragment expected to encode the CopH protein devoid of signal peptide was amplified by PCR with suitable restriction sites for subcloning in the pET28a expression vector. The sense primer 5'-AAATTTCATGGCTG**CAA**ACTCGAATCCACC contains the nucleotides (in bold) encoding an N-terminal amino acid sequence starting with alanine 27 (ADKLESTNPAG). The overhanging se-

quence includes an NcoI site (underlined) carrying the initiator codon ATG. The antisense primer 5'-TTAAAGCTC-GAGTCAACCGCCGATGTAGAGTCTG was designed to incorporate an XhoI site (underlined) and a stop codon corresponding to the end of the sequence of CopH. The nucleotides (in bold) are complementary of the corresponding coding sequence of CopH. The authenticity of the DNA insert generated by PCR was confirmed by sequencing. The resulting pET-CopH expression plasmid was used to transform the T7 RNA polymerase-containing host *E. coli* BL21-(DE3). Transformed bacteria from a glycerol stock were grown overnight in 50 mL of LB medium supplemented with kanamycin (50  $\mu$ g/mL). Then, 1 L of the same medium was inoculated with the overnight preculture. CopH expression was induced at an absorbance of 0.8 at 600 nm by addition of 0.25 mM isopropyl thio- $\beta$ -galactopyranoside (IPTG). Cells were then grown overnight at 20  $^{\circ}$ C before being harvested by centrifugation. All subsequent steps were performed at 4  $^{\circ}$ C. The cell pellet was suspended in a buffer composed of 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, a small amount of DNase I, and an antiprotease cocktail (Complete, Roche, 1 tablet/50 mL) and lysed by sonic oscillation. The total protein extract was recovered by centrifugation for 90 min at 45 000 rpm in a TI 70 rotor (Beckman) and used for further purification. Residual nucleic acids were eliminated by 2% streptomycin sulfate precipitation. Ammonium sulfate was then used to precipitate soluble proteins, and CopH was found in the pellet obtained at a 50% final saturation. For standard experiments, precipitated proteins were dissolved in a minimal volume of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) (buffer A). The protein solution was subjected to filtration on a Superdex-75 column (Amersham-Pharmacia Biotech) previously equilibrated with the same buffer. Elution was carried out at 0.8 mL/min, and 1 mL fractions were collected. Fractions were assayed for protein (absorbance at 280 nm) and for the presence of CopH (SDS-PAGE analysis). CopH-containing fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration using a Diaflo cell equipped with a YM-3 membrane (Amicon Co.) and Centricon-3 microconcentrators. At this stage, CopH was electrophoretically pure and stored at

−80 °C for further use. The yield for a typical purification procedure is more than 150 mg of pure CopH from 1 L of LB medium. When necessary, Tris buffer was exchanged for another buffer by extensive dialysis.

Protein concentrations were determined using bovine serum albumin as a standard and the Micro BCA protein assay (Pierce). The denatured molecular mass of CopH was estimated by 0.1% SDS–15% polyacrylamide gel electrophoresis (13), and its native molecular mass was ascertained by elution of a calibrated Superdex-75 filtration column and comparison with the elution volume of chymotrypsinogen A (25 kDa) and ribonuclease A (13.7 kDa).

For the NMR experiments, CopH was purified in the same way after bacteria were grown at 37 °C in M9 minimal mineral medium with glucose (4 g/L) as the carbon source and supplemented with MnCl<sub>2</sub> (0.1 mM), ZnSO<sub>4</sub> (0.05 mM), FeCl<sub>3</sub> (0.05 mM), and a vitamin solution according to the method of Jansson et al. (14). Isotopically labeled protein was prepared by growing the cells with <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (1 g/L) as the sole nitrogen source.

**Immobilized Metal Affinity Chromatography.** A 1 mL chromatography column was packed with Ni–NTA superflow resin (Qiagen), extensively washed with water, and equilibrated with buffer A. CopH (300 μg) was applied to the gel, and the column was washed with 10 mL of buffer A supplemented with 200 mM NaCl. Protein was then eluted with 3 mL of buffer A supplemented with 10 mM EDTA. Fractions (500 μL) were collected and analyzed by SDS–PAGE. After a new extensive washing step with water, the gel was loaded with 3 mL of a 250 mM solution of various other metals (CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, or MnCl<sub>2</sub>), and the full procedure was repeated. The protein CopK (15) that is specific for copper was used as a control.

**Spectroscopic Methods.** UV–visible spectra were recorded at room temperature in a quartz cell with a 10 mm light path using a Cary 50 Bio (Varian) spectrophotometer. The cuvette was filled with 1 mL of 0.5 mM CopH in 50 mM Hepes (pH 7.6). A first spectrum corresponding to the apo form of the protein was recorded. Then, small aliquots of copper were added from a freshly prepared stock solution of CuCl<sub>2</sub> in water. A spectrum was recorded immediately after each addition. The dilution was considered negligible as the titration of the specific metal binding sites was obtained for a total added volume of 10 μL of CuCl<sub>2</sub>.

CD spectra were obtained on a Jobin Yvon CD6 spectropolarimeter operating at room temperature. Cells with a path length of 1 mm were used for recording spectra in the UV region (190–260 nm). To study the influence of pH on the protein conformation, 2 μL of 1.7 mM CopH in 50 mM Tris–HCl (pH 7.5) was added to 300 μL of a solution buffered by mixing the required amounts of acidic and basic potassium phosphate at a final concentration of 20 mM. Under these conditions, the final CopH concentration was 11.3 μM. To record the spectrum of Cu-bound CopH, the protein was first diluted to 11.3 μM directly in water, and a reference spectrum was recorded. Then 3 equiv of Cu was added from a freshly prepared concentrated CuCl<sub>2</sub> stock solution, and a new spectrum was recorded.

X-Band EPR spectra were recorded with a Bruker EMX spectrometer equipped with an ESR 900 helium flow cryostat (Oxford Instruments). The temperature was set to 20 K. Each sample consisted of CopH at a concentration of 170 μM in

Hepes buffer, and the desired amount of CuCl<sub>2</sub> was added. Spectra were recorded as described in the legends of the concerned figures.

NMR spectra were recorded at 298 K on a Varian INOVA 600 spectrometer equipped with a triple-resonance (<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N, and <sup>13</sup>C) probe including shielded z-gradients. The data were processed using NMR Pipe (16), and the spectra were visualized with NMRView (17). Samples were prepared with 0.4 mM CopH in MES buffer (pH 6.7), in the absence and presence of 0.9 mM Cu(II). For a semiquantitative determination of protein compactness, <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HET-SOFAST-HMQC experiments (18) were carried out with and without a band-selective inversion pulse, shifted −3 ppm from the water resonance and covering a bandwidth of 4 ppm. One hundred complex points were recorded in the indirect dimension, resulting in an experimental time of approximately 10 min. The ratio of the peak intensities measured in the two spectra ( $\lambda_{\text{noe}} = I^{\text{sat}}/I^{\text{ref}}$ ) is related to the exposure of the corresponding amide group (18).  $\lambda_{\text{noe}}$  values were determined for the apo form and the Cu(II)-loaded form of CopH.

**Surface Plasmon Resonance.** SPR experiments were performed using a Biacore 1000 upgrade instrument (Biacore) equipped with a nitrilotriacetic acid (NTA) sensor chip. The machine was primed with the running buffer [10 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 50 μM EDTA, and 0.005% surfactant P20], and the NTA chip was loaded with 500 μM NiCl<sub>2</sub> as recommended by the manufacturer. CopH was diluted in the running buffer at the required concentrations reported in the corresponding figures legends. All runs were performed at 20 °C and at a flow rate of 30 μL/min. When necessary, the surface was regenerated by a 15 μL injection of 350 mM EDTA at a flow rate of 5 μL/min. For each CopH concentration, a blank was run in parallel on a surface without metal to subtract unspecific binding. For the pH titration, solutions were buffered with Hepes (pH 7.5–7.0), Pipes (pH 6.8–6.1), or Mes (pH 6.0–5.5).

**Mass Spectrometry Analysis.** Noncovalent (or native) mass spectrometry measurements were performed by using Q-TOF Micro mass spectrometer (Micromass, Manchester, U.K.) equipped with an electrospray ion source. It operated with a needle voltage of 3000 kV and sample cone and extraction cone voltages of 150 and 15 V, respectively. The backing Pirani pressure was set at 10 mbar. The mass spectra were recorded in the 1500–3000 mass-to-charge (*m/z*) range. The sample concentration was 10 μM in 50 mM ammonium acetate (pH 6.9) and continuously infused at a flow rate of 5 μL/min. Data were acquired in the positive mode, and calibration was performed using a solution of 1 μM GFP in an acetonitrile/water/formic acid solution (50/50/0.2). Mass spectra were acquired and data processed with MassLynx version 4.0 (Waters).

## RESULTS

**Overexpression of CopH.** A first expression plasmid was constructed with the full-length coding sequence of the *copH* gene, and the corresponding protein was expressed. The SDS–PAGE analysis showed that the overexpressed protein had a molecular mass lower than the expected one (not shown). Thus, the *copH* gene sequence was analyzed to predict post-translational modifications using the ExPASy



proteomics tools (<http://www.expasy.org/tools/>). A potential signal peptide cleavage site was identified between Ser26 and Ala27, suggesting CopH is a periplasmic protein. Amino-terminal sequencing of the overexpressed protein gave ADKLEST, i.e., a sequence beginning at the predicted cleavage site, thus confirming N-terminal splicing and periplasmic localization of CopH. However, the overexpression yield was poor. To obtain a larger amount of protein, a plasmid containing the DNA fragment encoding a protein without a signal peptide was constructed and CopH was expressed as its mature form in the cytoplasm of *E. coli* BL21(DE3). Maximal overexpression was observed after an overnight culture at 20 °C following addition of IPTG to the growth medium, and CopH was recovered with an excellent yield in the soluble extracts (~25–30% of the total soluble proteins).

**Purification and Characterization of CopH.** Soluble extracts were first fractionated by ammonium sulfate precipitation. CopH was recovered from the pellet obtained at 50% final saturation and was then further purified to apparent homogeneity by gel filtration on preparative Superdex-75. The final yield was ~150 mg of protein per liter of cell culture. Pure CopH was loaded on a calibrated analytical Superdex-75 column, and its elution volume was compared with those of chymotrypsinogen A (25 kDa) and ribonuclease A (13.7 kDa). CopH and chymotrypsinogen A eluted at the same volume (14.5 mL), while ribonuclease A eluted at 16.4 mL (not shown). As the CopH theoretical molecular mass is 13 201.67 Da, we can conclude that this protein is a dimer in solution. The capacity of CopH to bind divalent metal was tested using metal affinity chromatography. When loaded on Cu(II), Zn(II), and Ni(II) columns, CopH was eluted only with buffer containing EDTA (not shown). However, no binding could be observed when using a Co(II) column. As expected, the CopK protein, used as a control because it is specific for copper (15), only bound to the Cu(II) column. This strongly suggests that CopH is a metal-binding protein. As shown in Figure 1, CopH lacks any cysteines and methionines but contains two histidines that can be suspected to be involved in metal binding along with carboxylates.

