



HAL
open science

Structure, dynamique moléculaire et sélectivité de métallochaperones à cuivre et à mercure

David Poger

► **To cite this version:**

David Poger. Structure, dynamique moléculaire et sélectivité de métallochaperones à cuivre et à mercure. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00349257

HAL Id: tel-00349257

<https://theses.hal.science/tel-00349257v1>

Submitted on 26 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier – Grenoble I

THÈSE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Discipline : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

David POGER

Le 13 décembre 2005

*STRUCTURE, DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE
ET SÉLECTIVITÉ DE MÉTALLOCHAPERONES
À CUIVRE ET À MERCURE*

Directeurs de thèse :

Dr. Serge CROUZY

Dr. Michel FERRAND

Dr. Florent GUILLAIN

Composition du Jury :

Pr. Mark E. CASIDA	Président
Dr. Monique GENEST	Rapporteur
Dr. Christophe DEN AUWER	Rapporteur
Dr. Patricia AMARA	Examineur
Dr. Serge CROUZY	Examineur
Dr. Florent GUILLAIN	Examineur

Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire
Département de Réponse et Dynamique Cellulaires - CEA Grenoble
UMR 5090 CNRS/CEA/UJF

Université Joseph Fourier – Grenoble I

THÈSE

*STRUCTURE, DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE
ET SÉLECTIVITÉ DE MÉTALLOCHAPERONES
À CUIVRE ET À MERCURE*

Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire
Département de Réponse et Dynamique Cellulaires - CEA Grenoble
UMR 5090 CNRS/CEA/UJF



*Le commencement de toutes les sciences,
c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont.
Métaphysique, Aristote*

Remerciements

*J*e tiens à remercier en tout premier lieu Michel Ferrand et Serge Crouzy pour avoir assuré l'encadrement de ma thèse au cours de ces trois années. Leur accueil, leurs conseils, leur disponibilité, leur bonne humeur et leur enthousiasme pour la recherche, mais pas seulement!, ont été très précieux et très encourageants, même dans les moments les plus difficiles où *Atx1* ne se laissait pas simuler facilement! Je leur suis reconnaissant de m'avoir fait confiance et laissé autant de liberté dans la conduite de mon projet de thèse. Le retard au démarrage n'enlève rien aux bons moments passés en leur compagnie.

Je les remercie de m'avoir permis d'assister à deux congrès internationaux et de suivre la formation HERCULES.

Je leur adresse également mes remerciements pour leurs nombreux conseils, tant en programmation IDL, en CHARMM-scripting ou en physique qu'en géographie alpine ou ardéchoise, ou en gastronomie et en vins.

Serge, merci pour ta bonne humeur quotidienne agrémentés de jeux de mots.

Michel, merci pour tes multiples conseils très rassurants, et également pour les visites touristiques que tu as assurées quand nous allions à Marcoule.

Je remercie également vivement Florent Guillain pour m'avoir accueilli durant ces trois années au sein du laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire du Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble, et pour m'avoir permis d'y effectuer une thèse dans de très bonnes conditions, tant humaines que matérielles.

Je remercie très sincèrement Monique Genest et Christophe Den Auwer de me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie Monique pour ses multiples conseils depuis mon DEA, à Orléans, et ensuite au cours de la thèse quand les simulations posaient quelques problèmes. Christophe, tu m'as appris tout ce que je sais dans le domaine de l'absorption de rayons X. Je t'adresse de vifs remerciements pour ton enthousiasme et ta bonne humeur, même après plusieurs heures passées à l'ESRF à attendre que le faisceau se stabilise, ainsi que pour ton accueil à Marcoule et à Avignon.

Je remercie également Patricia Amara et Mark Casida d'avoir accepté de prendre part au jury de cette thèse.

Les expériences d'absorption de rayons X ont été réalisés à la ligne de lumière BM30B/FAME de l'ESRF sous l'encadrement de Jean-Louis Hazemann, d'Olivier Proux et de Jean-Jacques Menthonnex. Je les remercie pour leur bon accueil. Leur aide et leur disponibilité ont également contribué à la réussite des mesures réalisées au cours des deux temps de faisceaux qui nous avaient été accordés durant cette thèse.

J'exprime aussi mes remerciements à Françoise Vovelle et à Daniel Genest qui m'ont mis le pied à l'étrier en biophysique et en simulation à Orléans. Ils ont toujours été de bons conseils, même après avoir quitté Orléans.

J'adresse également mes profonds remerciements à Francis Rondelez et à Nicolas

Faure à l'Institut Curie, à Paris, qui m'ont encouragé à poursuivre mes études en biophysique.

Et aussi...

Merci à mes parents et à mes frères pour leur soutien permanent depuis le début. Nicolas, tu avais vite compris en quoi la recherche consistait alors que tu n'avais que six ou huit ans : «chercher ce que je n'ai pas trouvé». Je ne sais pas si j'ai trouvé quelque chose, mais je vais essayer de chercher encore...

Merci à Charles. Je te dois beaucoup. Tu m'entends parler de recherche et de thèse depuis longtemps. Ça y est, la thèse est finie. Que de temps passé et d'épreuves surmontées depuis que l'on se connaît ! Je t'adresse toute mon amitié et ma gratitude pour tout.

Merci à Matthieu, à Sébastien, à Damien et à Anne-Emmanuelle pour votre présence, vos encouragements, votre aide, votre écoute et vos conseils quand ils se sont montrés nécessaires. J'ai beaucoup de chance de vous avoir rencontrés.

Merci aux «Herculéens 2003», de Grenoble : Manuel, Diane, Guillaume, Aude, Thierry, Elisa et Laura, et d'ailleurs : Axel, Jan-Willem, Thomas, Martin et Ville. Axel, malgré la distance, le contact est resté entre nous. Un immense Tak ! pour tes conseils «avisés» sur les bien-vivre, bien-manger et bien-penser du bon PhD student et pour tous les très bons moments passés ensemble à Grenoble, à Paris, à Copenhague et à Roskilde. A bientôt, à Brisbane ou à Sydney !

et Merci à tout le monde pour tous ces très agréables instants passés ensemble et qui ont contribué à faire de ces trois années à Grenoble une période très riche, très festive et inoubliable. Donc, un énorme Merci !, notamment à Johanna «Jo», Anne-Emmanuelle, David «Dave», Marie, Aurore, Dorothee, aux Quatre As du LETI – Damien «Dam», Matthieu «Matmax», Sébastien «Seb» et Philippe «Philou» –, à Samia, Edouard, Karine, Caroline (les trois, «Caro», «Caro-K» et «Caro-C5»), Ludovic, aux «Copper Girls» – Isabelle «Isa», Martine et Jenny –, à Camille, Grégory (les deux), Julien, Estelle, Jean «Jano», Cristina, Béatrice «Dame Béa», Rachel, Hélène «Poki», Fabienne, à tout le BMC et à toutes les autres personnes que j'ai oubliées, car forcément, j'en ai oubliés... Qu'ils me pardonnent !

... sans oublier Merci à Vénéon et à Nickel sans qui les calculs de dynamique moléculaire à la main auraient pris beaucoup, beaucoup trop de temps ! Je remercie aussi tout spécialement Isaac Newton, Albert Einstein et Linus Pauling entre autres, qui ont contribué à ce travail dans une large part en le rendant possible.

Table des matières

I	Introduction	1
1	Les Métaux dans la Cellule	3
1.1	Les métalloprotéines	3
1.2	Le cuivre	4
1.2.1	Un élément essentiel	4
1.2.2	Un élément essentiel, mais toxique	5
1.2.3	Un élément essentiel, mais jamais libre	6
1.2.4	La nécessité de chaperones à cuivre	7
1.2.5	Les métallochaperones dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.2.5.1	Importation du cuivre dans la cellule	7
1.2.5.2	Acheminement du cuivre	8
1.2.6	Les métallochaperones à cuivre chez les autres organismes . .	10
1.3	Le mercure	11
1.3.1	Mécanismes de résistance dépendants de l'opéron <i>mer</i>	11
1.3.2	Mécanismes de résistance indépendants de l'opéron <i>mer</i>	13
1.4	Des métallochaperones pour d'autres métaux ?	13
2	Les Métallochaperones de la Famille d'Atx1	15
2.1	Des structures homologues	15
2.2	Des séquences homologues	16
2.3	Environnement du métal	19
2.3.1	Coordination du cuivre(I)	19
2.3.1.1	Coordination par Atx1	19
2.3.1.2	Coordination par CopZ chez <i>Enterococcus hirae</i>	20
2.3.1.3	Coordination par CopZ chez <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.3.1.4	Coordination par Hah1	21
2.3.1.5	Coordination par ScAtx1	21
2.3.2	Coordination du mercure(II)	22
2.3.3	Quelle(s) coordination(s) <i>in vivo</i> ?	23
2.4	Les ATPases partenaires	24
2.5	Interaction(s) avec les ATPases	24
2.6	Modèle de transfert du métal de la métallochaperone à l'ATPase cible	28
3	Sélectivité de la Complexation des Métaux par les Métallochaperones	29
3.1	Bases de la sélectivité	29

3.2	Une sélectivité relative <i>in vitro</i>	30
3.2.1	Une protéine, différents métaux, différentes géométries	30
3.2.2	Une protéine, différents métaux, des géométries proches	30
3.2.3	Des protéines différentes, un métal, des géométries proches	31
3.3	Les déterminants de la sélectivité	32
3.3.1	Les ligands protéiques	32
3.3.2	La protéine	33
3.3.3	Le milieu intracellulaire : rôle dans la sélectivité	34
4	Objectifs de la Thèse	37
II	Outils et Méthodologies	39
5	La Dynamique Moléculaire	41
5.1	La mécanique moléculaire	43
5.1.1	Principe	43
5.1.2	Le champ de forces	44
5.1.2.1	Expression générale	44
5.1.2.2	Les liaisons hydrogène	46
5.1.3	Paramétrisation de CHARMM	47
5.1.3.1	Philosophie de la paramétrisation	47
5.1.3.2	Procédure de développement de paramètres	48
5.1.4	Nouveaux paramètres pour l'interaction cystéine–métal	50
5.1.4.1	Choix des composés modèles	50
5.1.4.2	Calcul des charges atomiques partielles	50
5.1.4.3	Calcul des paramètres de van der Waals des métaux	51
5.1.4.4	Ajustement des termes liés	53
5.2	La dynamique moléculaire	54
5.2.1	Dynamique newtonienne	54
5.2.2	Dynamique de Langevin	56
5.3	Techniques numériques de dynamique moléculaire	57
5.3.1	Intégration du temps	57
5.3.2	Conditions initiales	58
5.3.3	Durée du pas de temps	59
5.3.4	Conditions aux limites	59
5.3.5	Traitement des interactions à longue distance	60
5.3.5.1	Convention de l'image minimale	61
5.3.5.2	Troncature sphérique	61
5.3.5.3	Calculs des forces électrostatiques	62
5.3.6	Contrôle de la température	65
5.3.7	Contrôle de la pression	66
5.4	Protocole de simulation	67
5.5	Analyse des simulations de dynamique moléculaire	69
5.5.1	RMSD et RMSF	69
5.5.2	Carte des corrélations croisées dynamiques	70
5.5.3	Liaisons hydrogène	71

5.5.4	Repliement des protéines	71
5.5.5	Accessibilité au solvant	73
5.5.6	Estimation de l'erreur statistique sur une moyenne	73
6	L'Absorption de Rayons X	75
6.1	Interactions des rayons X avec la matière	76
6.1.1	Règle d'or de Fermi	77
6.1.2	Seuils d'absorption atomiques	77
6.1.3	Transitions atomiques	78
6.2	Spectroscopies d'absorption de rayons X	78
6.2.1	XANES et EXAFS	78
6.2.2	Equation simplifiée de l'EXAFS	79
6.2.3	Traitement des données EXAFS	80
6.2.4	Extraction du signal EXAFS	80
6.2.5	Transformée de Fourier	81
6.2.6	Analyse des données EXAFS	81
6.3	Mise en œuvre expérimentale	82
6.4	Expériences d'absorption de rayons X du Cu ^(I)	83
III	Résultats	87
7	Résultats des Simulations de Dynamique Moléculaire	89
7.1	Détermination de la phase d'équilibration	89
7.1.1	Stabilité des paramètres de simulation	90
7.1.1.1	Pression	90
7.1.1.2	Energies et température	92
7.1.2	Comportement des protéines simulées	94
7.1.2.1	Simulations d'apoAtx1	94
7.1.2.2	Simulation d'apoHah1	106
7.1.2.3	Simulations des formes métallées d'Atx1	109
7.2	Validation des paramètres du champ de forces du Cu ^(I) et du Hg ^(II)	113
7.2.1	Cu ^(I) dans CuHah1	113
7.2.2	Hg ^(II) dans HgAtx1	115
7.3	Effets globaux et locaux de la liaison des métaux aux métallochaperones	117
7.3.1	Liaison du Cu ^(I) sur les chaperones à cuivre, Hah1 et Atx1	117
7.3.1.1	Repliement des protéines	117
7.3.1.2	Effets dynamiques	118
7.3.1.3	Effets structuraux	124
7.3.1.4	Accessibilité au solvant	125
7.3.2	Liaison du Hg ^(II) sur une chaperone à mercure, MerP	129
7.3.2.1	Repliement de MerP	129
7.3.2.2	Effets dynamiques	129
7.3.2.3	Effets structuraux	131
7.3.2.4	Accessibilité au solvant	131
7.3.3	Effet de la nature du métal	135
7.3.3.1	Repliement des protéines	135

7.3.3.2	Effets dynamiques	136
7.3.3.3	Effets structuraux	138
7.3.3.4	Accessibilité au solvant	143
7.4	La méthionine du motif MTCXXC et le cœur hydrophobe	147
7.4.1	Définition du cœur hydrophobe	147
7.4.2	Propriétés dynamiques et structurales du cœur hydrophobe	148
7.4.2.1	Mobilité des atomes C_α du cœur hydrophobe	148
7.4.2.2	Structure du cœur hydrophobe	148
7.4.2.3	Interactions de van der Waals	149
7.4.3	Mutants M10A et M10S d'Hah1	151
7.4.3.1	Mobilité des atomes C_α du cœur hydrophobe	151
7.4.3.2	Structure du cœur hydrophobe	153
7.4.3.3	Accessibilité au solvant	155
7.4.3.4	Interactions de van der Waals avec le cœur hydrophobe	156
7.5	Interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 des métallochaperones	158
7.5.1	Interactions entre L_1 , L_3 et L_5 dans Hah1	159
7.5.1.1	Dans apoHah1	159
7.5.1.2	Dans CuHah1	160
7.5.1.3	Dans HgHah1	161
7.5.2	Comparaison avec Atx1 et MerP	163
7.5.2.1	Interactions dans Atx1	163
7.5.2.2	Interaction dans MerP	164
8	Résultats des Expériences d'Absorption de Rayons X	167
8.1	XANES des sites $Cu^{(I)}$	167
8.1.1	Composés modèles	167
8.1.2	Echantillons d'intérêt biologique	169
8.2	Analyse de l'EXAFS	171
8.2.1	Affinement des oscillations EXAFS expérimentales	171
8.2.2	Distribution radiale des atomes voisins du $Cu^{(I)}$	173
8.2.3	Modèles de complexation du $Cu^{(I)}$ par le glutathion et Atx1	176
8.2.3.1	Les complexes Cu-glutathion	176
8.2.3.2	Modèles pour la complexation du $Cu^{(I)}$ par Atx1	178
IV	Discussion	181
9	Discussion	183
9.1	Complexation du $Cu^{(I)}$ et $Hg^{(II)}$ dans une géométrie digonale 2S	184
9.1.1	Chélation du métal natif	185
9.1.1.1	Une dynamique réduite dans les holoprotéines	185
9.1.1.2	Dynamique des ligands cystéinates du motif MXCXXC	186
9.1.1.3	Des effets structuraux variables	187
9.1.1.4	Un réseau d'interactions riche entre les boucles L_1 , L_3 et L_5	188
9.1.2	Chélation du métal non natif	191
9.1.2.1	Une dynamique différente dans les holoprotéines	191

9.1.2.2	Une structuration globale et locale des holoprotéines	192
9.1.2.3	Un réseau d'interactions dépendant du métal	193
9.1.3	Existe-t-il une sélectivité de la chélation d'un métal?	194
9.2	Un modèle de sélectivité pour le Cu ^(I)	195
9.2.1	Propriétés de complexation du Cu ^(I) par Atx1 <i>in vitro</i>	195
9.2.2	Propriétés de complexation du Cu ^(I) <i>in vivo</i>	195
9.3	Rôle pivot de la méthionine du motif MXCXXC	196
9.4	Un modèle d'interaction d'Atx1 avec Ccc2	197