**Analyses of the Metal Binding Capacities of CopH.** Mass spectrometry under nondenaturing conditions was used to address the metal binding capacities of CopH. The protein was diluted to 10  $\mu$ M in ammonium acetate buffer and mixed with increasing amounts of different metals (CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, or NiCl<sub>2</sub>) before analysis. Using the soft experimental conditions described in Experimental Procedures, we were able to detect the native dimeric form of CopH (Figure 2A,B) along with the monomeric one (not shown). This is a further demonstration of the dimeric structure of CopH and shows that the two subunits are not linked through covalent interactions. Moreover, the experimentally determined molecular mass of CopH fits the expected mass of the dimeric apoprotein (26 404 Da), showing that pure CopH did not contain any trace of metal. Figure 2A (top trace) shows the mass spectrum of dimeric apo-CopH ions at  $m/z$  2641 ( $z = 10$ ). Upon addition of 1 equiv of copper (10  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>), two extra peaks appear with a mass difference of  $m/z \sim 6$  and  $\sim 12$  with respect to the CopH native mass (middle trace). This corresponds to the addition of one and two copper atoms to the CopH dimer, respectively. Concomitantly, the proportion of apo-CopH decreased dramatically. A full conversion

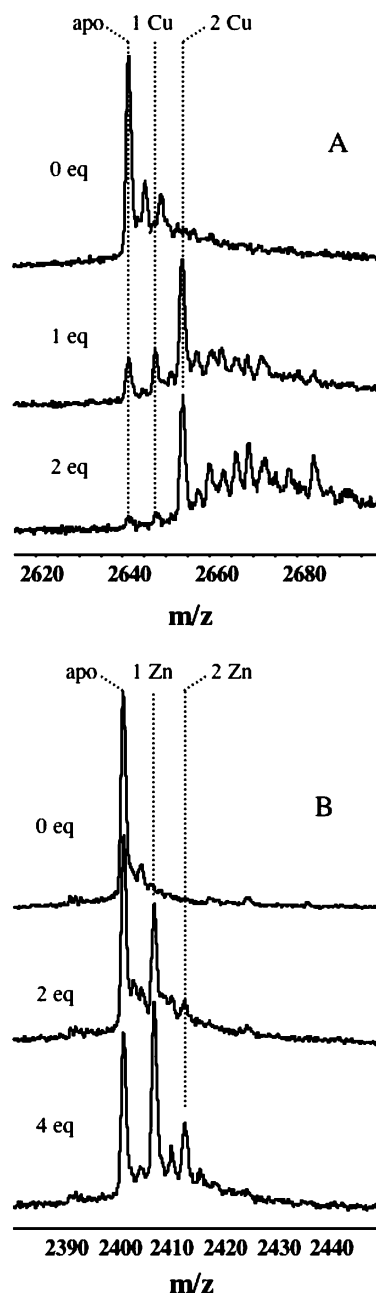


FIGURE 2: ES-MS titration of CopH with CuCl<sub>2</sub> or ZnCl<sub>2</sub> under native conditions. Only the part of the spectra corresponding to the dimer is shown with a  $z$  of 10 in the case of CuCl<sub>2</sub> (A) and a  $z$  of 11 for the addition of ZnCl<sub>2</sub> (B). Peaks corresponding to apo-CopH and, to the forms of the protein loaded with 1 and 2 equiv of metal, are indicated. The experimental conditions are described in Experimental Procedures.

to Cu-bound CopH was observed for 2 equiv of copper (20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>). Under these conditions, the peaks corresponding to the apoprotein and the protein with one copper atom were virtually absent, and only the peak corresponding to the binding of two copper ions was apparent (bottom trace). The binding of copper was also observed for the dissociated monomeric form of CopH with similar results (not shown). Upon addition of 0.2 equiv of copper, one extra peak corresponding to the binding of one copper atom appeared along with the peak of the apoprotein. As more copper was added, the proportion of CopH with bound copper increased while the proportion of the apo form decreased until the full conversion observed for 2 equiv of copper, i.e., one copper



ion per subunit. This shows that CopH contains two distinct copper-binding sites, one per monomer, that are not located at the interface of the dimer. ZnCl<sub>2</sub> binding and NiCl<sub>2</sub> binding were also assayed by mass spectrometry and gave very similar results. Figure 2B shows the mass spectra obtained with ZnCl<sub>2</sub>. One and two extra peaks appeared upon addition of 2 and 4 equiv of zinc, respectively. These peaks correspond to the binding of one and two zinc atoms, respectively. However, even in the presence of 4 equiv of zinc, the preparation contained a mixture of apo-CopH along with CopH with one or two bound zinc. This strongly suggests a difference in the dissociation constants of copper, zinc, and nickel for CopH. This was definitively demonstrated by a competition experiment. NiCl<sub>2</sub> and CuCl<sub>2</sub> were chosen for such an experiment because of the difference in the cation molecular mass. CopH was first loaded with Ni(II) by mixing the protein with 10 equiv of NiCl<sub>2</sub>. Then, 2 equiv of CuCl<sub>2</sub> was added, and a native mass spectrum was recorded, showing only the features of copper-bound CopH and thus demonstrating that copper took the place of nickel within the protein (not shown). Competition with glycine was also performed. Two glycines are required to bind one copper atom with a dissociation constant of ~500 nM at pH 7.5 (20). However, glycine was able to poorly compete with CopH only when added in a very large excess. The dissociation constant of Cu(II) for CopH is thus significantly lower than 500 nM. The monomer of CopH was also able to bind zinc or nickel (not shown). This common behavior suggests that copper, zinc, and nickel use the same binding sites within the CopH protein.

**EPR Characterization of Copper Binding.** X-Band EPR measurements were performed to assess the binding of Cu to CopH and the geometry of the binding sites. The results are depicted in Figure 3A. Pure CopH (170 μM in 50 mM Hepes buffer) did not reveal any EPR signal characteristic of Cu(II), showing again that the protein is in its apo form as purified. The EPR spectrum of free copper at a concentration of 340 μM was recorded as a control. Cu(II) in Hepes gives a very slight signal compared to Cu(II) bound to CopH, reflecting the heterogeneity of the solution in copper species in this buffer. Such a phenomenon was very useful for the copper titration experiment. CopH was then titrated with increasing amounts of CuCl<sub>2</sub>. Only one signal was observed as the amount of Cu(II) increased up to 2 molar equiv. Further addition of Cu(II) led to the appearance of a new signal with EPR parameters close to those of the free Cu(II) sample. Double integration of the low-field hyperfine resonance at 2750 G was plotted as a function of the copper concentration. Figure 3B shows that the signal intensity increases linearly up to 2 equiv of copper and that further addition of this metal did not result in a further increase in the magnitude of this EPR signal. This result confirms the Cu(II)/CopH binding stoichiometry previously deduced from the mass spectrometry experiments. Spectral characteristics were extracted from the spectrum with 2 equiv of Cu(II). The EPR parameters of this signal with a  $g_{||}$  of 2.238, a  $g_{\perp}$  of 2.053, and a hyperfine coupling of 182 G are compatible with a model of type II copper in a square-planar geometry with a coordination sphere of oxygen or nitrogen atoms. A complex super-hyperfine structure with seven transitions can be extracted from the high-field peak (see the inset of Figure 3B) with an apparent hyperfine constant ( $a$ ) value of 16 G.

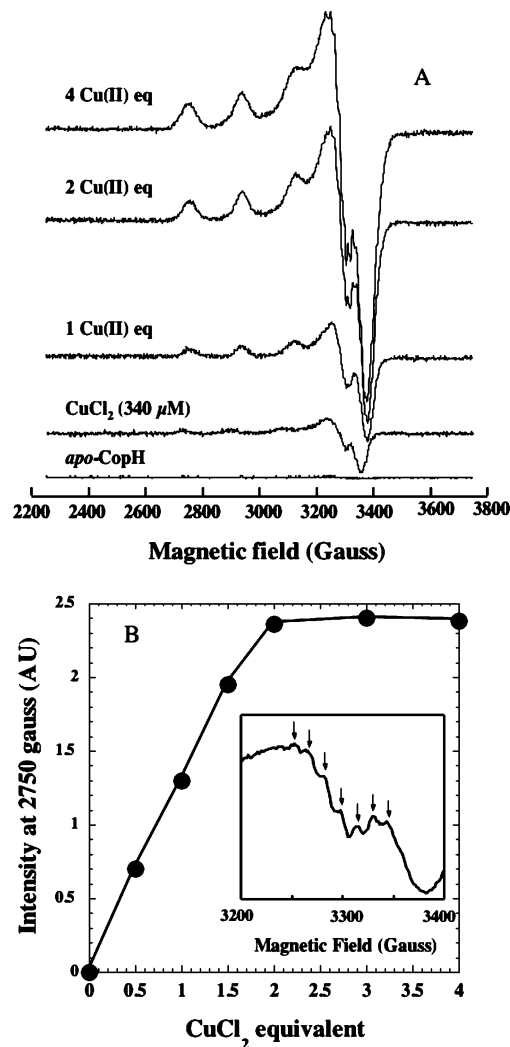


FIGURE 3: X-Band EPR analysis of binding of copper to CopH. (A) The protein was used at a final concentration of 170 μM in Hepes buffer. Copper was added as CuCl<sub>2</sub> from a freshly prepared solution in water. As controls, the spectra of apo-copH and of free CuCl<sub>2</sub> at a concentration corresponding to 2 equiv of Cu(II) are shown. General conditions are as follows: temperature of 20 K, microwave power of 0.101 mW, microwave frequency of 9.448 GHz, modulation frequency of 100 kHz, and modulation amplitude of 10 G. (B) Plot of the double integration of the low-field hyperfine resonance at 2750 G as a function of the copper concentration, indicating the saturation of the signal for 2 equiv of copper. The inset shows the complex super-hyperfine structure with seven transitions extracted from the high-field peak.

The number of super-hyperfine resonances suggests that there are two nitrogen nuclear spins ( $I = 1$ ) in interaction with the spin of the copper atom with different hyperfine constant values ( $a_1 = 16$  G and  $a_2 = 8$  G). Therefore, we propose that both His24 and His26 residues are involved in copper binding in CopH but with distinct coordination in terms of the Cu–N distance and/or orientation of the imidazole plane.

**Surface Plasmon Resonance Analysis.** Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy was used to gain more insight into the metal binding capacities of CopH. All experiments were run with NiCl<sub>2</sub> which is the metal recommended by the manufacturer for the best interaction with the NTA sensor chip. Figure 4A shows the dependence on pH of the association of CopH with the Ni–NTA sensor chip. The phase of association run at pH 7.5 confirmed that CopH could bind Ni. During the dissociation phase, the pH was adjusted

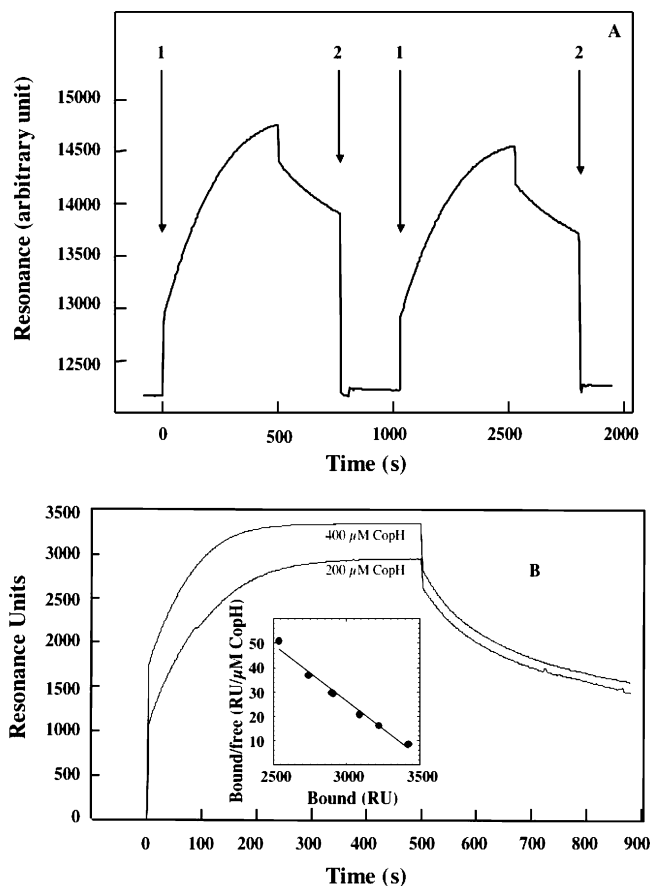


FIGURE 4: SPR analysis of the interaction of CopH with the Ni-NTA sensor chip. (A) Influence of the pH on CopH binding. Apo-CopH ( $50 \mu\text{M}$  in  $250 \mu\text{L}$ ) was loaded at a rate of  $30 \mu\text{L}/\text{min}$  on a Ni-NTA sensor chip at pH 7.5 (arrow 1). During the dissociation phase, the pH was lowered by a pulse addition of Mes buffer (pH 5.5) (arrow 2). After re-equilibration at pH 7.5, the whole experiment was repeated. (B) Determination of the apparent dissociation constant for immobilized nickel. Increasing amounts (from  $50$  to  $400 \mu\text{M}$  in  $250 \mu\text{L}$ ) of CopH were injected at a flow rate of  $30 \mu\text{L}/\text{min}$ . After each analysis, the surface was regenerated as described in Experimental Procedures. For simplification, only the results of the injections of  $200$  and  $400 \mu\text{M}$  CopH are shown. All the data were used for the Scatchard plot analysis shown in the inset.

to 5.5 by replacing Hepes buffer with Mes buffer. CopH fully dissociated instantaneously. After the sensor chip was equilibrated again at pH 7.5, CopH was able to reassociate (Figure 4), showing thus that the previous dissociation was not due to removal of metal from the sensor chip. This result is in agreement with the involvement of histidine residues in copper binding as the dissociation was probably due to histidine protonation at low pH. A pH titration between 7.5 and 5.5 was performed (not shown). Dissociation was observed to start at pH 6.5 and was almost complete at pH 5.8.

SPR was also used to estimate the apparent dissociation constant of CopH for Ni(II). Increasing amounts of CopH were loaded on a Ni-NTA sensor chip under conditions where saturation was obtained at the end of the association phase. Figure 4B shows only the result obtained with  $200$  and  $400 \mu\text{M}$  CopH as an illustration. Between each CopH loading, the surface was regenerated by a pulse injection of EDTA followed by  $\text{NiCl}_2$  treatment. Sensorgrams are characterized by an immediate and abrupt increase in

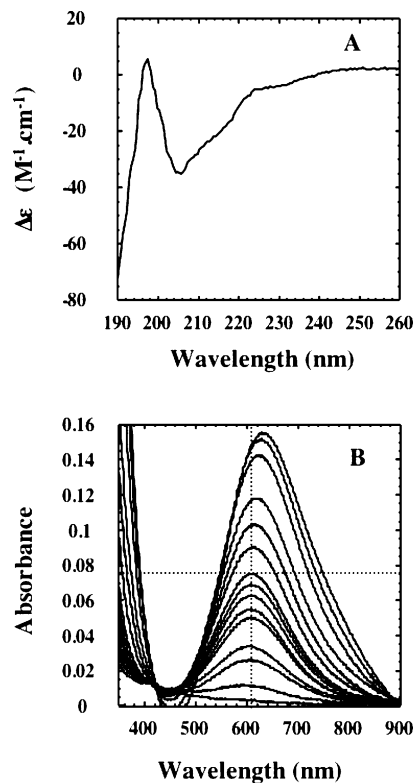


FIGURE 5: CD and UV-visible spectroscopic characterization of CopH. (A) UV (190–260 nm) CD spectrum of apo-CopH in  $20 \text{ mM}$  potassium phosphate buffer (pH 7.5). (B) UV-visible Cu(II) titration of  $0.5 \text{ mM}$  CopH in  $50 \text{ mM}$  Hepes (pH 7.6). A  $1 \text{ mL}$  cuvette was filled with the protein solution, and the first spectrum was recorded. Stepwise additions of  $100 \text{ mM}$   $\text{CuCl}_2$  were carried out ( $1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 20, 20, 25,$  and  $30 \mu\text{L}$ ). The absorbance at  $610 \text{ nm}$  increased linearly up to  $10 \mu\text{L}$  of added  $\text{CuCl}_2$  (horizontal dotted line), corresponding thus to the addition of  $1 \text{ mM}$  copper. Further addition of copper led to an absorbance increase characterized by the bathochromic shift illustrated by the deviation from the vertical dotted line.

resonance followed by an equilibrium phase leading to the saturation of the surface. The dissociation phase starts also by an abrupt decrease in resonance, the amplitude of which is different from that of the abrupt increase. Moreover, the amplitude of both abrupt phases was dependent on CopH concentration. As the binding and dissociation curves did not fit a simple interaction-dissociation model, the kinetic constants could not be determined. However, under these conditions, one can assume that the free CopH concentration corresponds to the protein concentration in the running buffer and that 100% binding corresponds to the saturation expressed in resonance units. These values were used for the Scatchard plot analysis reported in the inset of Figure 4B. An apparent  $K_d$  of  $20 \mu\text{M}$  for Ni(II) was deduced from the slope.

*Circular Dichroism and UV-Visible Spectroscopic Characterizations.* Circular dichroism (CD) studies were conducted in the UV region (190–260 nm) to explore the structural properties of CopH as a function of the pH or of the presence of copper. The recorded spectra remained strictly similar regardless of the pH (7.5 and 5.7) or the presence of 3 equiv of copper at pH 7.5. Figure 5A shows the result obtained at pH 7.5 in the absence of Cu as an example. Analysis of this spectrum using Selcon3 found in Dichroweb (21, 22) suggested that CopH is composed of

21% helix and 24.6% strands. This fits perfectly with the secondary structure prediction shown in Figure 1. According to the Selcon3 analysis, the protein should also contain 38% random coil and 20.2% turn structures. No major conformational changes occurred when the pH was lowered to 5.7, strengthening the hypothesis of the histidine protonation to explain the copper dissociation observed by SPR at acidic pH. In addition, the CD analysis also allows us to conclude that the binding of copper does not significantly affect the secondary structure content of CopH.

Upon addition of copper to CopH, the solution turned instantaneously deep blue. The spectral changes were analyzed between 350 and 900 nm as a function of increasing amounts of  $\text{CuCl}_2$  added to CopH in Hepes buffer. The results are shown in Figure 5B. Addition of copper first led to the appearance of a large band centered at 610 nm. This absorbance increased linearly up to the addition of 2 equiv of copper with respect to the amount of dimeric CopH protein. Further addition of  $\text{CuCl}_2$  led to a further increase in absorbance along with a bathochromic shift showing the appearance of a new species. In perfect agreement with the results of the EPR and mass spectrometry analyses, one can deduce that CopH can specifically bind two copper atoms per dimer. From the spectrum of the fully  $\text{Cu(II)}$ -loaded protein, an extinction coefficient of  $150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 610 nm can be deduced which is characteristic of a type II  $\text{Cu(II)}$  d-d transition (23).

**NMR Spectroscopy.** CopH was labeled with  $^{15}\text{N}$ , and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments were recorded at two different pHs. In the spectrum recorded at pH 7.5 (data not shown), only 85–90 peaks over the 119 expected resonances (127 residues minus seven prolines and the N-terminal amino group) could be observed. These resonances display a broad distribution of the NMR frequencies, typical for folded proteins. However, the absence of a large number of expected resonances from the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum suggests that the corresponding amino acids are either in slow conformational exchange or highly solvent accessible. Solvent exchange can be slowed by lowering the pH, and indeed, several sharp and intense resonances appear in the center of the spectrum at pH 6.5 (Figure 6A, spectrum shown in black). This indicates the poorly structured nature of the corresponding amino acids. At pH 6.5, roughly 110 peaks can be identified in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum. Additional evidence for the low degree of ordered structure of CopH also comes from the analysis of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST correlation experiments (18). These experiments were designed for a semiquantitative determination of structural compactness and heterogeneity of proteins in solution and provide measures for the solvent accessibility and proton density at the amide proton sites (18). Figure 6B shows the distribution of  $\lambda_{\text{noe}}$  values calculated for the 81  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  correlation peaks for which the intensity could be measured with confidence. Low  $\lambda_{\text{noe}}$  values indicate a high proton density around the amide proton, which can be related to its localization in a structured protein region. A  $\lambda_{\text{noe}}$  distribution as observed for CopH is a typical example for a very heterogeneous protein comprising structured and disordered protein segments (18). In this case, one can conclude that roughly 50 amino acids are situated in a well-structured protein core ( $\lambda_{\text{noe}} \leq 0.4$ ), which correlates well