V Conclusion et Perspectives

201

Table des figures

1.1	Formes réduite et oxydée du glutathion	6
1.2	Voies d'acheminement du cuivre par les métallochaperones chez <i>S. cerevisiae</i>	8
1.3	Mécanismes de résistance au mercure dépendants de l'opéron <i>mer</i>	12
2.1	Structures génériques des métallochaperones de la famille d'Atx1	16
2.2	Alignement des séquences de protéines homologues à Atx1 à partir de la séquence d'Atx1	17
2.3	Alignement des séquences de domaines de liaison de métal homologues à Ccc2a à partir de la séquence de Ccc2a	25
2.4	Surfaces électrostatiques de CuCcc2a, de CuAtx1 et d'AgMnk4	26
2.5	Complémentarité des surfaces électrostatiques d'Atx1 et de Ccc2a	27
2.6	Mécanisme modèle pour le transfert du cuivre(I) entre une métallochaperone et un MBD d'une ATPase cible	28
3.1	Géométrie du site métallique de l'anhydrase carbonique II en présence de Zn^{2+} , Co^{2+} et Cu^{2+}	31
3.2	Géométrie des sites Zn de l'anhydrase carbonique II et Cu_B de la <i>ba3</i> -cytochrome <i>c</i> oxydase	32
3.3	Arrangement tridimensionnel des résidus de la seconde sphère de coordination du Zn^{2+} dans l'anhydrase carbonique II.	34
5.1	Illustration des termes liés dans le champ de forces de CHARMM	45
5.2	Illustration des termes non liés dans le champ de forces de CHARMM	46
5.3	Composés modèles utilisés pour le développement de paramètres pour l'interaction $M \cdot Cys_2$ ($M=Cu^{(I)}, Hg^{(II)}$)	50
5.4	Carte des valeurs de la fonction d'évaluation des charges du complexe $Cu(SCH_3)_2$	52
5.5	Profils des énergies totales et de van der Waals calculés <i>ab initio</i> et avec CHARMM pour l'interaction $Hg(SCH_3)_2-H_2O$ en fonction de la distance $Hg^{(II)}-O$	52
5.6	Profils des énergies de liaison Cu-S calculés <i>ab initio</i> et avec CHARMM	54
5.7	Schéma de principe de l'algorithme du <i>leapfrog</i>	59
5.8	Représentation bidimensionnelle des conditions aux limites périodiques	60
5.9	Représentation de la convention d'image minimale	61
5.10	Fonctions de troncature sphérique utilisées en mécanique moléculaire	63
5.11	Représentation des composantes d'une somme d'Ewald	64
5.12	Principe de la méthode <i>particle-mesh Ewald</i>	65

5.13	Schéma de la boîte de simulation	69
5.14	Illustration de la corrélation entre deux mouvements atomiques	71
5.15	Illustration des paramètres géométriques définissant les liaisons hydrogène	71
5.16	Illustration de la surface accessible au solvant d'une molécule selon la méthode de Lee et Richards.	73
6.1	Processus d'interaction des rayons X avec la matière	77
6.2	Représentation schématique des chemins de diffusion dans un cluster d'atomes	80
6.3	Montages expérimentaux de la mesure du signal XAFS en transmission et en fluorescence	83
6.4	Schéma technique de la ligne FAME à l'ESRF	84
6.5	Complexes modèles Cu ^(I) -thiolates utilisés pour les expériences d'absorption des RX	85
7.1	Evolution temporelle de la pression P dans la boîte de simulation d'apoHah1	91
7.2	Evolution temporelle de la dimension a de la boîte de simulation d'apoHah1	92
7.3	Evolution temporelle de l'énergie totale du système d'apoHah1	93
7.4	Evolutions temporelles des énergies d'apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_1 et \mathcal{S}_2	95
7.5	Evolutions temporelles des RMSD au cours de \mathcal{S}_1	96
7.6	Evolution temporelle des éléments de structure secondaire au cours de \mathcal{S}_1	96
7.7	Evolutions des probabilités de formation des liaisons hydrogène entre β_1 et β_4 au cours de \mathcal{S}_1	97
7.8	Structures secondaires des 35 conformations expérimentales d'apoAtx1	98
7.9	Evolutions des probabilités de formation des liaisons hydrogènes entre β_1 et β_4 au cours de \mathcal{S}_3	99
7.10	Evolution des distances entre les atomes O et H des brins β_1 et β_4 au cours de \mathcal{S}_1	99
7.11	Evolutions temporelles des énergies d'apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_5	101
7.12	Evolution temporelle des éléments de structure secondaire au cours de \mathcal{S}_5	101
7.13	Evolution temporelle des RMSD par rapport à la structure initiale 1FES ^{exp} ₈ au cours de \mathcal{S}_5	102
7.14	Evolution temporelle des RMSD par rapport à la structure moyenne de la phase de production au cours de \mathcal{S}_5	103
7.15	Action des contraintes de type NOE entre les atomes O ^{Q8} et H ^{K71} , et O ^{K71} et H ^{Q8} au cours de \mathcal{S}_5	104
7.16	RMSF des atomes C _{α} des résidus d'apoAtx1 au cours de la phase de production de \mathcal{S}_5 et pour les 35 structures expérimentales 1FES ^{exp}	105
7.17	Evolutions temporelles des RMSD par rapport à la structure moyenne de la phase de production de la simulation d'apoHah1 et par rapport à la structure RMN 1TL5 ^{exp} ₁	107

7.18	Evolution temporelle des éléments de structure secondaire au cours de la simulation d'apoHah1	108
7.19	Action des contraintes de type NOE entre les atomes O^{Q8} et H^{K71} , et O^{K71} et H^{Q8} au cours de la simulation \mathcal{S}_2 de CuAtx1.	110
7.20	Facteurs B simulés et cristallographiques des atomes C_α d'HgAtx1 . .	112
7.21	Nombres d'atomes C, N, O et S environnant l'ion $Cu^{(I)}$ dans CuHah1 en fonction de la distance $r_{Cu,L}$ entre le $Cu^{(I)}$ et l'atome L (L=C,N,O,S)	114
7.22	Nombres d'atomes C, N, O et S environnant l'ion $Hg^{(II)}$ dans HgAtx1 en fonction de la distance $r_{Hg,L}$ entre le $Hg^{(II)}$ et l'atome L (L=C,N,O,S)	116
7.23	RMSF des atomes C_α des résidus des formes apo et liées au $Cu^{(I)}$ d'Hah1 et d'Atx1	119
7.24	Carte des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α d'apoHah1	121
7.25	Carte des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α d'apoAtx1	122
7.26	Cartes des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α de CuHah1 et de CuAtx1	123
7.27	Superposition des structures moyennes d'apoAtx1 et de CuAtx1 . . .	125
7.28	Surfaces relatives accessibles au solvant des chaînes latérales des résidus d'apoHah1 et d'apoAtx1	126
7.29	Variations de la surface relative accessible au solvant des chaînes latérales des résidus d'Hah1 et d'Atx1 lorsque le $Cu^{(I)}$ est lié	127
7.30	RMSF des atomes C_α des résidus des formes apo et liée au $Hg^{(II)}$ de MerP	130
7.31	Cartes des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α d'apoMerP et d'HgMerP	132
7.32	Superposition des structures moyennes simulées et expérimentales d'apoMerP et d'HgMerP	133
7.33	Variations de la surface relative accessible au solvant des chaînes latérales des résidus de MerP lorsque le $Hg^{(II)}$ est lié	134
7.34	Variations des RMSF des atomes C_α entre les formes holo ($Cu^{(I)}$, $Hg^{(II)}$) et apo d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	136
7.35	Carte des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α de CuMerP	138
7.36	Cartes des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α de HgHah1 et de HgAtx1	139
7.37	Superposition des structures moyennes du motif MTCXXC pour chacun des états de métallation d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	143
7.38	Variations de la surface relative accessible des chaînes latérales des résidus entre les formes holo ($Cu^{(I)}$, $Hg^{(II)}$) et apo d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	144
7.39	Surfaces relatives accessibles moyennes des chaînes latérales du motif MTCXXC d'Atx1 calculées à partir des structures simulées et expérimentales	146
7.40	Alignement des séquences d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	148

7.41	Superposition des résidus du cœur hydrophobe des formes apo et holo d'Atx1 et d'Hah1	150
7.42	Energies d'interaction de van der Waals de la méthionine 10 avec les autres résidus d'Hah1 dans les formes apo et holo	150
7.43	Variations des RMSF des C_α entre les formes mutantes et sauvages d'apo- et de CuHah1	153
7.44	Variations des RMSF des C_α entre les formes $Cu^{(I)}$ et apo des protéines Hah1 sauvage et mutantes	154
7.45	Superpositions des motifs XTGCCG des formes $Cu^{(I)}$ des protéines Hah1 sauvage et mutantes	155
7.46	Superpositions des structures moyennes des formes apo et $Cu^{(I)}$ des protéines Hah1 sauvages et mutantes	156
7.47	Energies d'interaction de van der Waals du résidu 10 avec les autres résidus d'Hah1 dans les formes apo et holo	157
7.48	Energies d'interaction des résidus M10, L35, K38 et K60 d'Hah1 avec les autres résidus dans les formes apo et métallées	159
7.49	Interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 dans apoHah1	160
7.50	Interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 dans CuHah1	161
7.51	Interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 dans HgHah1	162
7.52	Alignement des séquences d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	165
8.1	Spectres XANES normalisés des complexes modèles du $Cu^{(I)}$ au seuil K du Cu	168
8.2	Spectres XANES normalisés des complexes A , B et C au seuil K du Cu	170
8.3	Oscillations du signal EXAFS des complexes A , B et C	171
8.4	Amplitude de la TF de $k\chi(k)$ du complexe $Cu^{(I)}$ -glutathion	173
8.5	Amplitude de la TF de $k\chi(k)$ du complexe $Cu^{(I)}$ -Atx1 en absence de glutathion	174
8.6	Amplitude de la TF de $k\chi(k)$ du complexe $Cu^{(I)}$ -Atx1 en présence de glutathion	174
8.7	Polymère de glutathion déterminée par Vortisch <i>et al.</i>	177
8.8	Entité monomérique Cu_2S_4 du polymère de glutathion proposé à partir de nos résultats	177
8.9	Modèle du site de la géométrie 2S+O du $Cu^{(I)}$ dans Atx1 en absence de glutathion	179
8.10	Modèles possibles du complexe C $Cu^{(I)}$ -Atx1 en présence de glutathion	179
9.1	Modèles d'interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 dans apoBsCopZ	189
9.2	Modèles d'interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 dans CuBsCopZ	191
9.3	Mécanisme de transfert du cuivre(I) entre une métallochaperone et un MBD d'une ATPase cible	198
9.4	Modèles proposés pour l'homodimère glutathion-dépendant de CuAtx1	199

Liste des tableaux

2.1	Liste des structures de métallochaperones à cuivre ou à mercure résolues	18
2.2	Tableau récapitulatif des coordinations du $\text{Cu}^{(I)}$ chez les métallochaperones à cuivre.	22
3.1	Distances métal–ligand dans les sites métalliques de l’anhydrase carbonique II en présence de Zn^{2+} , Co^{2+} et Cu^{2+}	31
3.2	Distances métal–ligand dans les sites métalliques de la ba_3 -cytochrome c oxydase et de l’anhydrase carbonique II	32
5.1	Caractéristiques de quelques mouvements de protéines	42
5.2	Charges atomiques partielles calculés pour les complexes modèles diméthylthiolato- M^{n+}	51
5.3	Paramètres des termes liés des complexes $\text{M}\cdot\text{Cys}_2$ ($\text{M}=\text{Cu}^{(I)}, \text{Hg}^{(II)}$)	55
5.4	Tableau récapitulatif des simulations réalisées	68
6.1	Comparaison des distances Cu-ligands de l’azurine II oxydée et réduite obtenues par cristallographie X et EXAFS	76
7.1	Dimensions moyennes des boîtes de simulation d’apoAtx1 et d’apoHah1.	92
7.2	Energies et températures moyennes d’apoAtx1 et d’apoHah1 durant les phases de production.	93
7.3	Energies et températures moyennes d’apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_1 et \mathcal{S}_2	95
7.4	Éléments de structure secondaire d’apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_5 et de la structure $1\text{FES}_8^{\text{exp}}$	102
7.5	Effet des contraintes de type NOE sur les atomes ($\text{O}^{\text{Q8}}, \text{H}^{\text{K71}}$) et ($\text{O}^{\text{K71}}, \text{H}^{\text{Q8}}$) d’apoAtx1 au cours de la simulation \mathcal{S}_5	103
7.6	Résumé des résultats des analyses de stabilité des simulations d’apoAtx1	106
7.7	Éléments de structure secondaire d’apoHah1 simulée et publiée	108
7.8	Éléments de structure secondaire de CuAtx1 simulée et publiée	109
7.9	Effet des contraintes de type NOE sur les atomes ($\text{O}^{\text{Q8}}, \text{H}^{\text{K71}}$) et ($\text{O}^{\text{K71}}, \text{H}^{\text{Q8}}$) de CuAtx1 au cours de la simulation \mathcal{S}_2	110
7.10	Effet des contraintes de type NOE sur les atomes ($\text{O}^{\text{Q8}}, \text{H}^{\text{K71}}$) et ($\text{O}^{\text{K71}}, \text{H}^{\text{Q8}}$) d’HgAtx1 au cours de la simulation \mathcal{S}_2	111
7.11	Éléments de structure secondaire d’HgAtx1 simulée et publiée	111
7.12	Géométrie simulée et déterminée par EXAFS du $\text{Cu}^{(I)}$ dans CuHah1	113
7.13	Géométrie simulée et déterminée par EXAFS [Pufahl <i>et al.</i> , 1997] et cristallographie [Rosenzweig <i>et al.</i> , 1999] du $\text{Hg}^{(II)}$ dans HgAtx1	115

7.14	Eléments de structure secondaire d'Hah1 simulée dans les formes apo et liée au Cu ^(I)	118
7.15	RMSD des positions des atomes du squelette peptidique entre les formes apo et Cu ^(I) d'Hah1 et d'Atx1	124
7.16	Eléments de structure secondaire de MerP simulée sous les formes apo et liée au Hg ^(II)	129
7.17	RMSD des positions des atomes du squelette peptidique entre les formes apo et Hg ^(II) de MerP simulée et expérimentale	131
7.18	Eléments de structure secondaire d'HgHa1, d'HgAtx1 et de CuMerP .	135
7.19	RMSD des positions des atomes du squelette peptidique entre les formes apo et Hg ^(II) d'Atx1 et d'Hah1	140
7.20	RMSD des positions des atomes du squelette peptidique entre les formes apo et Cu ^(I) de MerP	140
7.21	RMSD des positions des atomes du squelette peptidique entre les formes Cu ^(I) et Hg ^(II) d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	141
7.22	RMSD des positions des atomes du motif MXCXXC entre les formes apo et métallées et entre les formes métallées d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	142
7.23	RMSD des positions des atomes du motif MXCXXC entre Hah1, Atx1 et MerP.	142
7.24	Surfaces relatives accessibles moyennes des chaînes latérales des cystéines du motif MTC ¹ XXC ² d'Hah1, d'Atx1 et de MerP simulées sous les formes apo et holo	145
7.25	RMSD des positions des atomes lourds du cœur hydrophobe dans les formes apo et holo d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	149
7.26	RMSD des positions des atomes lourds du cœur hydrophobe des formes holo d'Hah1, d'Atx1 et de MerP par rapport aux apostructures moyennes correspondantes	149
7.27	RMSF des positions des résidus du cœur hydrophobe dans les formes apo et holo des mutants M10A et M10S d'Hah1	152
7.28	RMSD des positions des atomes du squelette peptidique entre les structures moyennes d'Hah1 ^{WT} et des mutants.	154
7.29	RMSD des positions des atomes lourds du cœur hydrophobe des mutants M10A et M10S d'Hah1	155
7.30	Interactions de van der Waals dans le cœur hydrophobe des formes sauvages et mutantes d'apoHah1	157
8.1	Energies caractéristiques des spectres XANES des composés modèles	169
8.2	Energies caractéristiques des spectres XANES des composés d'étude A , B et C	169
8.3	Paramètres finaux obtenus pour l'affinement des oscillations EXAFS des complexes A , B et C	173
9.1	RMSD des positions des atomes du squelette peptidique du motif MXCXXC entre les formes apo et métallées d'Hah1, d'Atx1 et de MerP	193
9.2	Occurrence des complexes MS _n (n = 3, 4) pour Cu ^(I) , Hg ^(II) , Zn ^(II) , Cd ^(II) , Co ^(II) , Ni ^(II) , Fe ^(III) et Cr ^(III) trouvées dans la CSD	199