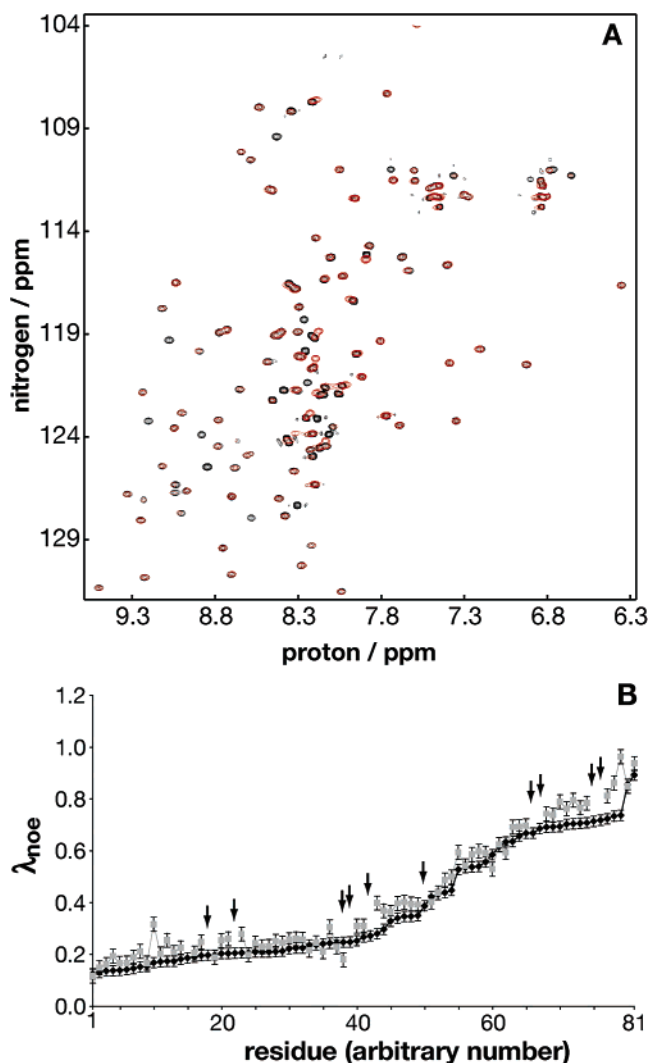


FIGURE 6: NMR characterization of CopH. (A) Superposition of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra acquired for CopH (0.4 mM) in the absence (black) and presence (red) of 0.9 mM  $\text{Cu(II)}$ . Both spectra were recorded with the same protein sample in 50 mM MES (pH 6.5) at 25 °C. (B) Protein compactness expressed as  $\lambda_{\text{noe}}$  determined from the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST-HMQC experiment.  $\lambda_{\text{noe}}$  is plotted for individual residues (resonance peaks), which are sorted for increasing  $\lambda_{\text{noe}}$  values in the apo form of CopH ( $\blacklozenge$ ). Low ( $\lambda_{\text{noe}} \leq 0.35$ ) values are expected for buried amide groups in the structured part of the protein, whereas a  $\lambda_{\text{noe}}$  of  $\geq 0.35$  indicates increased solvent exposure. Gray squares correspond to  $\lambda_{\text{noe}}$  values measured for the same resonance peaks but in the copper-loaded protein. Arrows denote resonances which disappeared upon  $\text{Cu(II)}$  binding due to paramagnetic line broadening.

with the secondary structure prediction depicted in Figure 1.

$\text{Cu(II)}$  is paramagnetic, and the magnetic moment of its unpaired electron affects the NMR parameter of nearby nuclei (24).  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST experiments were performed to follow the spectral and structural variations due to copper binding. To a freshly prepared CopH sample (0.4 mM) at pH 6.5 was added  $\text{CuCl}_2$  step by step to a final concentration of 0.9 mM. Figure 6A shows the superposition of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of apo-CopH and copper-bound CopH protein. It can be seen that the addition of  $\text{Cu(II)}$  to CopH does not induce any major chemical shift changes, confirming that copper binding does not lead to conformational changes. As expected, several



peaks disappear from the spectrum due to the enhanced proton relaxation by the unpaired electron of the nearby Cu(II). The corresponding residues are situated in both the structured and the more flexible part of the CopH protein as shown by the  $\lambda_{\text{noe}}$  values measured for the same correlation peaks on the apoprotein. Comparison of the  $\lambda_{\text{noe}}$  values of the apo form and the copper-bound form of CopH also demonstrates that copper binding does not lead to a higher degree of ordered structure (Figure 6B).

## DISCUSSION

CopH is the product of one of the 19 ORFs found in the *cop* cluster of the *C. metallidurans* CH34 pMol30 plasmid. CopH is an almost unique protein that is significantly homologous only with a paralog from *C. metallidurans* CH34 named CzcE (Figure 1). CzcE was identified as a periplasmic protein that is able to bind to  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , or  $\text{Co}^{2+}$ –NTA columns. The involvement of the only histidine residue (His24) in metal binding was ascertained by chemical modification with diethyl pyrocarbonate (12). We found that CopH also is a periplasmic protein. We have expressed it as its mature form in the cytoplasm of *E. coli*, and large amounts of protein were purified after ammonium sulfate fractionation and gel filtration. The mature form contains two histidine residues in positions 24 and 26 surrounding an aspartate. His26 of CopH can be aligned with His24 of CzcE (Figure 1). CopH was also found to bind to  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  columns but not to  $\text{Co}^{2+}$ –NTA columns. This prompted us to study the metal binding properties of CopH by different spectroscopic techniques. The protein was first characterized as a dimer by gel filtration and native mass spectrometry. Absorption spectroscopy, EPR, and mass spectrometry showed that CopH was purified in its apo form and was able to bind two metal atoms per dimer with a high specificity for copper. Additional unspecific binding of Cu(II) at higher Cu(II)/protein ratios could be detected but was not further characterized. A full conversion of the apo form to the Cu(II)-loaded form was observed by native mass spectrometry after addition of 2 equiv of copper, while more than 4 equiv of Zn or Ni did not transform CopH to a fully metal-loaded form. Competition experiments between Cu and Zn or Ni demonstrated the specificity for copper, and competition with glycine suggests a low dissociation constant ( $<500$  nM) (20). As native mass spectrometry allows detection of both the CopH monomer and the dimer in the same experiment, we could demonstrate that each subunit of CopH contains its own metal binding site. EPR and UV–visible spectroscopies confirmed the metal binding stoichiometry of two copper atoms per dimer of CopH. These two techniques also allowed the characterization of the copper binding sites. Upon Cu(II) binding, CopH turned blue and exhibited a broad absorbance centered at 610 nm. This absorbance characterized by a low extinction coefficient ( $150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for the fully loaded protein) is indicative of a type II copper with typical Cu(II) d–d transitions in a nitrogen ligand field (23). EPR parameters are in agreement with this conclusion and suggest a coordination sphere of nitrogen and oxygen for copper (25, 26). The involvement of the histidine residues was confirmed by SPR analysis. CopH, able to bind a Ni-loaded sensor ship at pH 7.5, started to dissociate when the pH decreased to 6.5 and fully dissociated at pH 5.8. Knowing that the  $\text{p}K_{\text{a}}$  for free histidine is 6.04, this relatively large

range of pH over which CopH dissociation occurs, suggests that both His24 and His26 residues are involved in Cu(II) binding, each being situated in a distinct environment. This is corroborated by the analysis of the super-hyperfine resonances observed at high field (between 3200 and 3400 G), suggesting different Cu–N distances or geometries for the two histidine residues. The proximity of carboxylates also likely to be involved in copper binding would contribute to the increase in the  $\text{p}K_{\text{a}}$  of His, resulting in a protonation at higher pH. Moreover, from CD experiments recorded at different pHs, it is clear that dissociation was not due to structural reorganization of the protein. SPR experiments were carried out with nickel. An apparent  $K_{\text{d}}$  of  $20 \mu\text{M}$  was deduced for Ni(II) from a Scatchard plot analysis. Even if this value is an upper limit because of the technical conditions (the metal was not in solution but already bound to NTA), it illustrates the difference in affinity found by mass spectrometry between copper and nickel or zinc. CD and NMR spectroscopies were used for a structural characterization of CopH. Both techniques led to the conclusion that this protein is partially unstructured as already suggested by the secondary structure prediction (Figure 1). Compared to CzcE, CopH contains, immediately downstream of His26, an insertion of 17 probably unstructured amino acids. The results of the  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST-HMQC experiments suggest that CopH is highly heterogeneous with  $\sim 30$  residues situated in unstructured protein segments. Binding of copper did not induce any significant changes in CopH folding, but the NMR spectral changes reveal that amino acids from both the folded and the unfolded part of the protein are situated in the proximity of the paramagnetic Cu(II) ion (Figure 6A,B). As the protein resonances have not yet been assigned, the corresponding amino acids could not be identified.

CopH is expressed from the *cop* cluster of the *C. metallidurans* CH34 pMol30 plasmid, which is one of the two clusters identified in this strain (11), conferring periplasmic copper resistance. Whereas the copper minimal inhibitory concentration (MIC) for a plasmid-free strain containing only the chromosome and the megaplasmid is  $\sim 0.6$  mM in Tris mineral salts medium, it increases to a value of 1.2 mM in the presence of the pMol30 plasmid (11). It appears thus that the *cop* cluster from pMol30 is required for maximal resistance. Moreover, it has been shown by exploring a cosmid library composed of large pMol30 fragments used to complement a plasmid-free derivative that the lack of *copH* led to a slightly lower resistance to copper and a MIC of 0.8–1 mM (ref 11 and personal communication with T. Vallaeys). CopH is thus not essential for resistance to copper but helps to reach the higher levels of resistance. Resistance to copper is a complicated process involving genes from the two different clusters, encoding proteins responsible for periplasmic as well as cytoplasmic copper detoxification. Whereas the function of the proteins belonging to the basic resistance mechanism is quite well characterized (1), several genes of the pMol30 cluster encode proteins of completely unknown function for which no or only a few equivalents are found in the protein databases. The proteins encoded by the pMol30 *cop* cluster can be sorted into two main groups: those with methionine-rich motifs and those with cysteine-rich motifs involved in periplasmic or cytoplasmic copper detoxification, respectively (11). As demonstrated from quantitative RT-PCR, most of

these genes are highly expressed after incubation of the cells for 30 min in the presence of up to 1 mM Cu(II). CopH is an exception for at least two reasons. The maximum expression of *copH* was observed after 1 h, and the corresponding protein lacks any methionine or cysteine. CopH should thus be involved in a late resistance mechanism, but its exact role is still unknown.

CzcE, the CopH paralog, is supposed to be involved in a nonessential metal-dependent induction of the *czc* operon (12) conferring copper, zinc, and cadmium resistance. The regulation of the *czc* operon is quite complex and occurs via the concerted action of several different promoters, probably regulated in the function of the periplasmic and cytoplasmic concentrations of the different metals. It should be noted that two of these metals are essential, whereas the third is purely toxic, which certainly is the reason for the elevated number of regulatory proteins in the *czc* operon (12). CzcE has been proposed to be a sensor using the periplasmic cation concentration as a signal for regulating expression of a specific multisubunit efflux pump formed by CzcA, CzcB, and CzcC (27). Hence, CzcE would repress *czcNp*, the main *in vivo* promoter of *czc*, at low periplasmic metal ion concentrations by inhibiting the phosphorylation of CzcS. At higher metal cation concentrations, the signal transduction pathway should lead to the controlled expression of the CzcCBA efflux system. However, this implies that the sensor protein is already present even at low metal cation concentrations and must interact with CzcS. Besides the sequence homology, CopH and CzcE also share a periplasmic localization and belong to a regulon encoding a two-component regulatory system (28, 29). It is therefore tempting to speculate that the physiological role of CopH could be related to the regulation of copper detoxification. It has already been mentioned that the regulation of copper homeostasis acts on two gene clusters, one of which seems to be specialized in the response to high Cu(II) concentrations, with a possible coordination of periplasmic and cytoplasmic copper sensing (11). CopH, whose maximal induction is observed 1 h after copper challenge, could be involved in the sensing of periplasmic copper once the detoxification machinery is active and therefore in the regulation of the late response to copper. As also proposed for CzcE, the regulatory function could be performed via an interaction with CopS, thus regulating phosphorylation of CopR (29).

Besides this latter hypothesis, CopH could have a very specialized role for copper management. For instance, CopH could be a Cu(II) acceptor from the multi copper-oxidase CopA (1, 30), thus serving to recycle copper-loaded CopA in the periplasm. CopH could also serve for copper trafficking between different Cop proteins, as suspected for CopC (31). All the hypotheses suggest an interaction between different partners, and we can speculate that these interactions could be favored by the lack of stable tertiary structure of CopH. Finally, the simplest hypothesis should be that CopH is a copper sequestering protein playing the role of a copper sponge and thus helping the cell to reach the highest capacity of resistance. A more detailed functional and structural characterization of the entire *cop* regulon is needed to decipher the fairly complex interplay between the different proteins that are involved.

## ACKNOWLEDGMENT

Max Mergeay and Tatiana Vallaey were present at the first stage of this study. They are acknowledged for constant encouragement and for making available some information (especially ref 11). We thank P. Schanda and B. Brutscher for their help with the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HET-SOFAST-HMQC experiments.

## REFERENCES

1. Rensing, C., and Grass, G. (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment, *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 197–213.
2. Lee, S. M., Grass, G., Rensing, C., Barrett, S. R., Yates, C. J. D., Stoyanov, J. V., and Brown, N. L. (2002) The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 616–620.
3. Brown, N. L., Barrett, S. R., Camakaris, J., Lee, B. T., and Rouch, D. A. (1995) Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004, *Mol. Microbiol.* 17, 1153–1166.
4. Mellano, M. A., and Cooksey, D. A. (1988) Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*, *J. Bacteriol.* 170, 4399–4401.
5. Cooksey, D. A. (1994) Molecular mechanism of copper resistance and accumulation in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 381–386.
6. Solioz, M., and Stoyanov, J. V. (2003) Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 183–195.
7. Vandamme, P., and Coenye, T. (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2285–2289.
8. Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D., and Wattiez, R. (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: Towards a catalogue of metal-responsive genes, *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 385–410.
9. Noel-Georis, I., Vallaey, T., Chauvaux, R., Monchy, S., Falmagne, P., Mergeay, M., and Wattiez, R. (2004) Global analysis of the *Ralstonia metallidurans* proteome: Prelude for the large-scale study of heavy metal response, *Proteomics* 4, 151–179.
10. Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.-C., Cattolico, L., Chandler, M., Choise, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguiet, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C. A. (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*, *Nature* 415, 497–502.
11. Monchy, S., Benotmane, A., Wattiez, R., van Aelst, S., Auquier, V., Borremans, B., Mergeay, M., Taghavi, S., van der Lelie, D., and Vallaey, T. (2006) Transcriptomic and proteomic analyses of the pMol30 encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, *Microbiology* (in press).
12. Grosse, C., Anton, A., Hoffmann, T., Franke, S., Schleuder, G., and Nies, D. H. (2004) Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance *Czc* via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*, *Arch. Microbiol.* 182, 109–118.
13. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685.
14. Jansson, M., Li, Y. C., Jendeberg, L., Anderson, S., Montelione, B. T., and Nilsson, B. (1996) High level production of uniformly  $^{15}\text{N}$ - and  $^{13}\text{C}$ -enriched fusion proteins in *Escherichia coli*, *J. Biomol. NMR* 7, 131–141.
15. Tricot, C., van Aelst, S., Wattiez, R., Mergeay, M., Stalon, V., and Wouters, J. (2005) Overexpression, purification, crystallization and crystallographic analysis of CopK of *Cupriavidus metallidurans*, *Acta Crystallogr. F* 61, 825–827.
16. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR* 6, 277–293.
17. Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biomol. NMR* 4, 603–614.

18. Schanda, P., Forge, V., and Brutscher, B. (2006) HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains, *Magn. Reson. Chem.* (in press).
19. Geourjon, C., and Deléage, G. (1995) SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments, *Comput. Appl. Biosci.* *11*, 681–684.
20. Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H., and Jones, K. M. (1986) *Data for Biochemical Research*, Clarendon, Oxford, U.K.
21. Lobley, A., and Wallace, B. A. (2001) Dichroweb: A website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Biophys. J.* *80*, 373A.
22. Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2002) DI-CHROWEB: An interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Bioinformatics* *18*, 211–212.
23. Solomon, E. I., Lowery, M. D., LaCroix, L. B., and Root, D. E. (1993) Electronic absorption spectroscopy of copper proteins, *Methods Enzymol.* *226*, 1–33.
24. Bertini, I., and Pierattelli, R. (2004) Copper(II) proteins are amenable for NMR investigations, *Pure Appl. Chem.* *76*, 321–333.
25. Peisach, J., and Blumberg, W. E. (1974) Structural implications derived from analysis of electron-paramagnetic resonance-spectra of natural and artificial copper proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* *165*, 691–708.
26. Karlin, S., Zhu, Z.-Y., and Karlin, K. D. (1997) The extended environment of mononuclear metal centers in protein structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 14225–14230.
27. Rensing, C., Pribyl, T., and Nies, D. H. (1997) New functions for the three subunits of the CzcCBA cation–protein antiporter, *J. Bacteriol.* *179*, 6871–6879.
28. Munson, G. P., Lam, D. L., Wayne Outten, F., and O’Halloran, T. V. (2000) Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* *182*, 5864–5871.
29. Yamamoto, K., Hirai, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R., and Ishihama, A. (2005) Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* *280*, 1448–1456.
30. Grass, G., and Rensing, C. (2001) CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *286*, 902–908.
31. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Mangani, S., and Thompsett, A. R. (2003) A redox switch in CopC: An intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 3814–3819.

BI060328Q

# Oligomeric behavior of the RND transporters CusA and AcrB in micellar solution of detergent

David Stroebel<sup>a,\*</sup>, Véronique Sendra<sup>a</sup>, Dominique Cannella<sup>a,1</sup>, Kerstin Helbig<sup>b</sup>,  
Dietrich H. Nies<sup>b</sup>, Jacques Covès<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale, Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France*

<sup>b</sup> *Institut für Mikrobiologie; Kurt-Mothes-Str. 3, D-06099 Halle, Germany*

Received 12 December 2006; received in revised form 12 February 2007; accepted 8 March 2007  
Available online 24 March 2007

## Abstract

We have used analytical ultracentrifugation to explore the oligomeric states of AcrB and CusA in micellar solution of detergent. These two proteins belong to the resistance, nodulation and cell division (RND) family of efflux proteins that are involved in multiple drug and heavy metal resistance. Only the structure of AcrB has been determined so far. Although functional RND proteins should assemble as trimers as AcrB does, both AcrB and CusA form a mixture of quaternary structures (from monomer to heavy oligomer) in detergent solution. The distribution of the oligomeric states was studied as a function of different parameters: nature and concentration of the detergent, ionic strength, pH, protein concentration. This pseudo-heterogeneity does not hamper the crystallization of AcrB as a homotrimer.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** RND transporter; Analytical ultracentrifugation; Detergent; Crystallization; Membrane protein; Oligomer

## 1. Introduction

As a Gram-negative bacterium, *Escherichia coli* contains seven multicomponent transporters of the resistance, nodulation and cell division (RND) family responsible for intrinsic drug tolerance [1,2]. Six efflux pumps confer resistance to a broad variety of compounds including antibiotics [3] and belong to the hydrophobic and amphiphilic efflux RND (HAE-RND) protein family. Together with a periplasmic membrane fusion protein (MFP) and an outer membrane factor (OMF), the

resulting tripartite protein complex spans the complete cell wall of this bacterium and exports substrates probably from the periplasmic space to the outside. This process is driven by proton import, which is catalyzed by the inner membrane RND protein. An archetype of these efflux pumps is the homotrimeric RND protein AcrB that is associated with the MFP AcrA and the OMF TolC [4–6]. *E. coli* contains only one member of yet another RND protein family (heavy-metal efflux RND, HME-RND), CusA, which confers resistance to copper and silver [2,7]. CusA is encoded by the *cusCFBA* operon on the bacterial chromosome. In the respective transenvelope protein complex, CusB and CusC are the MFP and the OMF proteins, respectively. CusF is located in the periplasm and may serve as a kind of copper chaperone to deliver copper to CusA [8].

While HME-RND proteins were the first RND proteins described, a greater attention has been paid to HAE-RND proteins because of their high medical importance. For instance, the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* contains 13 RND transport systems and 12 of them are probably HAE-RND proteins [1]. This corresponds with an important role of RND

*Abbreviations:* AUC, analytical ultracentrifugation; DDM, *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside; FC14, *n*-tetradecylphosphocholine; FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy; RND, resistance nodulation and cell division

\* Corresponding authors. D. Stroebel is to be contacted at tel.: +33 1 44 32 38 88; fax: +33 1 44 32 38 94. J. Covès, tel.: +33 4 38 78 24 03; fax: +33 4 38 78 54 94.

*E-mail addresses:* [david.stroebel@ens.fr](mailto:david.stroebel@ens.fr) (D. Stroebel), [jacques.coves@ibs.fr](mailto:jacques.coves@ibs.fr) (J. Covès).

<sup>1</sup> Present address: Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes Institut Jean Roget, Domaine de La Merci, 38700 Grenoble, France.



proteins in antibiotic resistance of pathogenic bacteria in hospital environments and the related development of nosocomial diseases [9].

Although the atomic organization of HAE-RND proteins is now known with the X-ray structures of AcrB [10,11], such data are not yet available for HME-RND proteins. AcrB and CusA should have a similar topology and quaternary structure. However, our efforts to get structural data with CusA remained unproductive so far. We have thus used a series of techniques to compare back-to-back the behavior of these two proteins during purification by a protocol that yields AcrB crystals. Surprisingly, not only CusA (which did not crystallize so far) but also AcrB (which readily forms crystals) exist after purification as a mixture of oligomeric forms in detergent solution as shown by our analytical ultracentrifugation (AUC) data. This pseudo-heterogeneity does not hamper crystallization of AcrB as a homotrimer. We propose a mechanism that links the behavior of these oligomeric states and crystallization.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Proteins, general techniques and crystallization

The AcrB overexpression vector is a kind gift of KM Pos. AcrB was purified as described in [12] except that *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM, Anatrace, CMC=0.17 mM or 0.0087%) was used instead of cyclohexyl-*n*-hexyl- $\beta$ -D-maltoside. The construction of the CusA expression vector and the purification of CusA were as described in [13] for CzCA except that extraphospholipids were not added during the solubilization or the purification steps. Alternatively, 0.4% *n*-dodecylphosphocholine (FC14, Anatrace, CMC=0.12 mM or 0.0046%) was used in place of DDM. Imidazole (AcrB) or desthiobiotine (CusA) were removed by cycles of concentration and dilution on Amicon cells equipped with YM-50 membranes. The final buffer contained either 0.02% DDM or 0.01% FC14.