Liste des abréviations

CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Molecular Mechanics</i>
XANES	<i>X-ray Absorption Near Edge Structure</i>
EXAFS	<i>Extended X-ray Absorption Fine Structure</i>
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation,</i> écart quadratique moyen
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation,</i> fluctuation quadratique moyenne
DCCM	<i>Dynamical Cross-Correlation Map,</i> carte des corrélations croisées dynamiques
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect,</i> effet Overhauser nucléaire
MBD	<i>Metal-Binding Domain,</i> domaine de liaison du métal

Acides aminés

Ala	A	Alanine	Leu	L	Leucine
Arg	R	Arginine	Lys	K	Lysine
Asp	D	Acide aspartique	Met	M	Méthionine
Asn	N	Asparagine	Phe	F	Phénylalanine
Cys	C	Cystéine	Pro	P	Proline
Glu	E	Acide glutamique	Ser	S	Sérine
Gln	Q	Glutamine	Thr	T	Thréonine
Gly	G	Glycine	Trp	W	Tryptophane
His	H	Histidine	Tyr	Y	Tyrosine
Ile	I	Isoleucine	Val	V	Valine
Asx		Acide Aspartique ou Asparagine			
Glx		Acide glutamique ou Glutamine			

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Les Métaux dans la Cellule

Le Cuivre et le Mercure

Sommaire

1.1	Les métalloprotéines	3
1.2	Le cuivre	4
1.2.1	Un élément essentiel	4
1.2.2	Un élément essentiel, mais toxique	5
1.2.3	Un élément essentiel, mais jamais libre	6
1.2.4	La nécessité de chaperones à cuivre	7
1.2.5	Les métallochaperones dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.2.6	Les métallochaperones à cuivre chez les autres organismes	10
1.3	Le mercure	11
1.3.1	Mécanismes de résistance dépendants de l'opéron <i>mer</i>	11
1.3.2	Mécanismes de résistance indépendants de l'opéron <i>mer</i>	13
1.4	Des métallochaperones pour d'autres métaux ?	13

1.1 Les métalloprotéines

Les métaux jouent des rôles fondamentaux chez l'ensemble des êtres vivants où ils sont complexés à des molécules biologiques : le cobalt dans la cobalamine (vitamine B₁₂) essentielle au métabolisme des acides nucléiques, le magnésium dans la chlorophylle des organismes photosynthétiques, le cuivre dans l'hémocyanine des mollusques et des arthropodes, le fer dans l'hémoglobine des mammifères *etc.*

Environ un tiers des protéines connues à ce jour contiennent un cofacteur métallique. La plupart d'entre elles sont des métalloenzymes indispensables à la survie de la cellule, telles que les complexes protéiques de la chaîne respiratoire de la mitochondrie où l'on trouve notamment de nombreux centres Fe-S, du fer associé à des hèmes, ainsi que du cuivre localisé dans la cytochrome *c* oxydase par exemple. Malgré les rôles fondamentaux que peuvent remplir les métalloprotéines, les mécanismes moléculaires de leur biosynthèse et de leur structuration demeurent mal connus.

En effet, le repliement d'une métalloprotéine dans la cellule nécessite plusieurs étapes après la synthèse de la chaîne polypeptidique : séquestration du métal par un facteur cellulaire, reconnaissance de l'apoprotéine cible, dépliement de l'apoprotéine, insertion du métal au bon endroit dans la protéine, et enfin, renaturation de l'holoprotéine dans une conformation fonctionnelle et active. Le problème posé par la mise en œuvre *in vivo* de la succession de ces étapes n'est pas trivial. Il l'est d'autant moins quand une protéine comme la Cu,Zn-superoxyde dismutase (ou SOD1) nécessite deux ions métalliques, ou quand la NADH déshydrogénase du complexe I de la chaîne mitochondriale compte 8 à 10 centres Fe-S soit jusqu'à 24 atomes de fer.

En outre, les concentrations intracellulaires en métaux s'avèrent finement régulées. Le maintien de l'homéostasie cellulaire des métaux est un processus de régulation extrêmement contrôlé et complexe. Les mécanismes de régulation de l'homéostasie qui interviennent interfèrent entre eux. Bien que certains métaux soient essentiels (Fe, Cu, Co, Mo *etc*), ils se révèlent particulièrement toxiques lorsqu'ils sont en excès. La cellule doit également pouvoir se défendre contre les métaux lourds non physiologiques comme le mercure et le cadmium. Les métallothionéines sont ainsi utilisées pour séquestrer l'excès de cuivre ou de zinc, mais aussi pour la détoxification de métaux non physiologiques tels que le cadmium [Inouhe *et al.*, 1989].

Différentes voies cellulaires sont utilisées pour prendre en charge les métaux. Les exemples du cuivre, un métal indispensable au métabolisme cellulaire, et du mercure – un métal toxique – sont exposés par la suite.

1.2 Le cuivre

1.2.1 Un élément essentiel

Le cuivre est indispensable pour les eucaryotes et les procaryotes. C'est le troisième élément de transition le plus abondant dans les cellules, après le fer et le zinc. Les fonctions remplies par le cuivre sont liées à ses deux états de valence : Cu^(I) et Cu^(II). Les enzymes qui utilisent le cuivre comme cofacteur mettent à profit ces propriétés rédox pour le transport d'électron(s). Les centres cuivre(I) des cuproenzymes sont enfouis car contrairement au Cu^(II) qui est stable en solution aqueuse neutre, le Cu^(I) ne peut être maintenu en solution qu'à des pH très acides ou sous forme complexée. Ces métalloenzymes couvrent un spectre assez large de réactions, depuis le transfert d'électron(s) (par la cytochrome *c* oxydase par exemple) ou de dioxygène par l'hémocyanine, à la modification de substrats dans des réactions enzymatiques diverses (comme l'oxydation du *p*-diphénol en *p*-benzosemiquinone par la laccase, la désamination oxydative de la lysine en allysine par la lysyl oxydase, ou encore l'oxydation du β -D-glucose en D-gluconolactone par l'hexose oxydase).

Chez l'homme, c'est un oligoélément essentiel [Peña *et al.*, 1999]. Des déséquilibres dans le métabolisme du cuivre conduisent à la maladie de Wilson ou au syndrome de Menkes [Vulpe *et al.*, 1993, Bull *et al.*, 1993, Bull et Cox, 1994]. Il est aussi impliqué dans des pathologies neurodégénératives telles que la sclérose laté-

rale amyotrophique familiale, la maladie d'Alzheimer ou les encéphalopathies à prion [Waggoner *et al.*, 1999]. Grâce à ses propriétés rédox, il intervient notamment dans la respiration cellulaire, l'homéostasie du fer, la protection contre le stress oxydant, la synthèse de pigments et de neurotransmetteurs, et la formation du tissu conjonctif [Bartnikas et Gitlin, 2001].

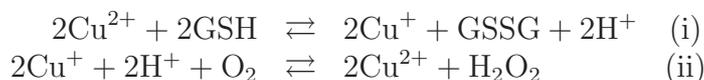
1.2.2 Un élément essentiel, mais toxique

Quand l'homéostasie cellulaire du cuivre est perturbée, du cuivre se retrouve libre dans le cytoplasme. Le terme «libre» signifie que le cuivre (ion $\text{Cu}^{(I)}$ ou $\text{Cu}^{(II)}$) est à l'état de complexes *aquo*, où les seuls ligands sont les molécules H_2O (aucune coordination par d'autres types de molécules). Ses propriétés rédox exploitées par la cellule deviennent alors la source de sa toxicité. Le mode de toxicité du cuivre n'a pas encore été complètement compris [Solioz et Stoyanov, 2003], mais il fait intervenir la production de radicaux hydroxyles OH^\bullet par une réaction apparentée à celle de Fenton :



Les radicaux OH^\bullet sont très réactifs et peuvent générer d'autres espèces réactives de l'oxygène, et causer des dommages oxydatifs aux protéines, aux lipides et aux acides nucléiques, même à des concentrations très faibles.

Le cuivre est détoxiqué *in vivo* en couplant les réactions rédox (i) et (ii) :



Le glutathion (GSH) est le principal thiol anti-oxydant d'origine non protéique dans les cellules eucaryotes et les procaryotes (sa concentration cytosolique est de l'ordre de 5 mM), sauf chez la plupart des bactéries Gram-positives qui utilisent d'autres thiols [Fahey *et al.*, 1978]. Par exemple, le mycothiol a été identifié chez *Mycobacterium bovis* [Spies et Steenkamp, 1994], l'ovothiol A chez *Leishmania donovani* et *Crithidia fasciculata* [Steenkamp et Spies, 1994, Spies et Steenkamp, 1994], et l'U17 chez *Streptomyces clavuligerus* [Newton *et al.*, 1995]. Ces molécules contiennent toutes une cystéine ou un dérivé thiolé. Le glutathion est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) qui, lorsqu'il est oxydé, forme un pont cystine avec une seconde molécule de glutathion (Fig. 1.1). C'est un ligand naturel du cuivre de la cellule qui participe à son transport, à sa distribution et à sa détoxification lorsqu'il est en excès. Dans ce cas, le glutathion transfère le cuivre aux métallothionéines (MT) [Freedman *et al.*, 1989, Steinebach et Wolterbeek, 1994]. Chez la levure, l'expression des métallothionéines Cup1 et Crs5 est activée en réponse à des concentrations élevées de cuivre(I) [Labbé *et al.*, 1997]. Cup1 et Crs5 séquestrent les ions $\text{Cu}^{(I)}$ jusqu'à ce que la cellule ait pu réguler leur concentration intracellulaire. L'espace intermembranaire des mitochondries permettrait également d'absorber une partie de l'excès de cuivre où il existe une fraction non négligeable du $\text{Cu}^{(I)}$ cellulaire, mais sous une forme indéterminée (non protéique et non liée au glutathion) [Cobine *et al.*, 2004].

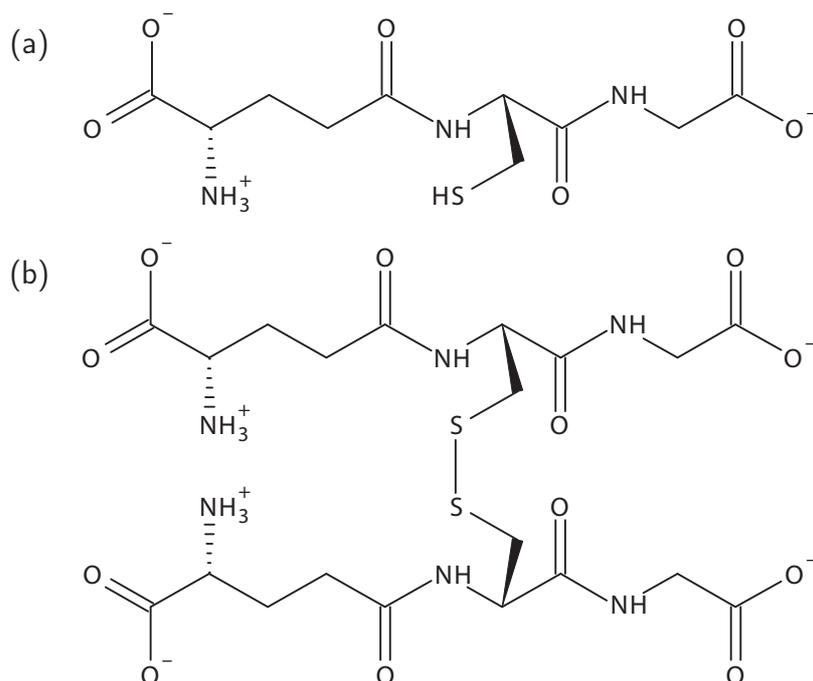


FIG. 1.1 – Formes réduite (a) et oxydée (b) du glutathion.

La régulation de la concentration en $\text{Cu}^{(I)}$ dans la cellule est finement contrôlée. Ainsi, Changela *et al.* [Changela *et al.*, 2003] ont évalué la sensibilité de la protéine CueR d'*Escherichia coli*, une protéine qui active la transcription de gènes impliqués dans l'efflux de cuivre, au $\text{Cu}^{(I)}$ libre à 10^{-21} M. En d'autres termes, le contrôle de l'homéostasie du cuivre est tel, que tout léger excès de cuivre dans le cytoplasme déclenche une cascade de réactions de résistance.

1.2.3 Un élément essentiel, mais jamais libre

In vitro, la plupart des métalloprotéines à cuivre peuvent facilement intégrer leur métal dans le milieu sans l'aide d'un facteur auxiliaire. Par exemple, SOD1 lie le cuivre *in vitro* avec une affinité très forte ($K_D \approx 10^{-15}$ M). Néanmoins, *in vivo*, tandis que la concentration intracellulaire en cuivre est micromolaire ($\approx 70 \mu\text{M}$), SOD1 requiert un facteur externe pour lier son ion $\text{Cu}^{(I)}$ [Rae *et al.*, 1999, Lippard, 1999].

Rae *et al.* ont montré que dans une cellule de *Saccharomyces cerevisiae*, la concentration en cuivre libre est inférieure à 10^{-18} M, soit moins d'un atome de cuivre libre par cellule [Rae *et al.*, 1999]. De plus, au cours de la vie d'une cellule, moins de 0.01% de la quantité totale de cuivre devient libre dans le cytoplasme [Rae *et al.*, 1999]. Cette absence de cuivre libre peut s'expliquer par la présence d'une grande variété de sites de complexation du métal dans la cellule au sein de molécules cytosoliques (complexation faible ou forte, spécifique ou non spécifique). Aussitôt après son entrée dans la cellule, le cuivre(I) se lierait au glutathion puis serait transféré aux métallothionéines pour le stockage si nécessaire [Freedman *et al.*, 1989].

1.2.4 La nécessité de chaperones à cuivre

La cellule se retrouve donc face à un problème de disponibilité du cuivre : d'une part, de nombreuses métalloprotéines nécessitent du cuivre pour acquérir leur fonction, avec des localisations cellulaires variées (cytosol, mitochondries, membrane plasmique *etc*) ; d'autre part, il n'y a pas de cuivre libre car il est cytotoxique et facilement complexé par de nombreux agents cellulaires. Par conséquent, il existe des voies intracellulaires spécifiques au convoyage et à la compartimentation du cuivre jusqu'à ses protéines cibles.

Plusieurs études ont révélé chez *S. cerevisiae* et chez l'homme, la présence de diverses protéines solubles, cytosoliques, nécessaires à l'acheminement des ions $\text{Cu}^{(I)}$ vers les protéines cibles à travers la cellule [Pufahl *et al.*, 1997, Valentine et Gralla, 1997, Portnoy *et al.*, 1999]. Ces protéines délivrent le $\text{Cu}^{(I)}$ par des interactions de type protéine-protéine [O'Halloran et Culotta, 2000]. O'Halloran a nommé ces transporteurs *métallochaperones* [O'Halloran et Culotta, 2000]. Une métallochaperone diffère d'une chaperone moléculaire : une métallochaperone protège l'ion qu'elle transporte d'agents complexants cellulaires et elle le délivre à une protéine cible cuivre-dépendante, tandis qu'une chaperone moléculaire facilite le repliement d'une protéine [Rosenzweig, 2001].

1.2.5 Les métallochaperones dans *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est l'organisme pour lequel on connaît le mieux les mécanismes d'importation du cuivre dans le cytoplasme puis de distribution vers les différents compartiments cellulaires. Plusieurs voies utilisant des chaperones à cuivre ont été identifiées à ce jour chez *S. cerevisiae* où l'ion $\text{Cu}^{(I)}$ est délivré à différents organites : vers la mitochondrie dont le complexe de la cytochrome *c* oxydase nécessite du cuivre comme cofacteur rédox, vers l'appareil de Golgi pour la sécrétion et l'acheminement à la membrane plasmique de cuproprotéines, ou dans le cytosol pour l'activation de la Cu,Zn-superoxyde dismutase.

La figure 1.2 illustre ces chemins d'adressage du cuivre.