Protein concentration was determined using bovine serum albumin as a standard and the Micro BCA protein assay (Pierce). Purity was estimated by 0.1% SDS–12% polyacrylamide gel electrophoresis. Oligomeric state was estimated by elution of a Superdex-200 filtration column calibrated with proteins of known hydrodynamic radius in detergent solution [14] or by sedimentation on sucrose density gradients formed by freeze–thawing treatment of 0.5 M sucrose in the suitable buffer [15]. One ml of protein solution was carefully loaded at the top of 10 ml sucrose gradients. The tubes were spun in a SW41 rotor (Beckman) during 16 h at 40,000 rpm. One ml fractions were collected from the top of the tubes before being analyzed by SDS-PAGE for protein content.

The amount of lipids in the protein preparations was checked by FTIR as described in [16] using an Avatar 330 (Thermo).

AcrB crystals were grown by sitting-drop vapor diffusion at 20 °C. A protein solution (15–20 mg/ml) was mixed at 1:1 ratio with the reservoir solution containing 16% PEG 2000, 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.2 and 40 mM sodium citrate pH 5.6.

### 2.2. Analytical ultracentrifugation experiments

Sedimentation velocity experiments were performed in a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge using a 4-hole or an 8-hole rotor (Beckman instruments), at 4 °C or 6 °C. Samples were handled immediately after purification and concentration on ultrafiltration membranes. In this case, a simple dilution in a chosen buffer allowed to study several parameters such as the protein and the detergent concentration. The pH value varied from 5.6 to 8 and the ionic strength from 0 to 500 mM NaCl.

Sedimentation velocity experiments were carried out at 42,000 rpm using 100  $\mu$ l or 400  $\mu$ l proteins samples, loaded in the two-channel 0.3 or 1.2 cm path length centerpieces, respectively. The buffer in the reference channel was

identical with that of the sample but the detergent was omitted. Interference and absorbance (280 nm, with radial step size of 0.003 cm) scans were recorded overnight. Sedimentation velocity profiles were analyzed using the size distribution analysis from the program Sedfit (version 9.4b developed by P. Schuck and available at [www.analyticalultracentrifugation.com](http://www.analyticalultracentrifugation.com)). It provides a continuous distribution of apparent sedimentation coefficients,  $c(s)$ . The  $c(s)$  analysis allows then to deconvolute the contribution of different species in a mixture [17,18]. About twenty regularly spaced experimental profiles were globally modeled. The  $c(s)$  analysis was performed considering 200 particles on a grid of 300 radial points calculated with a frictional ratio  $f/f_0$  of 1.25 and for sedimentation coefficient in the range of 1 to 50 S.

The density ( $\rho$ ) and viscosity ( $\eta$ ) of each solution were estimated with the program Sedentrp (available at <http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>). The molar mass, molar extinction coefficient and partial specific volume of CusA and AcrB were deduced from their total amino-acid composition by the same program: CusA: 115,597 g/mol, 160,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and  $\bar{V}$  0.7456 ml/g (pI 5.92); AcrB: 114,654 g/mol, 90,100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and  $\bar{V}$  0.7394 ml/g (pI 6.22). The partial specific volumes of detergents  $\bar{V}_D$  used were: 0.824 ml/g for DDM and 0.94 ml/g for FC14 (considered here identical to FC12) [14]. The partial specific volume for the protein–detergent complex  $\bar{V}_{PDC}$  was first considered to be 0.79 ml/g in DDM and 0.87 ml/g in FC14.

### 2.3. Analytical ultracentrifugation theory

The Svedberg equation relates the experimental  $s$  coefficient value to the buoyant molar mass of the protein detergent complex,  $M_{PDC}$ , and its Stoke radius  $R_s$  ( $N_A$  is Avogadro's number):

$$M_{PDC} = s N_A 6\pi\eta R_s \quad (1)$$

The value of the buoyant molar mass depends on the solvent density ( $\delta$ ) but can also be expressed as a function of the molecular mass of the protein ( $M_P$ ), the quantity in g/g of bound detergent ( $\gamma_D$ ), lipids ( $\gamma_L$ ) and solvent ( $\gamma_w$ ) per protein, and of  $\bar{V}_P$ ,  $\bar{V}_D$ ,  $\bar{V}_L$  and  $\bar{V}_w$ :

$$M_{PDC} = M_P[(1 - \delta\bar{V}_P) + \gamma_D(1 - \delta\bar{V}_D) + \gamma_L(1 - \delta\bar{V}_L) + \gamma_w(1 - \delta\bar{V}_w)] \quad (2)$$

Contribution of solvent has been neglected here.

Particles that contributes only to interference signal could be quantified by measuring the number of recorded fringes, that is linked to concentration by the following equation:

$$J = dn/dc \cdot c \cdot l \cdot \lambda / K \quad (3)$$

where,  $c$  the concentration of particle,  $l$  the path length, the wavelength  $\lambda=675$  nm, the constant  $K=1.013$ ,  $dn/dc$  the interference contribution of the particle : 0.186 ml/g for a protein ( $J/c$  of 2.76) and 0.133 ml/g for both detergent DDM and FC14.

The amount of surfactant associated with the protein  $\gamma_T=(\gamma_D+\gamma_L)$  was estimated by quantitative comparison of  $c(s)$  analysis between absorbance and interference data. If we neglect the contribution of lipids (no or few associated lipids):

$$\gamma_D = ((J \cdot \epsilon_{M280 \text{ nm}} / DO_{280 \text{ nm}}) - J/c_{\text{protein}}) / J/c_{\text{detergent}} \quad (4)$$

## 3. Results

### 3.1. Purification, homogeneity, stability and crystallization

CusA was purified by affinity chromatography on a streptactin-column after solubilization with DDM (Fig. 1A). Detergent FC14 could also be used for solubilization and purification. Both detergents kept CusA in solution. The molecular mass of CusA was determined as about 110,000 Da



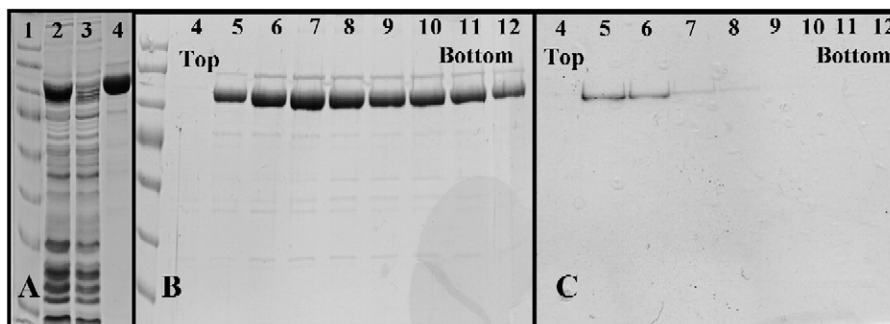


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of different CusA preparations. Panel A, purification of CusA: 1, molecular mass markers; 2, membrane preparation; 3, flow through of the strep-tag affinity column; 4, desthiobiotin elution of CusA from the strep-tag affinity column. Panel B, DDM–CusA on sucrose density gradient containing 0.05% of DDM. Panel C, FC14–CusA on sucrose density gradient containing 0.025% of FC14. Only fractions 4 to 12 were used for the SDS-PAGE analysis.

by SDS-PAGE analysis. This value agrees well to a mass of 114,707 Da deduced from the predicted amino acid sequence.

Homogeneity of the protein preparations was investigated by sucrose density gradient centrifugations followed by SDS-PAGE analysis of the fractions (Fig. 1B). After 16 h of centrifugation at 40,000 rpm, CusA solubilized with DDM (DDM–CusA in the following) was present in fractions 5 to 12. This strongly suggests that CusA existed in solution as a mixture of different oligomeric states and not as a mere trimer as expected for a RND protein according to the AcrB structure. The CusA preparation obtained in the presence of FC14 (FC14–CusA in the following) was much more homogeneous as CusA was obtained in fractions 5 and 6 essentially (Fig. 1C). Detection of CusA in these two fractions from the top of the gradient indicated the presence of simpler and smaller quaternary CusA structures in FC14 preparations compared to DDM preparations. As estimated from the position of FC14–CusA in the sucrose gradient after centrifugation, FC14–CusA could be a simple monomer while the DDM preparations contained CusA multimers. Interestingly, regardless of the storage condition, DDM–CusA was stable for weeks whereas FC14 preparations were quickly denatured, probably by proteolysis (not shown).

Purified DDM–AcrB preparations were also stable for weeks (not shown). AcrB crystallized under conditions similar to those already described [5,19]. The resulting crystals diffracted on the ESRF beamline ID29 and gave identical space group and cell parameters as previously obtained [20]. Sometimes, two types of crystals were present in the same drop (see picture in Fig. 5). This was also in agreement with even three types of crystals grown in the same drop (K.M. Pos, personal communication). Thus, CusA and AcrB could be purified easily after solubilization with DDM and both proteins were stable for weeks. However, AcrB crystallized easily but CusA did not.

### 3.2. Behaviors of AcrB and CusA in detergent solution

Data from dynamic light scattering, electron microscopy and size exclusion chromatography confirmed the heterogeneity of the solubilized CusA preparations. Thus, CusA and AcrB micellar solutions were compared by AUC. Detergent-solubilized membrane proteins in micellar solution may form complicated complexes composed of protein, detergent and

lipids. Nevertheless, molecular masses could be calculated from the sedimentation coefficients if a globular structure of the particle was assumed and the amount of surfactant of the protein–detergent complex was also taken into consideration. To obtain this information the concentration of detergent free micelles was deduced from interference data (Fig. 2) and subtraction of the protein concentration to this interference data gave the amount of detergent linked to each complex (Eqs. (3) and (4)) [21].

AUC analysis of FC14–CusA revealed the presence of one species ( $s_{20,w}$  of 5.5 S) associated with  $1.8 \pm 0.6$  g of detergent per g of protein (Fig. 2A). Solution of Eqs. (1) and (2) yielded a molecular mass that was only compatible with the monomeric form of CusA. This result agreed with that from sucrose density gradient centrifugation.

DDM preparations of CusA and AcrB gave both three distinct major species with  $s_{20,w}$  values of 8 S, 11 S and 16 S respectively, along with heavier species (Fig. 2B and C). These  $s_{20,w}$  values of these heavier species could not be determined precisely. All  $s_{20,w}$  values were obtained in twenty AUC experiments and gave reproducible results, strongly indicating that the presence of these discrete species were no artefacts. The mean value for the amount of complex-associated detergent was similar for the three major species,  $1.5 \pm 0.6$  g per g of protein for DDM–CusA and  $1.2 \pm 0.4$  g per g of protein for DDM–AcrB.

The presence and the amount of lipids in the protein preparations were determined by FTIR analysis (Fig. 3). The surface ratios between the peak of carboxylic amide at  $1755 \text{ cm}^{-1}$  (corresponding to protein) and that of carboxylic ester at  $1740 \text{ cm}^{-1}$  (lipids) [16] gave an estimate of 5 to 10 lipids per protein for DDM–CusA. In case of AcrB, no peak could be detected at  $1740 \text{ cm}^{-1}$  (Fig. 3), suggesting a maximum of 2 lipids per protein.

Using the values for the amount of complex-associated detergent and that of lipids in the protein preparations, theoretical  $s_{20,w}$  values for monomeric, dimeric and trimeric DDM–CusA in spherical protein–detergent–lipid particles were calculated as  $9.2 \pm 1$  S,  $14.6 \pm 1.5$  S and  $19.7 \pm 2$  S, respectively. The same calculation for AcrB gave rather similar results of  $9 \pm 1$  S,  $14.3 \pm 1.5$  S and  $18.8 \pm 2$  S respectively.

When the Hydropro software [22] was used to calculate the Stokes radius of AcrB (pdb entry 1T9T) in the absence of

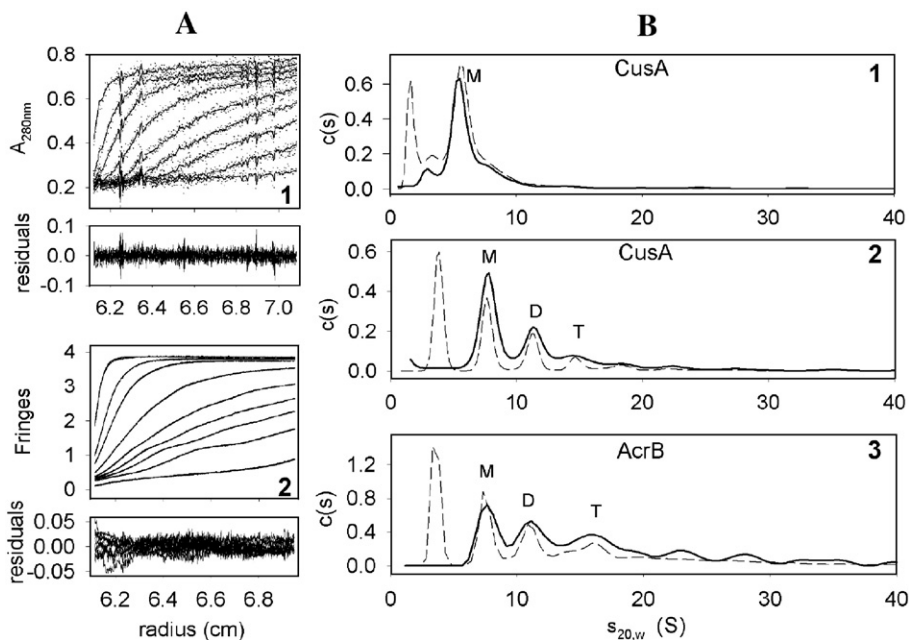


Fig. 2. Sedimentation velocity of different CusA or AcrB preparations. Data were recorded in absorbance (Panel A, 1) and in interference (Panel A, 2). The corresponding residuals represent the superimposition of the differences between the experimental and fitted curves. Panel B,  $c(s)$  analysis for 1, 5.6  $\mu\text{M}$  CusA in 6.7 mM FC14 at 4 °C; 2, 5.6  $\mu\text{M}$  CusA in 2.1 mM DDM at 6 °C and 3, 4.9  $\mu\text{M}$  AcrB in 0.7 mM DDM at 6 °C. Interference data are in dotted line while  $A_{280}$  data are in solid line. The peaks observed in interference only correspond to the free detergent micelles. M is for monomer, D for dimer and T for trimer.

detergent, the result was 4.5 nm for the monomer and 6 nm for the trimer. On the other hand, Stokes radii of 4.03 nm for the monomer and 5.82 nm for the trimer were used to compute the theoretical  $s_{20,w}$  values. Therefore, the theoretical  $s_{20,w}$  values should be higher than those experimentally determined and, with some confidence, the 8 S species could be assigned to the monomeric form of CusA or AcrB, respectively. Furthermore, the 11 S species in both protein preparations should represent dimers and the 16 S species trimers. The additional high

molecular mass signals with  $s_{20,w}$  values between 19 S and 47 S, which could not be separated into single signals and described precisely, may represent a mixture of various oligomers larger than trimers.

The overall sedimentation profiles of DDM–AcrB and DDM–CusA were reproducible and, compared to each other, very similar. In all protein preparations, monomers, dimers, trimers and heavier oligomers were observed (Fig. 4). However, the relative proportion of each population varied with the experimental conditions, e.g. the protein, salt or detergent concentration (Fig. 4). The heavy oligomers were the most abundant AcrB population except at high salt concentrations while the monomeric form of CusA was dominant except under high protein concentrations. At high salt concentrations, both AcrB and CusA were predominantly present in their monomeric forms (Fig. 4A, condition 3; Fig. 4B, condition 1). The species distribution for DDM–AcrB was poorly affected by the detergent concentration (Fig. 4A, conditions 4 and 5). No difference in  $c(s)$  distribution profiles was observed within pH ranges from 6 to 8 (not shown) or after incubation for 72 h at 4 °C for both AcrB and CusA.

An increase in the protein concentration raised the portion of the heavy 19–47 S oligomers in case of AcrB and of CusA (Fig. 4A and B, conditions 2) but for AcrB more than for CusA. It should be noted that the parameters of condition 4 for DDM–AcrB were closest to those leading to crystallization of this protein.

#### 4. Discussion

The only structure of an RND transporter solved so far is that of AcrB. This protein can be purified in large amounts. It

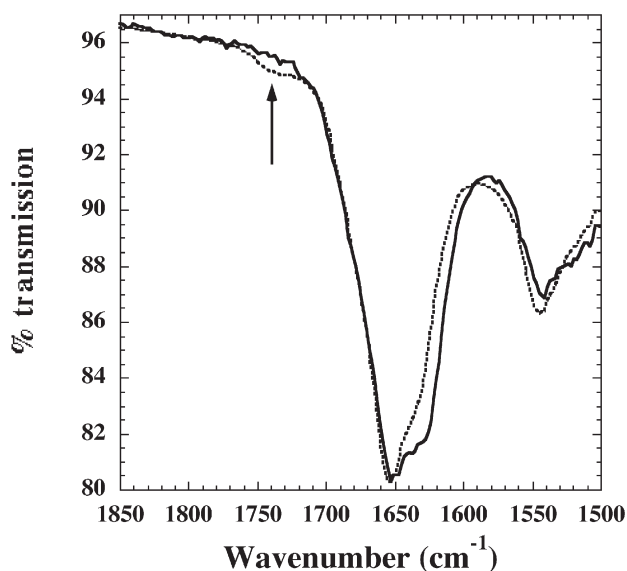


Fig. 3. FTIR spectra of dried DDM CusA and AcrB preparations. Spectra were recorded as described in [16]. Solid line is for AcrB and dotted line for CusA. The arrow indicates the resonance peak of the ester carbonyl characteristic of the presence of lipids, visible in DDM–CusA.

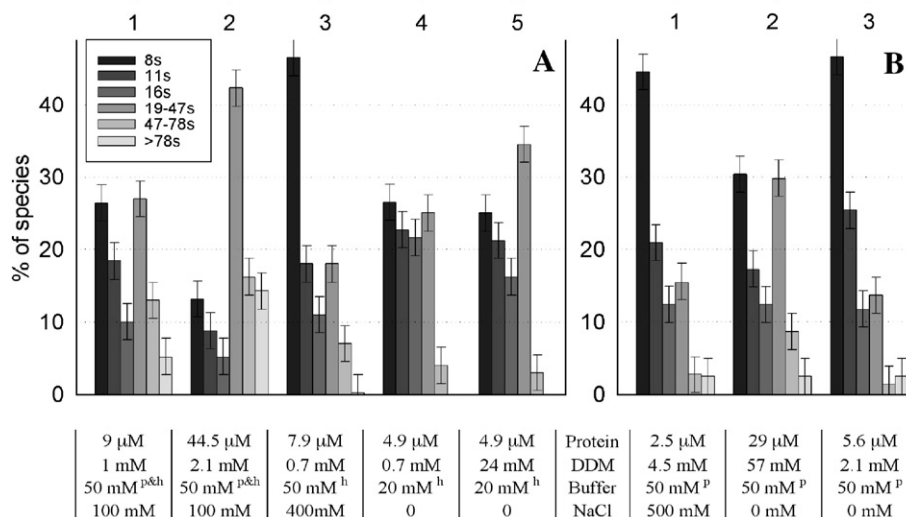


Fig. 4. Distribution of the oligomeric states for AcrB (Panel A) and CusA (Panel B) deduced from AUC experiments. Populations have been sorted as follows: 8 S, 11 S and 16 S correspond to discrete species and are respectively for the monomers, the dimers and the trimers. Heavier species are defined as a population comprised between two given S values. Percentages are calculated by ratio of the observed peak area on the total area of the curve (Fig. 2). Protein concentration was estimated from  $A_{280}$ . The free DDM concentration was calculated by contribution of interference on micelles peak (Eq. (3)). For buffers, <sup>P</sup> indicates the use of phosphate buffer pH 7 and <sup>h</sup> that of HEPES buffer pH 8. Error bars represent the uncertainty in the choice of the integration limits for each species in the  $c(s)$  analysis.

is stable and crystallizes easily. The first structures were obtained from crystals grown in a trigonal  $R32$  space group with trimers of AcrB being centered on the crystallographic three-fold axis [5,19,20]. Consequently, the three monomers had a strictly similar conformation and the question of how AcrB can actively export a wide variety of toxic compounds remained unanswered. Two recent papers describe AcrB structures solved from crystals belonging to the monoclinic  $C2$  or the triclinic  $P1$  space group, respectively [10,11]. In these crystals each monomer can take three independent conformations. Analyses of these new structures led to the proposal of a three-step rotation mechanism of drug efflux in a kind of peristaltic mode [10,11]. Anyway, the new structures are basically consistent with the previous ones and confirm that the functional unit of AcrB is the trimer. As suggested from sequence similarities and function analogy, it appears necessary for RND proteins to assemble into trimer as the active form for substrate transport.