1.2.5.1 Importation du cuivre dans la cellule

La première étape avant la distribution du cuivre aux différents partenaires des métallochaperones, est le transport du cuivre depuis le milieu extracellulaire vers le cytoplasme. Le cuivre est présent dans l'environnement sous la forme d'ions $\text{Cu}^{(II)}$. Il est réduit en $\text{Cu}^{(I)}$ par les métalloréductases membranaires Fre1 [Hassett et Kosman, 1995] et Fre2 [Georgatsou *et al.*, 1997] qui réduisent également le $\text{Fe}^{(III)}$ en $\text{Fe}^{(II)}$. Puis, deux voies de prise en charge des ions $\text{Cu}^{(I)}$ existent chez *S. cerevisiae* : une première de haute affinité pour le cuivre(I), et une seconde de faible affinité. Des protéines spécifiques sont associées à chacune d'entre elles. Les transporteurs de haute affinité sont les protéines membranaires homomultimériques Ctr1 et Ctr3. Le transport de faible affinité utilise Ctr2 et Fet4. Fet4 est également impliqué dans le transport du fer. Des homologues de la famille des transporteurs de cuivre Ctr ont été identifiés chez l'homme, la souris ou chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

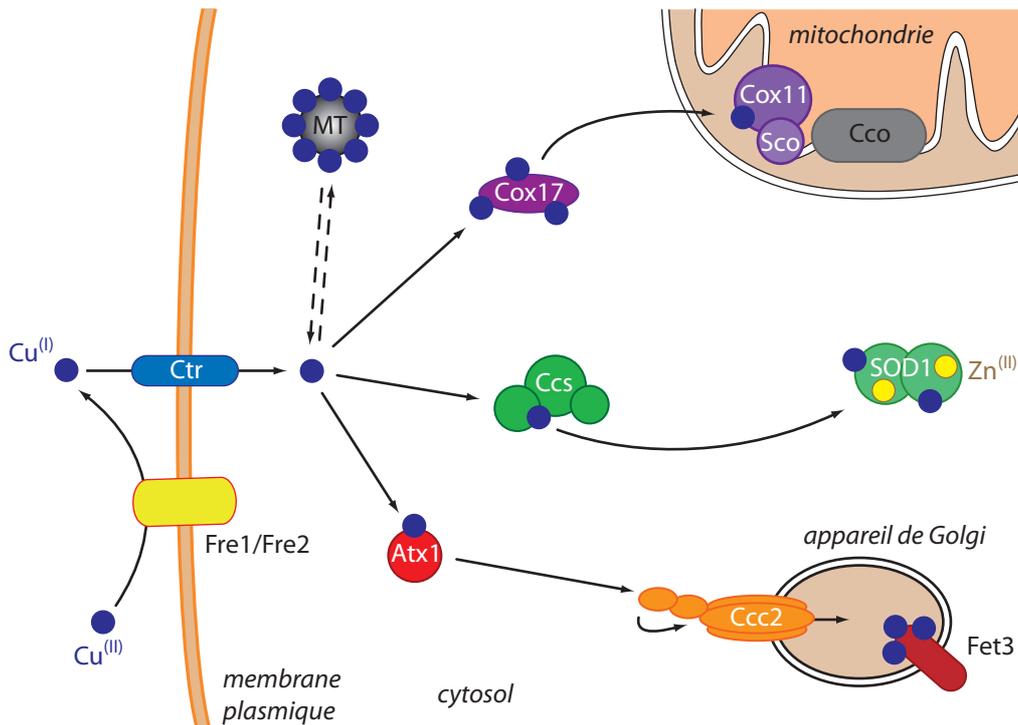


FIG. 1.2 – Voies d’acheminement du cuivre par les métallochaperones chez *S. cerevisiae*.

[Puig et Thiele, 2002].

1.2.5.2 Acheminement du cuivre

• Vers la mitochondrie

La cytochrome *c* oxydase Cco (ou Cox) est un complexe enzymatique de la membrane interne de la mitochondrie essentiel à la respiration cellulaire. Elle compte deux sous-unités catalytiques, Cox1 et Cox2, qui nécessitent des ions cuivre comme cofacteurs. Comme Cox1 et Cox2 sont exprimées par le génome mitochondrial, le cuivre doit être importé dans la mitochondrie pour qu’elles l’acquièrent.

Plusieurs protéines sont impliquées dans le transfert du cuivre à Cco : Cox17 [Glerum *et al.*, 1996], Cox11 [Tzagoloff *et al.*, 1990] et Sco1/Sco2 [Abajian *et al.*, 1997]. Cox11 et Sco1/Sco2 transfèrent le cuivre aux sous-unités Cox1 et Cox2. Des études d’absorption de rayons X [Srinivasan *et al.*, 1998, Heaton *et al.*, 2001, Palumaa *et al.*, 2004] ont montré que Cox17 peut lier 3 ou 4 ions $\text{Cu}^{(I)}$ sous la forme d’un cluster, et que ces ions peuvent être facilement échangeables en solution [Heaton *et al.*, 2001]. Cox17 est une protéine soluble localisée dans le cytosol et dans l’espace intermembranaire [Glerum *et al.*, 1996, Beers *et al.*, 1997]. Elle joue ainsi le rôle de métallochaperone qui achemine le cuivre(I) vers la mitochondrie puis le cède à Sco1/Sco2 et Cox11 [Beers *et al.*, 1997, Puig et Thiele, 2002].

• Vers l'appareil de Golgi

De nombreuses protéines cuivre-dépendantes sont sécrétées ou acheminées à la membrane plasmique, telles que la ferroxidase Fet3 qui est essentielle pour le transport de haute affinité du fer vers le cytoplasme de la levure. L'adressage de ces protéines passe donc par l'appareil de Golgi. Deux protéines ont été identifiées pour le convoyage du cuivre vers cet organite : Atx1 et Ccc2. Atx1 a d'abord été découverte comme un facteur anti-oxydant (*anti-oxidant protein*) qui, lorsqu'il est surexprimé, compense une déficience en Cu,ZnSOD chez la levure [Lin et Culotta, 1995]. En fait, à un niveau d'expression physiologique, Atx1 convoie spécifiquement le cuivre, sous la forme d'un ion $\text{Cu}^{(I)}$ complexé à deux cystéines d'Atx1 [Pufahl *et al.*, 1997], vers un transporteur de cuivre de l'appareil de Golgi (plus précisément vers les vésicules *trans* situées proches de la membrane plasmique de la levure) [Lin *et al.*, 1997, Valentine et Gralla, 1997]. Le transporteur impliqué, Ccc2, est une ATPase transférant le cuivre du côté de la lumière golgienne afin d'être intégré aux protéines qui le requièrent. *In vitro*, Atx1 prend en charge un ion $\text{Cu}^{(I)}$ suite à l'interaction avec le domaine C-terminal cytosolique de Ctr1 [Xiao et Wedd, 2002].

Atx1 présente les caractéristiques des métallochaperones à cuivre : elle lie le $\text{Cu}^{(I)}$, et elle interagit *in vivo* avec un partenaire spécifique, Ccc2.

• Vers la Cu,Zn-superoxyde dismutase cytosolique

La Cu,ZnSOD (SOD1) est une enzyme homodimérique cytosolique qui effectue la dismutation du superoxyde O_2^- en H_2O_2 et O_2 . Chaque monomère utilise le cuivre et le zinc comme cofacteurs. C'est une enzyme clé de la défense de la cellule contre le stress oxydant. L'activation de SOD1 nécessite que chaque monomère ait intégré un ion $\text{Cu}^{(I)}$. Culotta *et al.* [Culotta *et al.*, 1997] ont montré que cette étape dépend *in vivo* d'un facteur auxiliaire codé par le gène *lys7*. Ce facteur est la protéine Ccs (*copper chaperone for superoxide dismutase 1*).

Contrairement à Atx1 et à Cox17 qui sont de petites protéines d'environ 70 acides aminés ne comportant qu'un domaine, Ccs en compte trois [Lamb *et al.*, 1999, Schmidt *et al.*, 1999, Lamb *et al.*, 2000] : le domaine I, N-terminal, remarquablement homologue en séquence à Atx1; le domaine II, homologue en séquence à SOD1; et le domaine III, C-terminal. Le domaine I n'est pas indispensable à la fonction de Ccs car un mutant de Ccs délété du domaine I peut toujours transférer un $\text{Cu}^{(I)}$ à SOD1 *in vivo*, pourvu que la concentration en cuivre dans la cellule ne soit pas trop faible [Schmidt *et al.*, 1999]. Le rôle du domaine I serait alors d'optimiser la fonction de Ccs quand les conditions en cuivre sont limitantes. Le domaine II est indispensable et interagit directement avec SOD1. Le domaine III, lui aussi absolument nécessaire, lie l'ion $\text{Cu}^{(I)}$ et participe au mécanisme de transfert du métal vers apoZnSOD1.

Ccs est spécifique à SOD1. Bien que son domaine N-terminal ressemble beaucoup à Atx1 (dans son repliement et dans la nature des acides aminés), Ccs ne peut pas se

substituer à Atx1 pour délivrer le $\text{Cu}^{(I)}$ à Ccc2 [Culotta *et al.*, 1997].

1.2.6 Les métallochaperones à cuivre chez les autres organismes

Plusieurs protéines remplissant les mêmes fonctions de chaperone à cuivre que Cox17, Ccs et Atx1 dans *S. cerevisiae* ont été mises en évidence dans une variété d'organismes différents. Cela révèle une conservation assez importante des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'homéostasie du cuivre, depuis les procaryotes jusqu'aux eucaryotes supérieurs.

La voie Cox17-dépendante d'adressage du $\text{Cu}^{(I)}$ vers la mitochondrie et la Cco existe chez l'homme et d'autres mammifères comme la souris et le rat. Deux protéines homologues fonctionnelles de Cox17, Cox17-1 et Cox17-2, ont été mises en évidence chez la plante *Arabidopsis thaliana* [Wintz et Vulpe, 2002].

Ccs a été mise en évidence chez l'homme, la souris, le porc et d'autres mammifères, et chez les plantes (*A. thaliana* [Abdel-Ghany *et al.*, 2005], pommes de terres, tomates *etc*). Cependant, il semble que chez les végétaux, le domaine I de Ccs soit nécessaire à l'activation de CuZnSOD car un mutant de Ccs chez *A. thaliana* dépourvu du domaine homologue à Atx1 ne peut pas activer SOD1 [Chu *et al.*, 2005].

De nombreuses protéines homologues fonctionnelles d'Atx1 ont été identifiées à ce jour, tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes : Hah1 (*human Atx1 homologue*) chez l'homme [Klomp *et al.*, 1997] ; Atox1 chez le rat [Naeve *et al.*, 1999], la souris [Hamza *et al.*, 2000] et le chien [Nanji et Cox, 1999] notamment ; Cuc-1 chez le ver *Caenorhabditis elegans* [Wakabayashi *et al.*, 1998], Cch (*copper chaperone*) chez plusieurs végétaux dont *A. thaliana* [Himelblau *et al.*, 1998] ; CopZ chez les bactéries (*Enterococcus hirae* [Odermatt et Solioz, 1995], *Bacillus subtilis* [Banci *et al.*, 2001b]) ou ScAtx1 chez *Synechocystis* PCC6803 [Tottey *et al.*, 2002].

Comme pour Atx1 et Ccc2, on retrouve toujours le tandem métallochaperone-ATPase cible chez les organismes où l'équivalent d'Atx1 transfère son ion $\text{Cu}^{(I)}$ à une ou deux ATPases. Ainsi, Cch interagit avec Ran1 chez *A. thaliana* [Mira *et al.*, 2001], Cuc-1 avec Cua-1 chez *C. elegans* [Wakabayashi *et al.*, 1998], ou encore CopZ avec CopA chez *E. hirae* [Multhaup *et al.*, 2001]. Chez certains organismes, il existe deux ATPases partenaires de la métallochaperone : chez l'homme, il a été montré qu'Hah1 transfère son cuivre aux ATPases golgiennes Mnk (autrement nommée ATP7A) et Wnd (ou ATP7B) [Fu *et al.*, 1995, Yuan *et al.*, 1995], responsables respectivement du syndrome de Menkes et de la maladie de Wilson lorsque leur fonction et/ou expression est déficiente. Mnk et Wnd n'ont toutefois pas les mêmes localisations cellulaires dans l'organisme. Tottey *et al.* [Tottey *et al.*, 2002] ont mis en évidence l'interaction de ScAtx1 avec les ATPases CtaA et PacS chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803.

1.3 Le mercure

Le mercure est parmi les métaux lourds les plus toxiques. Il n'a aucun rôle physiologique connu. Sa présence dans les sols et dans les environnements marins et lacustres est majoritairement d'origine anthropogénique (environ 75%) [Barkay *et al.*, 2003]. On l'y trouve à l'état d'oxydation $\text{Hg}^{(0)}$ ou $\text{Hg}^{(\text{II})}$, sous la forme de sulfure HgS , ou également dans des composés organomercurels comme le méthylmercure CH_3Hg^+ qui est extrêmement toxique de par son accumulation dans les organismes. La toxicité du mercure est liée à ses propriétés chimiques. Il peut traverser les membranes cellulaires par diffusion passive et se complexer avec une très grande affinité aux thiols, notamment aux cystéines. Il peut donc être rapidement fixé par des protéines cellulaires et s'accumuler dans les organismes.

Certains micro-organismes peuvent survivre en présence de concentrations élevées en sels de mercure grâce à des systèmes de défense qu'elles ont développés. L'un de ces systèmes utilisent un opéron, l'opéron *mer*. Il a notamment été mis en évidence chez la bactérie *Ralstonia metallidurans* CH34 qui se montre remarquablement adaptée aux environnements riches en métaux toxiques ($\text{Hg}^{(\text{II})}$, $\text{Cd}^{(\text{II})}$, $\text{Pb}^{(\text{II})}$, CrO_4^{2-} etc) [Mergeay *et al.*, 2003].

1.3.1 Mécanismes de résistance dépendants de l'opéron *mer*

L'opéron *mer* confère aux bactéries la tolérance au mercure. Il code plusieurs protéines : MerR, MerT, MerP, MerC, MerA, MerB et MerD [Jackson et Summers, 1982a, Jackson et Summers, 1982b]. MerR est un activateur de la transcription des gènes de *mer* [Foster et Ginnity, 1985, Ross *et al.*, 1989, Shewchuk *et al.*, 1989]. Les produits des gènes *merT*, *merP* et *merA* concentrent les fonctions essentielles de résistance au mercure et sont toujours présents dans l'opéron *mer*. Les voies cellulaires les employant sont illustrées sur la figure 1.3.

MerP est une protéine périplasmique qui complexe $\text{Hg}^{(\text{II})}$ en compétition avec les anions Cl^- et OH^- auxquels il est déjà lié dans l'environnement [Lund et Brown, 1987, Hamlett *et al.*, 1992, Barkay *et al.*, 2003]. Ensuite, elle transfère son ion $\text{Hg}^{(\text{II})}$ à MerT, un transporteur de la membrane plasmique qui importe $\text{Hg}^{(\text{II})}$ dans le cytosol [Lund et Brown, 1987, Hamlett *et al.*, 1992]. MerP n'est pas essentielle car MerT peut directement capter les ions $\text{Hg}^{(\text{II})}$ dans l'espace périplasmique. Quand l'ion est acheminé dans le cytosol, il est réduit par MerA, une réductase mercurique qui n'utilise le mercure comme substrat que s'il est sous la forme complexée dithiolato [Fox et Walsh, 1982, Fox et Walsh, 1983, Rinderle *et al.*, 1983]. Ainsi, il est proposé que, soit MerA prend directement l'ion $\text{Hg}^{(\text{II})}$ à MerT où il est coordonné par deux cystéines, soit MerT transfère le métal à des thiols cytosoliques qui ensuite le cèdent à MerA [Barkay *et al.*, 2003]. La réduction de $\text{Hg}^{(\text{II})}$ par MerA produit du mercure élémentaire $\text{Hg}^{(0)}$, volatile et moins toxique, qui diffuse passivement vers l'environnement à travers la membrane plasmique.

L'activité de l'opéron est réprimée par MerD. MerD est un antagoniste de MerR [Mukhopadhyay *et al.*, 1991].