To study the oligomeric state of detergent-solubilized RND proteins in solution, the HAE-RND model protein AcrB was compared to CusA, an RND protein of the HME-RND family. Both RND proteins were present as highly polydisperse

distributions in micellar solutions of DDM. Detailed analysis of data obtained by analytical ultracentrifugation demonstrated the co-existence of a large range of oligomeric forms from monomers to dimers, trimers and not very well defined heavy oligomers larger than trimers. Since CusA and AcrB belong to different families of the RND superfamily and share only a limited degree of similarity (22% identity on the amino acid level), this peculiar behavior could be a general feature of all members of the RND transporter superfamily.

MexB from *P. aeruginosa* is another HAE-RND protein and a close AcrB homologue. Purified MexB was proposed to exist as a homotrimer in DDM solution with  $398 \pm 12$  DDM molecules bound to each MexB molecule [23]. Thus, DDM would contribute a molecular mass of  $203.2 \pm 6.1$  kDa per MexB monomer (112.8 kDa) to the total molecular mass of the DDM–protein complex, leading to a molecular mass of about 948 kDa of the trimeric (DDM–MexB)<sub>3</sub> complex. Such a complex would have a Stokes radius of 8.34 nm and a  $s_{20,w}$  value of 20.1 S but instead 6.02 nm and 13.8 S, respectively, were experimentally determined [23]. This could indicate the presence of low molecular mass species, e.g. monomers and dimers, in the MexB preparation as well.

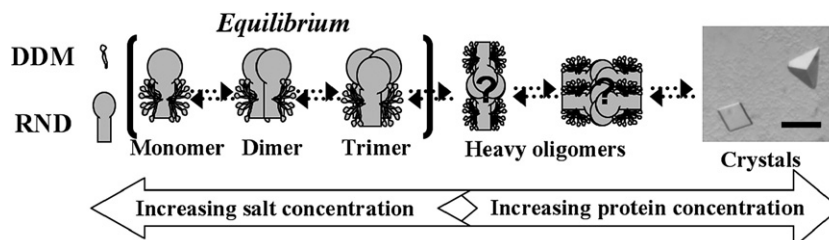


Fig. 5. Schematic representation of the oligomeric equilibrium leading to crystallization of RND transporters. AcrB crystals were obtained in the crystallization conditions indicated in Materials and methods. Solid bar in the picture on the right corresponds to 150  $\mu$ m.

DDM–AcrB and DDM–CusA formed in solution discrete protein species. The sedimentation coefficients of the monomeric, dimeric and trimeric forms were identical under various experimental conditions, although the relative amounts of these species varied with some conditions, e.g. salt, protein and DDM concentration. However, under a given condition the portion of each species was stable with time, up to 72 h, and did not depend on the protein concentration when only the monomers, dimers and trimers were considered (Fig. 4). This strongly suggests that the monomers, dimers and trimers were in a slow association and dissociation equilibrium [24] (Fig. 5).

Although the detergent concentration slightly increased the amount of AcrB and CusA in the heavy oligomeric form with  $s_{20,w}$  values between 19 S and 47 S, this parameter did not effect the distribution of either protein between the monomeric, dimeric and trimeric forms (Fig. 4). This was a surprise and contrary to observation from other membrane proteins [25,26]. Since the equilibrium between these three forms was primarily sensitive to the protein concentration and ionic strength, the soluble domains of RND proteins should be primarily responsible for associations into larger structures. In agreement with this suggestion, the three AcrB polypeptides in the homotrimer interact mainly by large contacts between their periplasmic domains, with only few contacts between the membrane domains.

The heavy oligomeric forms (19 S to 47 S) of AcrB and CusA were always present. In case of AcrB, this form was predominant in conditions that led to crystallization. This suggests that this oligomeric form did not correspond to denatured and aggregated protein but could rather be an intermediate on the way to crystallization (Fig. 5). Since the portion of this large species increased with rising protein concentration and the protein concentration itself increases in the crystallization process when the hanging drop loses water as vapor, the heavy oligomeric forms could play a crucial role in nucleation and growth of the crystals (Fig. 5). Indeed, some membrane protein preparations could become more polydisperse when the protein concentration increases [27] and polydispersity of soluble proteins exists even in supersaturating conditions [28,29], i.e. above the boundary of the solubility curve corresponding to the liquid–liquid phase separation in protein phase diagrams.

Although AcrB and CusA belong to the same protein superfamily, share a similar function and a rather similar behavior in detergent solution, we have not been able to obtain CusA crystals. This can be explained by the low percentage of identity between the two proteins, leading to differences in the solvent exposed surfaces. Some other differences between CusA and AcrB preparations can also be noted. The CusA protein cannot be concentrated without concentrating the detergent at the same time. This may be related to the fact that purified CusA contained some lipids as seen by FTIR analysis. AcrB did not and can be concentrated easily. Moreover, at low protein concentrations, the portion of monomeric DDM–CusA is higher than that of monomeric DDM–AcrB (Fig. 4), which adds to the reluctance of CusA

against crystallization. Greater independence of monomeric DDM–CusA may be an intrinsic property of this protein. Aggregation of RND proteins into trimers may be initiated by intertwining loops of the protomers (corresponding to the loop at amino acid position 212–239 in AcrB). This loop is 6-amino acids shorter in CusA than in AcrB. This could make more difficult the association of CusA into dimers, trimers and heavier oligomers. Accordingly and because FC14 has a stronger dissociating effect than DDM, FC14–CusA preparation was predominantly in the monomeric form that was highly sensitive to proteolytic degradation.

In conclusion, pseudo-heterogeneity of the AcrB preparations was not a contra-indication for crystallization. On the contrary, behavior of DDM–AcrB in conditions that led to crystallization suggests that it is not only necessary to avoid monomerization (use of dissociating detergent or high salt concentration) but furthermore to reach a protein concentration that allows the formation of a mixture of oligomeric forms, including high molecular mass oligomers that could trigger the nucleation. In other words, the quest for the monodispersity is not the good solution to crystallize AcrB or other RND transporters.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. C. Ebel for her help during AUC experiments and interpretation of the AUC data, to Dr. KM Pos for giving us the AcrB overproduction plasmid, to Dr. D. Gaude for access to the FTIR device and to Drs J. Baenziger and J. Sturgis for their help in interpretation of the FTIR data. DS and VS are fellows of the Programme National de Toxicologie Nucléaire Environnementale. This study was also supported by a DFG grant to DHN (Ni262/3) and a PROCOPE grant to JC and DHN for French-German cooperation.

#### References

- [1] D.H. Nies, Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes, *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 313–339.
- [2] T.T. Tseng, K.S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D.H. Nies, A. Goffeau, M.H. Saier Jr., The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1 (1999) 107–125.
- [3] L.J. Piddock, Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance, *Nat. Rev., Microbiol.* 4 (2006) 629–636.
- [4] H. Nikaido, Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 5853–5859.
- [5] S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, A. Yamaguchi, Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB, *Nature* 419 (2002) 587–593.
- [6] E.B. Tikhonova, H.I. Zgurskaya, AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 32116–32124.
- [7] C. Rensing, G. Grass, *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment, *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 197–213.
- [8] S. Franke, G. Grass, C. Rensing, D.H. Nies, Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 3804–3812.
- [9] L.J. Piddock, Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 382–402.
- [10] M.A. Seeger, A. Schiefner, T. Eicher, F. Verrey, K. Diederichs, K.M. Pos,



- Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism, *Science* 313 (2006) 1295–1298.
- [11] S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto, A. Yamaguchi, Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism, *Nature* 443 (2006) 173–179.
- [12] K.M. Pos, K. Diederichs, Purification, crystallization and preliminary diffraction studies of AcrB, an inner-membrane multi-drug efflux protein, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 58 (2002) 1865–1867.
- [13] M. Goldberg, T. Pribyl, S. Juhnke, D.H. Nies, Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26065–26070.
- [14] M. le Maire, P. Champeil, J.V. Moller, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 86–111.
- [15] P. Fourcroy, S. Cuiller, F.C. Largette, C. Lambert, Polyribosome analysis on sucrose gradients produced by the freeze–thaw method, *J. Biochem. Biophys. Methods* 4 (1981) 243–246.
- [16] C.J. daCosta, J.E. Baenziger, A rapid method for assessing lipid:protein and detergent:protein ratios in membrane–protein crystallization, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 59 (2003) 77–83.
- [17] P. Schuck, Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling, *Biophys. J.* 78 (2000) 1606–1619.
- [18] P.H. Brown, P. Schuck, Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation, *Biophys. J.* 90 (2006) 4651–4661.
- [19] E.W. Yu, G. McDermott, H.I. Zgurskaya, H. Nikaido, D.E. Koshland Jr., Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump, *Science* 300 (2003) 976–980.
- [20] K.M. Pos, A. Schiefner, M.A. Seeger, K. Diederichs, Crystallographic analysis of AcrB, *FEBS Lett.* 564 (2004) 333–339.
- [21] E. Cohen, R. Goldshleger, A. Shainskaya, D.M. Tal, C. Ebel, M. le Maire, S.J. Karlish, Purification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid–protein interactions, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16610–16618.
- [22] J. Garcia De La Torre, M.L. Huertas, B. Carrasco, Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure, *Biophys. J.* 78 (2000) 719–730.
- [23] V. Mokhonov, E. Mokhonova, E. Yoshihara, R. Masui, M. Sakai, H. Akama, T. Nakae, Multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*: overexpression, purification, and initial structural characterization, *Protein Expr. Purif.* 40 (2005) 91–100.
- [24] P. Schuck, On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation, *Anal. Biochem.* 320 (2003) 104–124.
- [25] D. Josse, C. Ebel, D. Stroebel, A. Fontaine, F. Borges, A. Echalié, D. Baud, F. Renault, M. Le Maire, E. Chabrieres, P. Masson, Oligomeric states of the detergent-solubilized human serum paraoxonase (PON1), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 33386–33397.
- [26] L.E. Fisher, D.M. Engelman, J.N. Sturgis, Effect of detergents on the association of the glycophorin a transmembrane helix, *Biophys. J.* 85 (2003) 3097–3105.
- [27] A. Zouni, J. Kern, J. Frank, T. Hellweg, J. Behlke, W. Saenger, K.D. Irgang, Size determination of cyanobacterial and higher plant photosystem II by gel permeation chromatography, light scattering, and ultracentrifugation, *Biochemistry* 44 (2005) 4572–4581.
- [28] C. Hamiaux, J. Perez, T. Prange, S. Veessler, M. Ries-Kautt, P. Vachette, The BPTI decamer observed in acidic pH crystal forms pre-exists as a stable species in solution, *J. Mol. Biol.* 297 (2000) 697–712.
- [29] W. Kadima, A. McPherson, M.F. Dunn, F.A. Jurnak, Characterization of precrystallization aggregation of canavalin by dynamic light scattering, *Biophys. J.* 57 (1990) 125–132.