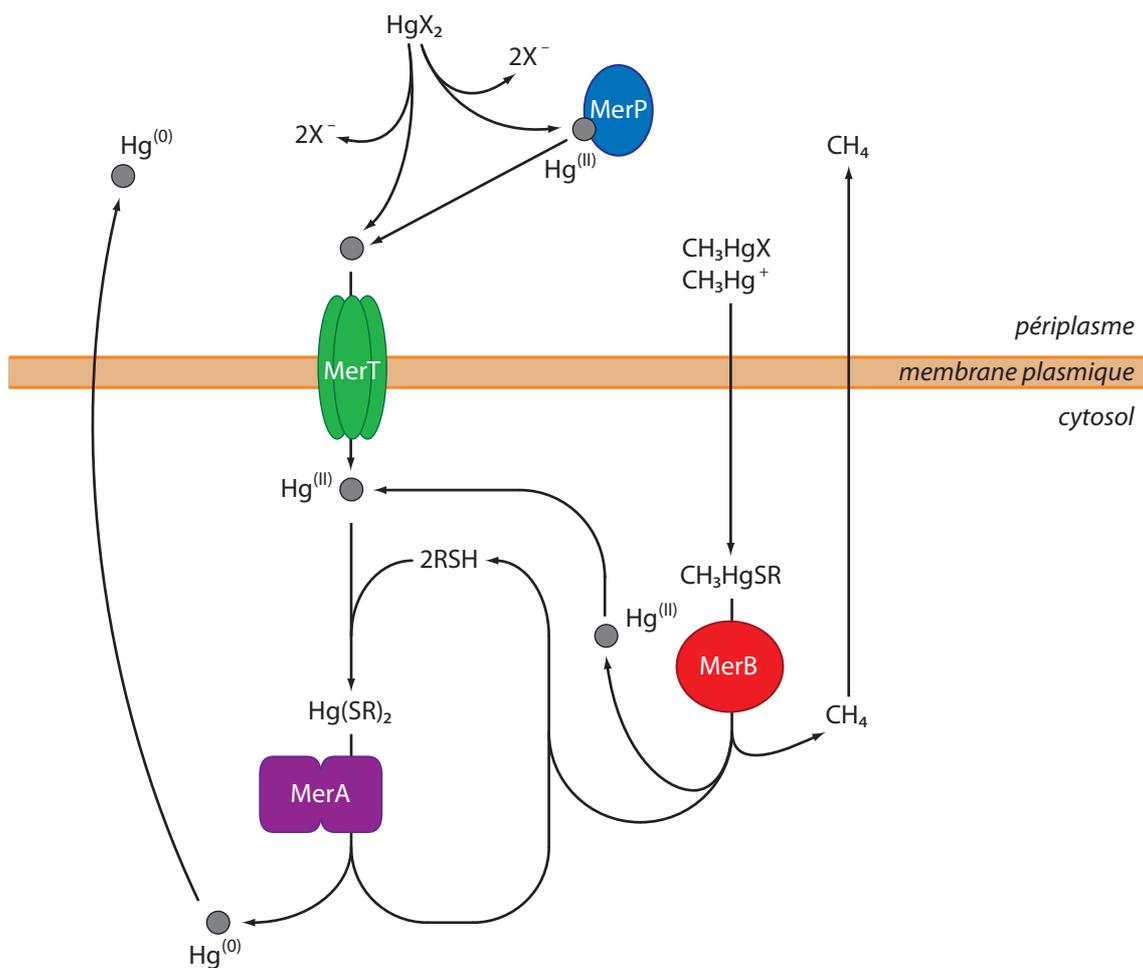


FIG. 1.3 – Mécanismes de résistance au mercure dépendant de l'opéron *mer*.

D'autres protéines peuvent être codées par l'opéron *mer*. La protéine MerB est la seule autre enzyme que *mer* puisse coder. MerB confère la résistance aux organomercuriels [Walsh *et al.*, 1988, Barkay *et al.*, 2003], tels que le méthylmercure, l'éthylmercure ou le phénylmercure. C'est une lyase qui transfère un proton à la liaison C–Hg, libérant l'hydrocarbure correspondant (méthane, éthane, benzène), $\text{Hg}^{(II)}$ étant pris ensuite en charge par MerA. L'association de MerA et MerB apporte à la bactérie une résistance à large spectre, tandis que la seule expression de MerA ne produit qu'une résistance à spectre plus étroit puisque la bactérie ne peut alors se défendre que contre le mercure inorganique [Walsh *et al.*, 1988]. MerC [Sahlman *et al.*, 1997, Kusano *et al.*, 1990] et MerF [Barkay *et al.*, 2003] (qui parfois remplace MerC) sont des protéines membranaires qui importent $\text{Hg}^{(II)}$ dans le cytosol. Elles accompagnent toujours MerT. MerG, une protéine périplasmique, accroît la résistance aux organomercuriels [Kiyono et Pan-Hou, 1999]. Les fonctions et les mécanismes d'action de MerC, MerF et MerG ne sont pas encore clairs. On ignore en outre la fonction de la protéine que code le gène *merE* [Barkay *et al.*, 2003].

1.3.2 Mécanismes de résistance indépendants de l'opéron *mer*

Une première voie de détoxification a été rapportée par Pan-Hou et Imura chez *Clostridium cochlearium* [Pan-Hou et Imura, 1981] et par Aiking *et al.* chez *Klebsiella aerogenes* NCTC418 [Aiking *et al.*, 1985]. Ces bactéries produisent HgS en condition anaérobie suite à la réaction de Hg^(II) avec H₂S.

Le mercure(II) peut également être méthylé [Jensen et Jernelöv, 1969]. Malheureusement, c'est un mécanisme assez répandu et les bactéries qui l'emploient ne sont pas toujours dotées de la machinerie pour ensuite détoxifier le méthylmercure produit qui s'accumule alors. Des bactéries comme *Desulfovibrio desulfuricans* produisent CH₃Hg^(I) à partir de sulfure mercurique soluble [Choi *et al.*, 1994, Siciliano et Lean, 2002]. L'une des voies de déméthylation de CH₃Hg^(I) utilisent le système *merAB*. A côté de cette déméthylation réductive, il existe la déméthylation oxydative que certaines bactéries anaérobies effectuent. Le mécanisme est inconnu. Il produit du CO₂, une faible quantité de CH₄ et un dérivé mercuriel non identifié.

En plus de la voie MerA-dépendante, Hg^(II) peut être réduit par certaines algues en présence et en absence de lumière. Les facteurs moléculaires intervenant n'ont pas été élucidés.

Enfin, Smith *et al.* ont mis en évidence que certaines bactéries comme *E. coli*, *Bacillus* et *Streptomyces* oxydent Hg⁽⁰⁾ en Hg^(II) [Smith *et al.*, 1998]. Chez *E. coli*, les hydroperoxydases KatG et KatE sont notamment impliquées [Smith *et al.*, 1998].

1.4 Des métallochaperones pour d'autres métaux ?

Bien que l'adressage intracellulaire des métaux vers leurs protéines cibles soit un processus davantage connu pour les systèmes impliquant le cuivre, il est probable que des voies analogues existent pour d'autres métaux.

Ainsi, UreE est une métallochaperone à nickel nécessaire à l'incorporation de deux ions Ni²⁺ dans le site actif de l'uréase de *Klebsiella aerogenes* [Colpas *et al.*, 1999] et de *Bacillus pasteurii* [Remaut *et al.*, 2001]. Chez *Escherichia coli*, HybF se révèle une métallochaperone putative à nickel qui interviendrait dans le processus de maturation de la Ni,Fe-déshydrogénase selon Blokesch *et al.* [Blokesch *et al.*, 2004]. La protéine ZnuA est quant à elle une métallochaperone à zinc mise en évidence chez *Synechocystis* 6803 par [Banerjee *et al.*, 2003] et chez d'autres bactéries. L'intégration du fer dans la biosynthèse des centres Fe-S fait intervenir les protéines IscA [Krebs *et al.*, 2001] et IscU [Bertini *et al.*, 2003], des métallochaperones spécifiques des ions Fe^(II).

A ce jour, davantage de protéines fonctionnelles utilisant les métaux (transporteurs, enzymes *etc*) ont été mises en évidence que de convoyeurs cellulaires pour ces métaux.

Chapitre 2

Les Métallochaperones de la Famille d'Atx1

Sommaire

2.1	Des structures homologues	15
2.2	Des séquences homologues	16
2.3	Environnement du métal	19
2.3.1	Coordination du cuivre(I)	19
2.3.2	Coordination du mercure(II)	22
2.3.3	Quelle(s) coordination(s) <i>in vivo</i> ?	23
2.4	Les ATPases partenaires	24
2.5	Interaction(s) avec les ATPases	24
2.6	Modèle de transfert du métal de la métallochaperone à l'ATPase cible	28

2.1 Des structures homologues

La structure d'Atx1 a été résolue par RMN et par diffraction de rayons X sous divers états : apo, où les cystéines liant le Cu^(I) ont leur fonction thiol réduite [Arnesano *et al.*, 2001a], ou oxydée où elles forment un pont disulfure [Rosenzweig *et al.*, 1999]; et holo, complexée à un ion Cu^(I) [Arnesano *et al.*, 2001a] ou Hg^(II) [Rosenzweig *et al.*, 1999]. Parmi les homologues fonctionnels d'Atx1, plusieurs structures ont aussi été déterminées en présence ou en absence de métal, la nature du métal variant. L'ensemble de ces structures est résumé au tableau 2.1.

Toutes ces protéines d'environ 70 résidus ne sont constituées que d'un seul domaine. Elles partagent le même repliement $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ appartenant à la famille de la ferrédoxine (sauf apoScAtx1 qui ne possède pas le dernier brin β) : deux hélices α associées à un feuillet β antiparrallèle composé de 4 brins β , des boucles joignant les éléments de structure secondaire (Fig. 2.1a). Le site de liaison du métal présente en outre une séquence que l'on retrouve chez toutes ces protéines : MXCXXC (X, acides aminés de nature variable d'une protéine à l'autre). Les deux cystéines complexent

l'ion métallique grâce à leur groupement sulfhydryle. Cette séquence consensus se situe toujours entre le premier brin β (β_1) et la première hélice α (α_1) (Fig. 2.1).

De manière intéressante, MerP, la métallochaperone bactérienne impliquée dans la détoxification de $\text{Hg}^{(\text{II})}$, montre les mêmes caractéristiques : même repliement et même séquence consensus MTCXXC. De même, le domaine I de Ccs partage le même repliement et les mêmes caractéristiques structurales que les métallochaperones de la famille d'Atx1.

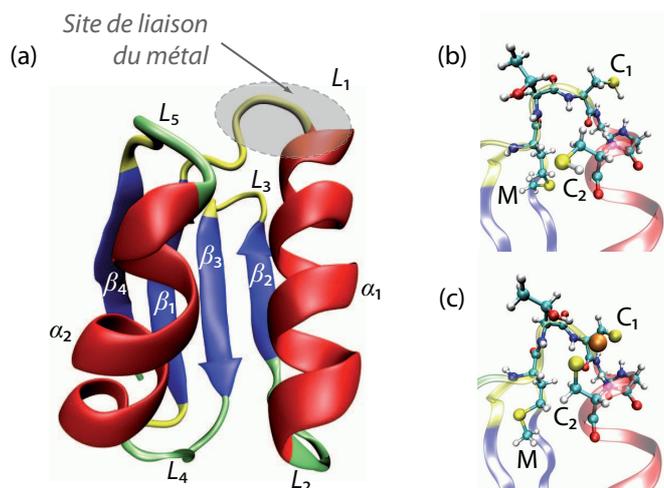


FIG. 2.1 – Structures génériques des métallochaperones de la famille d'Atx1. (a) Repliement de type ferrédoxine $\beta\alpha\beta\beta\beta\alpha\beta$ des métallochaperones. L_1, L_2, L_3, L_4 et L_5 sont les boucles reliant les éléments de structure secondaire. (b) Motif MXC_1XXC_2 situé dans la boucle L_1 dans sa forme apo. (c) Motif MXCXXC lié à un métal, ici le $\text{Cu}^{(\text{I})}$. La protéine représentée est Hah1 (entrée PDB 1TL4).

2.2 Des séquences homologues

Arnesano *et al.* ont recherché et aligné sur la séquence d'Atx1, les séquences de protéines d'eucaryotes et de procaryotes (bactéries et archaebactéries), d'environ 70 aminoacides, avec un seuil d'identité de séquence à Atx1 de 20%, et comportant le motif $\text{X}_1\text{X}_2\text{CX}_3\text{X}_4\text{C}$ [Arnesano *et al.*, 2002]. L'alignement des séquences est illustré en figure 2.2.

Cette étude comparative révèle l'existence d'une famille de métallochaperones, connues ou supposées, dont les séquences sont très proches et partagent des propriétés communes depuis les procaryotes jusqu'aux eucaryotes, apparemment relativement indépendantes de la nature du métal lié *in vivo*, puisque les protéines des familles de MerP et de CopZ présentent des caractéristiques de séquence similaires. Les 21 séquences des protéines de la famille de MerP appartiennent toutes à un opéron *mer* dans leurs organismes respectifs [Liebert *et al.*, 2000].

Les protéines des organismes eucaryotes montrent le motif commun $\text{MX}_1\text{CX}_2\text{GC}$ avec une thréonine très conservée en position X_1 . Les séquences sont très similaires

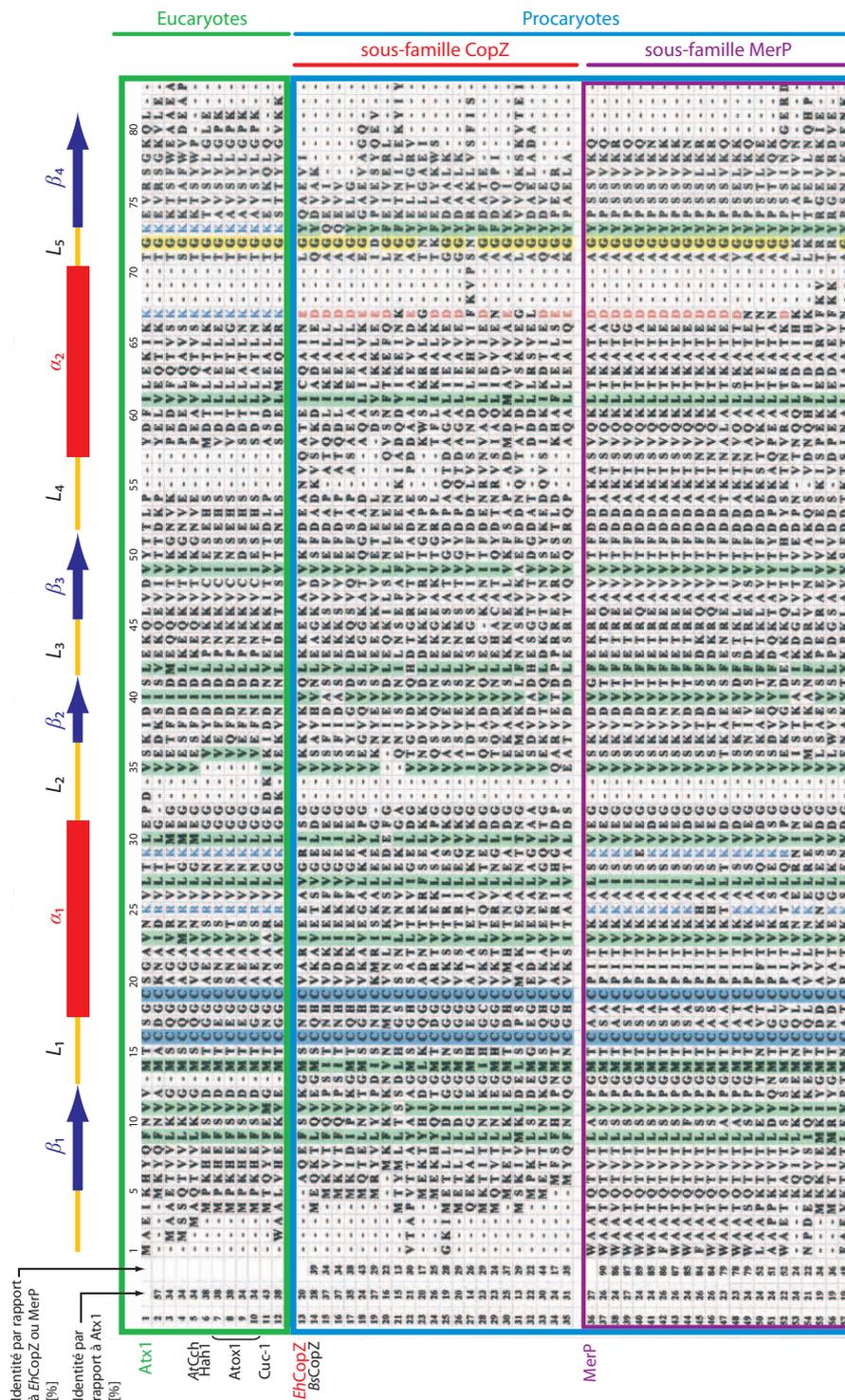


FIG. 2.2 – Alignement des séquences de protéines homologues à partir de la séquence d’Atx1 de *S. cerevisiae*; adapté de [Arnesano *et al.*, 2002]. La numérotation des aminoacides inclut les délétions/insertions dans l’alignement. Les deux cystéines liant le métal sont ombrées en bleu, les positions des résidus hydrophobes conservés, en vert. Les résidus basiques (R, K) et acides (D, E) conservés sont indiqués en rouge et en bleu respectivement. Les éléments de structure secondaire représentés sont ceux de Cu^(I)Atx1 [Arnesano *et al.*, 2001a]. Les noms des métallochaperones connues sont indiqués devant les séquences correspondantes.

Protéines	Organismes	Sources	Références
Atx1			
Apo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RMN	[Arnesano <i>et al.</i> , 2001a]
Apo, oxydée	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RX	[Rosenzweig <i>et al.</i> , 1999]
Cu ^(I)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RMN	[Arnesano <i>et al.</i> , 2001a]
Hg ^(II)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RX	[Rosenzweig <i>et al.</i> , 1999]
CopZ			
Apo	<i>Enterococcus hirae</i>	RMN	[Wimmer <i>et al.</i> , 1999]
Apo	<i>Bacillus subtilis</i>	RMN	[Banci <i>et al.</i> , 2003a]
Cu ^(I)	<i>Bacillus subtilis</i>	RMN	[Banci <i>et al.</i> , 2001b]
Hah1			
Apo	<i>Homo sapiens</i>	RMN	[Anastassopoulou <i>et al.</i> , 2004]
Cu ^(I) †	<i>Homo sapiens</i>	RMN	[Anastassopoulou <i>et al.</i> , 2004]
Cu ^(I) ‡	<i>Homo sapiens</i>	RX	[Wernimont <i>et al.</i> , 2000]
Hg ^(II) ‡	<i>Homo sapiens</i>	RX	[Wernimont <i>et al.</i> , 2000]
Cd ^(II) ‡	<i>Homo sapiens</i>	RX	[Wernimont <i>et al.</i> , 2000]
ScAtx1			
Apo	<i>Synechocystis</i> PCC6803	RMN	[Banci <i>et al.</i> , 2004a]
MerP			
Apo	<i>Shigella flexneri</i>	RMN	[Steele et Opella, 1997]
Apo, oxydée	<i>Shigella flexneri</i>	RMN	[Qian <i>et al.</i> , 1998]
Apo, oxydée	<i>Ralstonia metallidurans</i>	RX	[Serre <i>et al.</i> , 2004]
Hg ^(II)	<i>Shigella flexneri</i>	RMN	[Steele et Opella, 1997]

TAB. 2.1 – Liste des structures de métallochaperones à cuivre ou à mercure résolues. † L'holoprotéine est sous une forme monomérique mononucléaire; ‡ L'holoprotéine est sous une forme homodimérique mononucléaire.

avec une identité de $46\% \pm 19\%$. Les métallochaperones des procaryotes présentent une identité de séquence plus faible à $27\% \pm 11\%$ pour la famille de CopZ, mais importante pour celle de MerP ($56\% \pm 25\%$).

La méthionine du motif de liaison du métal se révèle fortement conservée parmi l'ensemble des protéines alignées. Seules quelques métallochaperones procaryotes de la famille de CopZ ont une isoleucine, une leucine ou une valine à la place. Néanmoins, cela reste un résidu hydrophobe avec une chaîne latérale aliphatique plus ou moins longue. On le trouve toujours enfoui au sein des structures, à l'exception de M12 dans apoMerP de *Shigella flexneri* [Steele et Opella, 1997] et de M11 dans apoBsCopZ [Banci *et al.*, 2003a] qui s'avèrent totalement exposées au solvant (M14 sur la Fig. 2.2).

En outre, une dizaine d'acides aminés hydrophobes (en vert sur la figure 2.2) se retrouvent très conservés dans l'ensemble des séquences alignées. Ces résidus se révèlent pour la plupart toujours très enfouis (ou relativement enfouis) dans les protéines (lorsque leurs structures sont résolues) et participent à la stabilisation de leur structure tertiaire en formant un cœur hydrophobe. C'est le cas par exemple des résidus F9, V11, M14, V23, L27, L30, V36, I40, L42, I49 et L61 chez Hah1 [Wernimont *et al.*, 2000, Anastassopoulou *et al.*, 2004] (la numérotation des résidus

est celle de l'alignement de la figure 2.2).

Une autre caractéristique notable se situe au niveau de la boucle L_5 . Celle-ci comporte presque toujours une glycine (G72 sur la Fig. 2.2), suivie invariablement d'une lysine (K73) dans les protéines eucaryotes, ou d'un acide aminé aromatique dans les métallochaperones bactériennes. Dans les homologues de MerP, il s'agit toujours d'une tyrosine, tandis que parmi la famille de CopZ, cela peut être également une phénylalanine (ou une glutamine dans deux cas).

De même, la boucle L_3 comporte un acide aminé hydrophobe en position 42, fréquemment une leucine pour les chaperones à cuivre et une phénylalanine pour les chaperones à mercure.

Dans le motif $MX_1CX_2X_3C$, seule X_2 représente une position dont la nature du résidu est véritablement variable d'une protéine à une autre. X_3 est relativement conservée au sein d'une même famille de métallochaperones : c'est toujours une glycine dans les métallochaperones eucaryotes, très fréquemment une histidine ou une glycine dans la famille procaryote de CopZ, et souvent une alanine ou une thréonine dans celle de MerP.

2.3 Environnement du métal

Atx1, Hah1, CopZ, ScAtx1 et MerP font intervenir les deux cystéines du motif MXCXXC dans la liaison du métal. Plusieurs études structurales ont été menées sur la géométrie locale du site de chélation des ions métalliques.

2.3.1 Coordination du cuivre(I)

Les détails de la coordination du $Cu^{(I)}$ restent encore incertains. Les structures monomériques de métallochaperones en présence de $Cu^{(I)}$ ont été résolues par RMN. Par cette technique, il n'est pas possible de déterminer la position du métal. La spectroscopie d'absorption de rayons X permet de définir très précisément (avec une précision de l'ordre de 0.02 Å) la structure locale des sites métalliques (à moins de 5 Å du métal), le nombre et la nature de ligands, ainsi que l'état d'oxydation du métal.

2.3.1.1 Coordination par Atx1

Pufahl *et al.* [Pufahl *et al.*, 1997] ont montré qu'Atx1 lie le $Cu^{(I)}$ de manière stable au cours du temps alors que le $Cu^{(I)}$ en solution aqueuse se dismute très rapidement (en $Cu^{(II)}$ et $Cu^{(0)}$). En outre, l'EXAFS de la forme complexée de l'ion a révélé que son site de chélation dans Atx1 est mononucléaire, dans une géométrie tricoordinée et avec des ligands soufrés [Pufahl *et al.*, 1997]. Deux de ces ligands sont les cystéines C15 et C18 portées par Atx1, dont les chaînes latérales sont ionisées (cystéinates). Le troisième ligand n'a pas été identifié. Le soufre de la fonction thioéther de la méthionine M13 a été suspecté mais, par analogie avec la structure d'Atx1 liée à $Hg^{(II)}$ [Rosenzweig *et al.*, 1999], il est trop éloigné pour jouer ce rôle (distance

$S_{\delta}^{M13}-Hg^{(II)}$ d'environ 8 Å).

Le traitement du signal EXAFS a permis d'émettre l'hypothèse la plus probable d'une géométrie dite «2S+1» où l'on considère deux sphères de coordination : 2 atomes S proches de $Cu^{(I)}$ (S_{γ} de C15 et C18) à 2.25 Å, et un troisième à 2.40 Å. Ce dernier est certainement un thiolate exogène. En effet, la préparation expérimentale du complexe $Cu^{(I)}$ Atx1 est réalisée en incubant l'apoprotéine avec un excès de $CuSO_4$, milieu réducteur grâce à un large excès de DTT (1,4-dithiothréitol) dans un rapport DTT:Atx1 de 20:1. Il est fort probable que des molécules de DTT soient associées aux complexes Cu Atx1, si bien que la géométrie observée en EXAFS est celle du complexe Atx1:DTT: $Cu^{(I)}$. En outre, la résolution de la structure de Cu Atx1 en solution par RMN indique un angle $S_{\gamma}-Cu^{(I)}-S_{\gamma}$ de $120^{\circ} \pm 40^{\circ}$ [Arnesano *et al.*, 2001a].

2.3.1.2 Coordination par CopZ chez *Enterococcus hirae*

La coordination du $Cu^{(I)}$ par CopZ chez *Enterococcus hirae* (*EhCopZ*) n'est pas non plus bien élucidée. Cobine *et al.* ont réalisé des expériences d'EXAFS sur *EhCopZ* [Cobine *et al.*, 2002]. Malheureusement, seul un mélange d'espèces digonale et trigonale a été trouvé avec une distance $Cu^{(I)}-S$ de 2.24 Å. Cette distance est intermédiaire entre les distances $Cu^{(I)}-S$ typiques des complexes trigonaux $Cu(I)S_3$ (≈ 2.28 Å) et digonaux $Cu(I)S_2$ (≈ 2.15 Å). En outre, les auteurs ne peuvent pas écarter l'hypothèse que le troisième ligand soit un chlorure puisque, d'une part, l'EXAFS ne peut pas discriminer deux éléments de numéro atomique voisin, et d'autre part, dans un complexe de type chlorodithiolatocuprate(I) $Cu(I)S_2Cl$, les distances $Cu^{(I)}-S$ et $Cu^{(I)}-Cl$ sont de 2.22 Å et 2.27 Å respectivement, distances compatibles avec celle déduite de l'EXAFS. Par conséquent, ces travaux soulèvent à nouveau la question de la nature d'un troisième ligand : un ligand soufré, mais qui, contrairement à Cu Atx1, est équivalent aux deux soufres des cystéines, ou un ligand chloré. De plus, si c'est un thiolate, il provient certainement d'une autre molécule *EhCopZ* car les expériences ont été menées en l'absence de tout composé soufré dans le tampon. Or, Cobine *et al.* ont également montré qu'un seul ion $Cu^{(I)}$ est complexé par protéine, et qu'en EXAFS, aucune distance $Cu^{(I)}-Cu^{(I)}$ n'est décelée. Dans ce cas, les complexes $Cu^{(I)}$ *EhCopZ* formeraient des clusters polynucléaires avec un mélange de géométries bi- et tricoordinées tout en respectant la stœchiométrie globale protéine: $Cu^{(I)}$ de 1:1, et avec des distances $Cu^{(I)}-Cu^{(I)}$ de plus de 5 Å.

Urvoas *et al.* ont en outre montré par spectrométrie de masse qu'en présence d'un coordinant potentiel dans le milieu (glutathion ou TCEP, (tri-(2-carboxéthyl)phosphine)), *EhCopZ* tend à former des complexes ternaires avec le $Cu^{(I)}$ et ce ligand [Urvoas *et al.*, 2004].

En revanche, lorsque $Ag(I)$ est chélaté par *EhCopZ*, seules les deux cystéines C11 et C14 du motif MXCXXC le coordinent [Cobine *et al.*, 2002].

2.3.1.3 Coordination par CopZ chez *Bacillus subtilis*

En présence de DTT, le Cu^(I) prend toujours une géométrie trigonale avec 3 atomes de soufre clairement identifiés à 2.25 Å du métal [Banci *et al.*, 2003b] et un angle S_γ-Cu^(I)-S_γ de 115° ± 26° déduit en RMN [Banci *et al.*, 2001b]. Le DTT participe donc à la première sphère de coordination du Cu^(I) chez *BsCopZ*, contrairement à *Atx1* où il est plus éloigné que les S_γ des cystéines complexantes de la protéine.

Banci *et al.* ont également montré qu'en ajoutant un excès d'acétate ou de citrate dans le milieu, où le complexe ternaire *BsCopZ*:Cu^(I):DTT est préformé, alors *BsCopZ* dimérise [Banci *et al.*, 2003b]. Le Cu^(I) reste trigonal mais l'EXAFS révèle des interactions Cu^(I)-Cu^(I) à 2.67 Å. Les carboxylates favorisent l'homodimérisation de *BsCopZ* sans interférer dans le site métallique. Enfin, si le réducteur du milieu est l'ascorbate au lieu du DTT, l'environnement du métal change et devient du type O+2S+Cu+S où les soufres les plus proches (2.25 Å) sont ceux des cystéines du motif MXCXXC. L'oxygène provient de l'ascorbate, à 1.95 Å du cuivre(I). L'existence d'une interaction avec un second Cu^(I) (à 2.62 Å) et un troisième soufre (à 3.53 Å) révèle l'existence d'un dimère de *BsCopZ* assisté par l'ascorbate.

En absence de DTT, Kihlken *et al.* ont montré que *CopZ* forme des homodimères contenant 0.5, 1 et 1.5 Cu^(I) par protéine selon la quantité de Cu^(I) dans le milieu [Kihlken *et al.*, 2002].

2.3.1.4 Coordination par Hah1

Le mode de coordination du Cu^(I) est ici plus clair. En l'absence de thiol exogène, *Hah1* lie le Cu^(I) grâce aux deux cystéines du motif MXCXXC, dans une géométrie digonale linéaire avec une distance Cu^(I)-S_γ de 2.15 Å [Ralle *et al.*, 2003]. Cette géométrie est confirmée en RMN par la structure en solution d'*Hah1* avec un angle S_γ-Cu^(I)-S_γ de 160° ± 25° [Anastassopoulou *et al.*, 2004].

En outre, Ralle *et al.* ont étudié l'effet de la présence d'un réducteur dans le milieu (GSH, DTT ou TCEP) durant et après la formation du complexe *Hah1*:Cu^(I). Dans le premier cas, la géométrie du Cu^(I) ne change pas, alors que dans le second cas, le Cu^(I) tend à devenir tricoordiné avec des concentrations en ligand exogène croissante. Cependant, la fraction de centres Cu^(I) trigonaux reste inférieure à 50% même à des rapports protéine:ligand de 25:1 pour le glutathion et le DTT. Cela signifie que l'affinité du complexe Cu^(I)*Hah1* est faible pour un troisième ligand. En revanche, le ligand TCEP conduit à des complexes tricoordinés *Hah1*:Cu^(I):TCEP, dès un rapport protéine:ligand supérieurs à 5:1, identifiés distinctement par des distances Cu^(I)-S équivalentes de 2.24 Å caractéristiques des complexes trithiolatocuprate(I).

2.3.1.5 Coordination par *ScAtx1*

ScAtx1 lie le Cu^(I) dans une géométrie originale que l'on ne retrouve pas chez les autres métallochaperones à cuivre. En plus des soufres des deux cystéines, un atome d'azote d'imidazole de l'histidine 61 (N_{e2}) intervient comme troisième ligand

[Borrelly *et al.*, 2004]. Le $\text{Cu}^{(I)}$ est alors tricoordiné avec les distances $\text{Cu}^{(I)}\text{-S}_{\gamma}^{\text{Cys}}$ de 2.24 Å et $\text{Cu}^{(I)}\text{-N}_{e2}^{\text{H61}}$ de 1.93 Å. Cette géométrie est stable, même en présence de DTT.

De surcroît, Banci *et al.* [Banci *et al.*, 2004a] ont montré que le $\text{Cu}^{(I)}$ induit l'homodimérisation de *ScAtx1*. Les deux monomères sont liés par une liaison de coordination avec le $\text{Cu}^{(I)}$, *i.e.* que l'une des deux cystéines ou l'histidine est pontante. Cela reste compatible avec l'EXAFS car les distances $\text{Cu}^{(I)}\text{-Cu}^{(I)}$ que ces modèles impliquent sont supérieures à 5.5 Å environ, contribution non visible en EXAFS à cette distance.

Les différentes coordinations mises en évidence chez les métallochaperones à cuivre sont résumées dans le tableau 2.2.

Protéine	Type de coordination	Nature des ligands	Distances $\text{Cu}^{(I)}\text{-ligands}$ [Å]
Atx1	2S+S	2 S d'Atx1	2.25
		1 S exogène (DTT)	2.40
<i>EhCopZ</i>	Mélange 2S/3S	Tous les S sont protéiques	2.24
	2S+Cl	2 S d' <i>EhCopZ</i> 1 Cl du milieu	2.24
<i>BsCopZ</i>	3S	2 S de <i>BsCopZ</i>	2.25
		1 S exogène (DTT)	2.25
	3S+Cu	2 S de <i>BsCopZ</i>	2.25
		1 S exogène (DTT)	2.25
		1 Cu d'une autre <i>CuBsCopZ</i>	2.67
	O+2S+Cu+S	1 O exogène (ascorbate)	1.95
		2 S de <i>BsCopZ</i>	2.25
1 Cu d'un autre complexe <i>CuBsCopZ</i>		2.62	
	1 S d'un autre complexe <i>CuBsCopZ</i>	3.53	
Hah1	2S	2 S d'Hah1	2.15
<i>ScAtx1</i>	2S+N	2 S de <i>ScAtx1</i>	2.24
		1 N de l'imidazole de H61	1.93

TAB. 2.2 – Tableau récapitulatif des coordinations du $\text{Cu}^{(I)}$ chez les métallochaperones à cuivre.

2.3.2 Coordination du mercure(II)

Contrairement au $\text{Cu}^{(I)}$, $\text{Hg}^{(II)}$ ne présente pas la même versatilité de coordination. $\text{Hg}^{(II)}$ est bicoordiné linéairement par Atx1 et MerP. La signature du mercure(II) en EXAFS et en ^{199}Hg -RMN dans *HgAtx1* [Pufahl *et al.*, 1997], et en ^{199}Hg -RMN de *HgMerP* [Steele et Opella, 1997] sont caractéristiques de complexes dithiolato linéaires. L'EXAFS réalisé sur *HgAtx1* indique des distances $\text{Hg}^{(II)}\text{-S}$ de 2.43 Å. En

outre, la structure cristallographique de CuAtx1 [Rosenzweig *et al.*, 1999] confirme cet environnement pour l'ion $\text{Hg}^{(\text{II})}$.

2.3.3 Quelle(s) coordination(s) *in vivo* ?

L'ensemble de ces études démontrent une certaine plasticité du site de chélation qui peut adopter plusieurs géométries, bien qu'Hah1 semble s'orienter davantage vers une géométrie préférentielle digonale. Ces protéines possèdent des repliements identiques (sauf *ScAtx1* dont le feuillet β est privé de brin β_4), un site métallique de séquence assez conservée (MXCXXC), et des fonctions *in vivo* homologues. Cela pose plusieurs interrogations : étant donné tous ces traits communs, peut-on envisager une géométrie physiologique analogue pour toutes ces métallochaperones (à l'exception de *ScAtx1* qui se démarque avec son mode de chélation N+2S) ? Est-elle digonale ou trigonale ? Si un troisième ligand intervient, quelle est sa nature et son rôle ?

Ralle *et al.* ont mis en évidence la possibilité pour Hah1 d'intégrer un thio-late exogène comme troisième ligand potentiel [Ralle *et al.*, 2003]. Cobine *et al.* ont révélé que, même en l'absence de troisième ligand soufré dans le milieu, le complexe $\text{Cu}^{(\text{I})}:\text{EhCopZ}$ utilise le chlorure pour parvenir à une tricoordination [Cobine *et al.*, 2002]. Dès lors, vu la concentration élevée en glutathion dans la cellule (≈ 5 mM), il s'avère probable que *BsCopZ*, *EhCopZ*, Hah1 et Atx1 forment des complexes trigonaux avec $\text{Cu}^{(\text{I})}$, le troisième partenaire provenant du milieu intracellulaire. Ce dernier peut être une molécule de glutathion comme cela a déjà été proposé, ou une autre métallochaperone, étant donné que les structures cristallographiques d'Hah1 démontrent la capacité de cette protéine à s'homodimériser en présence de métal ($\text{Cu}^{(\text{I})}$, $\text{Hg}^{(\text{II})}$ ou $\text{Cd}^{(\text{II})}$) [Wernimont *et al.*, 2000].

En outre, Tanchou *et al.* ont démontré qu'Hah1 peut former des homodimères *in vitro* et *in vivo* suite à la complexation d'un ion $\text{Cu}^{(\text{I})}$, dans une géométrie probablement trigonale, sans que la concentration en protéine ne soit élevée et même à des concentrations faibles en $\text{Cu}^{(\text{I})}$ [Tanchou *et al.*, 2004].

Similairement, *EhCopZ* [Urvoas *et al.*, 2004], *BsCopZ* [Banci *et al.*, 2003a, Kihlken *et al.*, 2002] et *ScAtx1* [Banci *et al.*, 2004a] peuvent également constituer des homodimères $\text{Cu}^{(\text{I})}$ -dépendants. Cette observation quant à Hah1 confirme que la structure homodimérique mononucléaire d'Hah1 obtenue en cristallographie [Wernimont *et al.*, 2000] n'est pas seulement occasionné par les conditions de cristallisation. Dans cette structure, deux molécules d'Hah1 sont associées au niveau du site de chélation du $\text{Cu}^{(\text{I})}$. L'un des deux monomères complexe l'ion métallique avec ses deux cystéines tandis que l'autre ne lie le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ qu'avec une des deux cystéines (la deuxième du motif MXCXXC), avec des distances $\text{Cu}^{(\text{I})}-\text{S}_\gamma$ de 2.3 Å environ. Le quatrième soufre est supposé trop loin (2.4 Å) pour appartenir à la première sphère de coordination. Les auteurs proposent donc une géométrie trigonale ou tétraédrique distordue pour le $\text{Cu}^{(\text{I})}$. Cela pourrait constituer un modèle d'interaction dans le cas des homodimères de métallochaperones.

D'une manière générale, on peut déduire que d'une part ces métallochaperones tendent à complexer un ion $\text{Cu}^{(\text{I})}$ dans une géométrie trigonale en recrutant un par-

tenaire dans le milieu, et que, d'autre part, ces protéines présentent une propension non négligeable à s'homodimériser.

2.4 Les ATPases partenaires

Les ATPases cibles des métallochaperones de la famille d'Atx1 sont des protéines membranaires de la classe des ATPases de type P, des transporteurs transmembranaires de cations, notamment de métaux lourds. Les ATPases de type P spécifiques du cuivre présentent un ou plusieurs domaines de liaison du métal (MBD, *metal-binding domain*) à leur extrémité cytosolique N-terminale, comme toutes les P-ATPases transportant des métaux lourds [Solioz et Vulpe, 1996], dont certaines caractéristiques sont communes avec leurs partenaires cytosoliques : un repliement analogue à celui de la ferrédoxine ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) et un motif consensus de liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ MXCXXC situé entre β_1 et α_1 .

Le nombre de MBD varie d'une ATPase à l'autre mais augmente selon le degré d'évolution des organismes : CopA en compte un chez *E. hirae* [Solioz et Stoyanov, 2003], deux chez *B. subtilis* [Banci *et al.*, 2002], également deux pour Ccc2 chez *S. cerevisiae* (Ccc2a et Ccc2b) [Fu *et al.*, 1995], Cua-1 de *Caenorhabditis elegans* en possède trois [Sambongi *et al.*, 1997], tandis qu'on en dénombre six pour chacune des deux ATPases humaines partenaires d'Hah1 (Mnk1-6 et Wnd1-6) [Koch *et al.*, 1997].

La réductase de $\text{Hg}^{(II)}$ MerA comporte également en N-terminal un ou deux MBD homologues en séquence et en structure à MerP et à l'ensemble des métallochaperones de la famille d'Atx1, comme les ATPases de la famille de Ccc2 [Rossy *et al.*, 2004, Ledwidge *et al.*, 2005].

Arnesano *et al.* ont mené une étude comparable à celle concernant les métallochaperones de la famille d'Atx1, mais cette fois avec les séquences des MBD des ATPases cibles des métallochaperones [Arnesano *et al.*, 2002]. La séquence de référence pour l'alignement est celle de Ccc2a, le premier MBD situé N-terminal. L'alignement est présenté sur la figure 2.3.

La méthionine (M12 sur la figure 2.3) du motif MXCXXC s'avère également très conservée parmi les MBD, aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. En outre, de façon spécifique aux MBD, on retrouve presque toujours une glycine qui précède M12. D'autre part, M12 est très fréquemment suivie d'une thréonine ou d'une histidine en position 13.

Comme pour les métallochaperones, plusieurs résidus hydrophobes dans les séquences des MBD sont relativement bien conservés, notamment en position 44 dans la boucle L_3 où l'on trouve une leucine ou quelquefois une phénylalanine, et en position 77 (L_5) où c'est très souvent une phénylalanine ou une tyrosine (parfois une proline).

2.5 Interaction(s) avec les ATPases

Huffman et O'Halloran ont montré que le transfert du $\text{Cu}^{(I)}$ d'Atx1 vers Ccc2a est direct et réversible, avec un gradient thermodynamique faible ($K_{\text{eq}} = 1.4 \pm 0.2$), suggérant que la cession du métal au MBD de l'ATPase n'est pas basée sur une

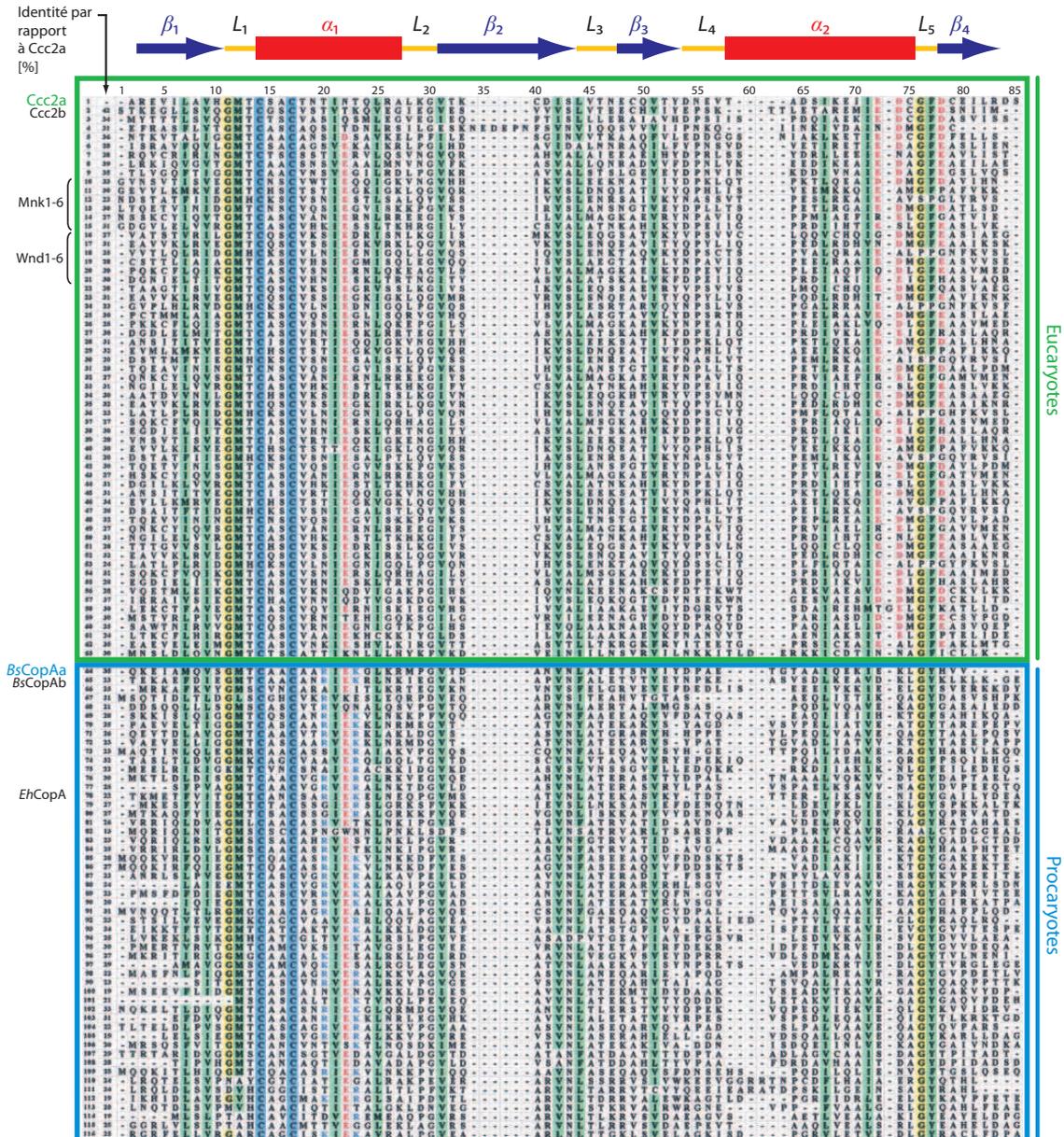


FIG. 2.3 – Alignement des séquences de domaines de liaison de métal homologues à Ccc2a à partir de la séquence de Ccc2a de *S. cerevisiae*; adapté de [Arnesano *et al.*, 2002]. La numérotation des aminoacides inclut les délétions/insertions dans l'alignement. Les deux cystéines liant le métal sont ombrées en bleu, les positions des résidus hydrophobes conservés, en vert. Les résidus basiques (R, K) et acides (D, E) conservés sont indiqués en rouge et en bleu respectivement. Les éléments de structure secondaire représentés sont ceux de Cu^(I)Ccc2a [Banci *et al.*, 2001a]. Les noms des domaines connus sont indiqués devant les séquences correspondantes.

plus grande affinité de ce dernier pour le cuivre(I) [Huffman et O'Halloran, 2000]. Ceci suggère que la barrière d'activation pour le transfert entre les deux partenaires est peu élevée. En outre, la réaction de transfert est rapide entre les deux protéines ($k_{\text{échange}} > 10^3 \text{ s}^{-1}$) [Huffman et O'Halloran, 2000, Arnesano *et al.*, 2001b]. Il semble

que l'évènement clé dans le processus de transfert du $\text{Cu}^{(I)}$ doit alors résider dans la reconnaissance des deux protéines et dans l'orientation relative de leur site de chélation du cuivre.

Les études structurales portant sur Atx1 et Ccc2a ont conduit à un modèle d'interaction entre ces deux protéines, et plus généralement, entre une métallochaperone de la famille d'Atx1 et un MBD d'une ATPase cible. L'hypothèse la plus communément admise repose sur la complémentarité des surfaces électrostatiques entre une métallochaperone donnée et son (ses) MBD cible(s). En effet, Atx1 possède de multiples lysines à sa surface [Rosenzweig *et al.*, 1999, Arnesano *et al.*, 2001a], alors que Ccc2a est riche en résidus chargés négativement (aspartates et glutamates) [Banci *et al.*, 2001a]. La plupart de ces résidus sont très conservés [Arnesano *et al.*, 2002] (Fig. 2.4).

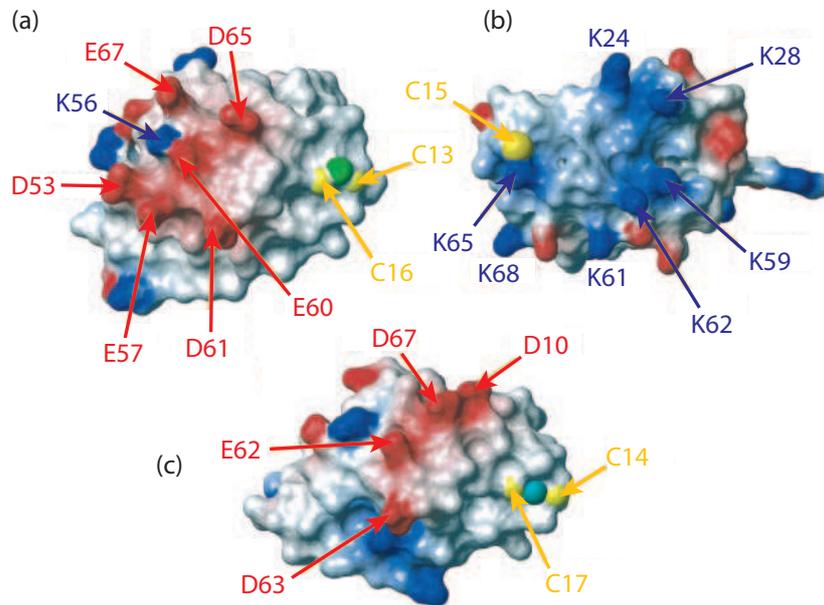


FIG. 2.4 – Surfaces électrostatiques de CuCcc2a (a), de CuAtx1 (b) et d'AgMnk4 (c); adapté de [Banci *et al.*, 2001a]. Les résidus chargés positivement sont en bleu, négativement en rouge, et les neutres en blanc. Les soufres des cystéines sont en jaune. Dans CuAtx1, l'ion $\text{Cu}^{(I)}$ est en vert; dans AgMnk4, $\text{Ag}^{(I)}$ est en cyan.

La mutation de certaines lysines d'Atx1 en glutamate réduit considérablement l'activité d'Atx1 [Portnoy *et al.*, 1999]. Dans le complexe Atx1:Ccc2a: $\text{Cu}^{(I)}$ construit par *docking* par Arnesano *et al.* [Arnesano *et al.*, 2004], plusieurs lysines sont en interaction directe avec les aspartates et les glutamates de Ccc2a à l'interface entre les deux molécules (Fig. 2.5).

La complémentarité des surfaces électrostatiques a également été mise en évidence dans la formation de l'hétérodimère entre CopZ et CopAb chez *B. subtilis* [Banci *et al.*, 2003b] et dans l'interaction d'Hah1 avec les MBD des protéines Mnk et Wnd [Strausak *et al.*, 2003, Banci *et al.*, 2004b, Banci *et al.*, 2005]. En outre, en

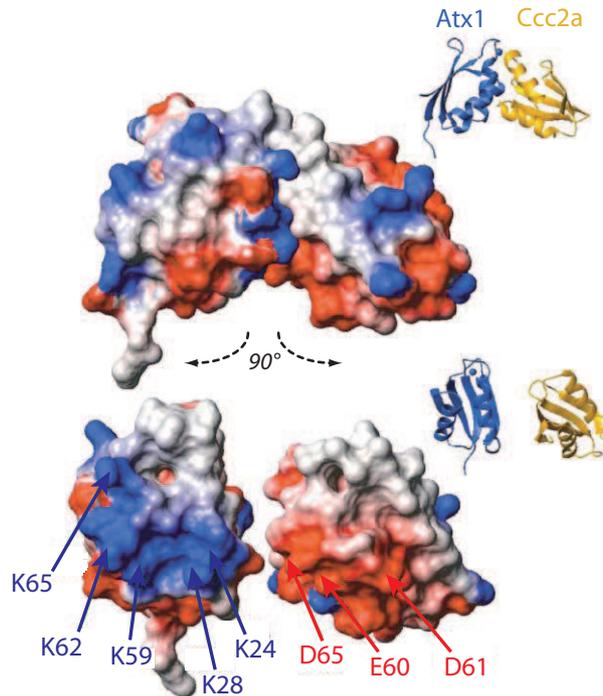


FIG. 2.5 – Complémentarité des surfaces électrostatiques d'Atx1 et de Ccc2a dans le complexe Atx1:Ccc2a:Cu^(I) construit par *docking*; adapté de [Arnesano *et al.*, 2004]. Les résidus chargés positivement sont en bleu, négativement en rouge, et les neutres en blanc. *En bas*, les molécules sont tournées de 90° pour montrer les surfaces d'interaction.

mutant certains résidus de Mnk2 en lysines de manière à ce que sa surface reproduise celle d'*EhCopZ*, Cobine *et al.* ont réussi à induire une interaction de Mnk2 muté avec CopY, une protéine cible de CopZ *in vivo* [Cobine *et al.*, 2002].

Néanmoins, le modèle d'une interaction entre les métallochaperones et les protéines cibles favorisée uniquement par des surfaces électrostatiques complémentaires se révèle insuffisant. D'une part, l'examen seul des surfaces électrostatiques de Mnk2 et de Mnk5 indique qu'elles diffèrent de celle de Ccc2a, alors qu'Hah1 partage les mêmes propriétés de charge qu'Atx1 (elle compte de nombreuses lysines). La formation d'un adduit Hah1:Cu^(I):Mnk2(5) n'est donc pas favorisée si l'on ne considère que les surfaces électrostatiques comme moteurs uniques ou essentiels de l'interaction [Banci *et al.*, 2005].

D'autre part, une étude récente conduite par Morin *et al.* de complémentation *in vivo* d'une souche $\Delta atx1$ de *S. cerevisiae*, démontre que les interactions électrostatiques pourraient ne pas jouer un rôle prépondérant dans la reconnaissance de Ccc2 par Atx1 ou par une protéine homologue fonctionnelle [Morin *et al.*, 2005]. En effet, les auteurs ont mis en évidence que des protéines homologues dont la surface électrostatique est globalement négative (CopZ, Ccc2a et Ccc2b) peuvent interagir avec Ccc2 comme Atx1, qui présente une surface électrostatique positive.

2.6 Modèle de transfert du métal de la métallochaperone à l'ATPase cible

La structure homodimérique et mononucléaire de $\text{Cu}(\text{Hah1})_2$ obtenue en cristallographie [Wernimont *et al.*, 2000] illustre la possibilité que deux motifs MXCXXC pourraient s'ajuster l'un par rapport à l'autre dans l'espace, de telle sorte que le mécanisme de transfert direct du $\text{Cu}^{(I)}$ d'Atx1 à Ccc2 proposé par Pufahl *et al.* [Pufahl *et al.*, 1997] serait alors envisageable [Wernimont *et al.*, 2000, Huffman et O'Halloran, 2000]. Ce mécanisme est présenté sur la figure 2.6.

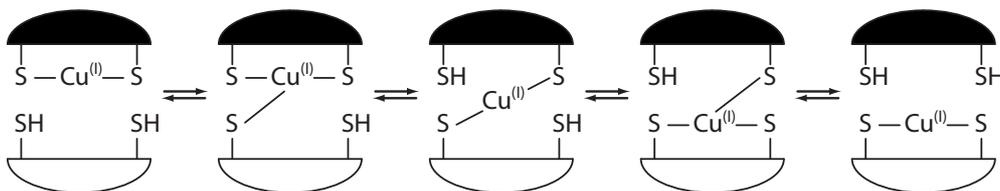


FIG. 2.6 – Mécanisme proposé de transfert du cuivre(I) entre une métallochaperone et un MBD d'une ATPase cible [Pufahl *et al.*, 1997].

Dans ce modèle, quand la métallochaperone liée au $\text{Cu}^{(I)}$ s'associe au MBD cible à l'état apo, le $\text{Cu}^{(I)}$ est bicoordonné, comme il a été observé dans Hah1 en EXAFS [Ralle *et al.*, 2003] ou de façon similaire à HgAtx1 [Rosenzweig *et al.*, 1999]. Puis, une première cystéine de la protéine cible complète la coordination du $\text{Cu}^{(I)}$ qui se retrouve alors avec trois ligands. La géométrie du site métallique est donc trigonale ou tétraédrique distordue, analogue à celle observé pour $\text{Hg}^{(II)}$ dans $\text{Hg}(\text{Hah1})_2$ et pour $\text{Cu}^{(I)}$ dans $\text{Cu}(\text{Hah1})_2$ [Wernimont *et al.*, 2000]. Ensuite, une liaison $\text{S}_\gamma\text{-Cu}^{(I)}$ de la métallochaperone se rompt tandis que la deuxième cystéine du motif MXCXXC de l'ATPase vient la remplacer. Enfin, le $\text{Cu}^{(I)}$ est transféré à l'ATPase dans une géométrie digonale, et la métallochaperone est sous forme apo.

Dans ce mécanisme de transfert, le nombre de ligands du métal varie de 2 à 3. Les structures RMN (appuyées par l'EXAFS) et cristallographique d'Hah1 montrent que cela est possible pour la métallochaperone. Les deux géométries potentielles du $\text{Cu}^{(I)}$ dans l'ATPase (bi- ou tricoordonnée) sont compatibles avec les angles $\text{S}_\gamma\text{-Cu}^{(I)\text{-S}_\gamma}$ observés dans les structures résolues par RMN de Ccc2a ($119^\circ \pm 29^\circ$) [Banci *et al.*, 2001a], de Mnk2 ($140^\circ \pm 40^\circ$) [Banci *et al.*, 2004b] et de Mnk5 ($112^\circ \pm 5^\circ$) [Banci *et al.*, 2005]. Il existe aussi une structure AgMnk4 où l'angle $\text{S}_\gamma\text{-Ag}^{(I)\text{-S}_\gamma}$ est de 180° [Gitschier *et al.*, 1998].

Chapitre 3

Sélectivité de la Complexation des Métaux par les Métallochaperones

Sommaire

3.1	Bases de la sélectivité	29
3.2	Une sélectivité relative <i>in vitro</i>	30
3.2.1	Une protéine, différents métaux, différentes géométries . . .	30
3.2.2	Une protéine, différents métaux, des géométries proches . .	30
3.2.3	Des protéines différentes, un métal, des géométries proches .	31
3.3	Les déterminants de la sélectivité	32
3.3.1	Les ligands protéiques	32
3.3.2	La protéine	33
3.3.3	Le milieu intracellulaire : rôle dans la sélectivité	34

3.1 Bases de la sélectivité

Les concentrations intracellulaires en métaux sont relativement élevées. Ainsi, dans *E. coli*, on estime les concentrations en K et Mg à plus de 10 mM, en Fe, Ca et Zn à environ 0.1 mM, et en Cu, Mn et Mo à 10 μ M [Finney et O'Halloran, 2003]. Ces quantités importantes de métaux posent *a priori* un problème non négligeable dans la fonction des diverses métalloprotéines : *comment la cellule sait-elle, pour une protéine donnée, quel ion mettre dans son site de complexation ?*

Traditionnellement, on considère que la sélectivité de la liaison est due à des propriétés de chélation sophistiquées des apoprotéines [Dudev et Lim, 2001]. Dès lors, les apoprotéines sont supposées orienter exactement leurs chaînes latérales pour correspondre précisément au rayon ionique et aux préférences électroniques de l'ion métallique fonctionnel, par exemple, une protéine Zn^{2+} -dépendante peut discriminer un ion Zn^{2+} d'autres ions comme Cu^{2+} ou Fe^{2+} . Les protéines seraient alors des agents chélatant hautement spécifiques dont les propriétés seraient finement adaptées à l'ion cible. Dans ce modèle, chaque apoprotéine sélectionnerait le bon ion métallique dans le cytoplasme.

Cependant, d'autres modèles possibles pourraient attribuer cette sélectivité à (i) l'abondance naturelle du métal dans le milieu biologique, (ii) aux propriétés du métal (taille, charge *etc*), ou, (iii) aux propriétés de la protéine (nature et stéréochimie des aminoacides constituant le site de chélation).

3.2 Une sélectivité relative *in vitro*

3.2.1 Une protéine, différents métaux, différentes géométries

Les diverses structures RMN et RX des métallochaperones démontrent leur capacité à complexer aussi bien $\text{Cu}^{(I)}$ que $\text{Hg}^{(II)}$ pour Atx1 [Rosenzweig *et al.*, 1999, Arnesano *et al.*, 2001a], ou $\text{Cu}^{(I)}$, $\text{Hg}^{(II)}$ et $\text{Cd}^{(II)}$ pour Hah1 [Wernimont *et al.*, 2000, Anastassopoulou *et al.*, 2004]. En outre, les géométries des diverses holoprotéines varient en fonction de la nature du métal. Pour Atx1, $\text{Cu}^{(I)}$ adopte un environnement trigonal distordu alors que celui de $\text{Hg}^{(II)}$ s'avère digonal. D'autre part, Atx1 et Hah1 ont des séquences et des structures très homologues produisant finalement un site de liaison du métal dont la conformation et la nature des ligands potentiels (tels que les sulfhydryles des cystéines, les carbonyles et les groupements N–H des liaisons peptidiques) varient *a priori* peu d'une protéine à l'autre. Or, les structures cristallographiques d'Hah1 en présence de $\text{Cu}^{(I)}$ et d' $\text{Hg}^{(II)}$ montrent des géométries trigonales, et tétraédrique avec le $\text{Cd}^{(II)}$.

3.2.2 Une protéine, différents métaux, des géométries proches

L'anhydrase carbonique II (CAII) humaine nécessite la liaison de Zn^{2+} pour acquies sa fonction [Håkansson *et al.*, 1992]. Son site de chélation comporte trois histidines et peut complexer différents cations divalents : Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} et Cd^{2+} [Håkansson et Wehnert, 1992, Håkansson *et al.*, 1994, McCall et Fierke, 2004]. Les sites de liaison des trois premiers métaux possèdent des géométries très proches. Les ligands protéiques sont invariablement les atomes $\text{N}_{\epsilon 2}^{\text{H}94}$, $\text{N}_{\epsilon 2}^{\text{H}96}$ et $\text{N}_{\delta 1}^{\text{H}119}$ des imidazoles des histidines, la sphère de coordination étant complétée par un ou deux oxygènes exogènes (d'une molécule d'eau, d'un hydroxyde ou d'une molécule de di-oxygène) selon le métal. La figure 3.1 indique que les structures cristallographiques des trois sites métalliques se superposent remarquablement bien, avec des distances métal–ligand comparables d'un site à l'autre (Tab. 3.1), la seule différence étant pour la position des ligands oxygénés. Zn^{2+} adopte une géométrie trigonale, alors que les complexes du Cu^{2+} et du Co^{2+} sont trigonaux bipyramidaux.

Le fait que l'holoanhydrase carbonique présente un site métallique dont la stéréochimie varie si peu entre l'ion naturel (Zn^{2+}) et $\text{Cu}^{2+}/\text{Co}^{2+}$, pose la question de la sélectivité de l'apoprotéine vis-à-vis du zinc(II). Les trois histidines seules de l'anhydrase carbonique ne suffisent pas à expliquer la sélectivité *in vivo* de la protéine envers le zinc(II) car les ligands protéiques adoptent la même géométrie, quel que soit le métal. Ce sont les ligands exogènes qui diffèrent entre les complexes métalliques de l'enzyme.

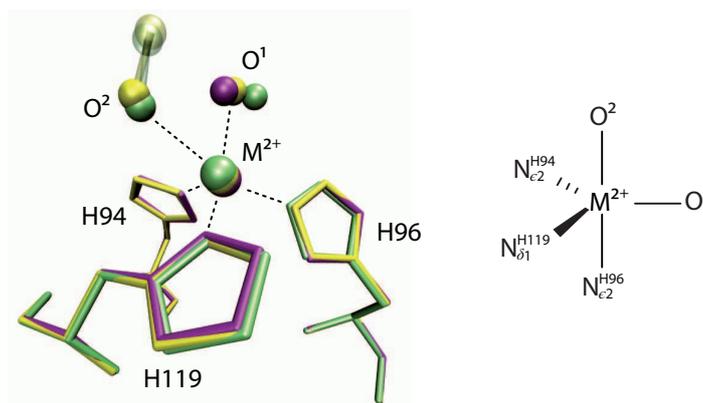


FIG. 3.1 – Géométrie du site métallique de l’anhydrase carbonique II en présence de Zn^{2+} (en violet), Co^{2+} (en jaune) et Cu^{2+} (en vert). M^{2+} est le cation métallique correspondant à chaque chélate.

Métal chélaté	Distances métal–ligand				
	$\text{N}_{\epsilon 2}^{\text{H}94}$ [Å]	$\text{N}_{\epsilon 2}^{\text{H}96}$ [Å]	$\text{N}_{\delta 1}^{\text{H}119}$ [Å]	O^1 [Å]	O^2 [Å]
Zn^{2+}	2.10	2.12	2.11	2.05	—
Co^{2+}	2.16	2.15	2.12	2.06	2.72
Cu^{2+}	2.30	2.21	2.12	2.26	2.38

TAB. 3.1 – Distances métal–ligand dans les sites métalliques de l’anhydrase carbonique II en présence de Zn^{2+} , Co^{2+} et Cu^{2+} .

3.2.3 Des protéines différentes, un métal, des géométries proches

Le nombre et la nature des ligands qui peuvent complexer des ions métalliques dans les protéines se révèlent limités vu que seuls quelques acides aminés ont une chaîne latérale fonctionnalisée susceptible de lier un cation métallique : l’histidine, l’aspartate, le glutamate et la cystéine. Moins fréquemment, la tyrosine et la méthionine peuvent coordonner. Généralement, deux à cinq de ces chaînes latérales sont retrouvées dans les sites de chélation des métalloprotéines.

L’apparente pauvreté en fonctions coordinantes parmi les protéines soulève un autre problème dans la reconnaissance du « bon » métal par l’apoprotéine. L’exemple de l’anhydrase carbonique se révèle encore éloquent. Cette protéine apparaît très répandue chez la plupart des organismes, des bactéries aux mammifères, et catalyse l’interconversion du CO_2 en HCO_3^- . De nombreuses fonctions cellulaires comme la biosynthèse des acides gras et d’autres petites molécules (arginine, pyrimidines, purines *etc*), ainsi que le contrôle du pH, dépendent de son activité enzymatique [Merlin *et al.*, 2003, Suarez Covarrubias *et al.*, 2005]. L’étude d’Håkansson *et al.* [Håkansson *et al.*, 1994] montre que la nature du site de liaison du Zn^{2+} dans l’anhydrase carbonique, à savoir trois histidines accompagnées d’un oxygène, n’est pas caractéristique du Zn^{2+} . Chez *Thermus thermophilus*, la ba_3 -cytochrome *c* oxydase – une enzyme également indispensable – présente un site de complexation du $\text{Cu}^{(\text{II})}$ (noté Cu_B) analogue à celui de l’anhydrase carbonique [Soulimane *et al.*, 2000] (Fig. 3.2).

L'oxygène qui complète la coordination du Cu^{2+} provient d'un anion O^{2-} , OH^- ou d'une molécule d'eau, comme dans l'anhydrase carbonique II [Håkansson *et al.*, 1992]. Cet oxygène est pontant entre le site Cu_B et le fer de l'hème de type a_3 proche des trois histidines mais sans complexer l'ion Cu^{2+} .

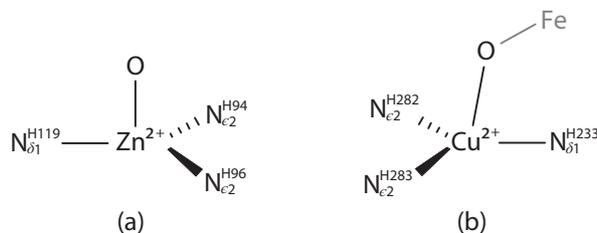


FIG. 3.2 – Géométrie des sites Zn de l'anhydrase carbonique II (a), et Cu_B de la ba_3 -cytochrome c oxydase (b).

La géométrie des histidines s'avère également peu sélective de la nature du cation métallique étant donné les distances métal–ligands comparables entre les deux protéines (Tab. 3.2).

Métal chélaté	Distances métal–ligand			
	$\text{N}_{\delta 1}^{\text{H}1}$ [Å]	$\text{N}_{\epsilon 2}^{\text{H}2}$ [Å]	$\text{N}_{\epsilon 2}^{\text{H}3}$ [Å]	O [Å]
Cu^{2+} (ba_3 -Cco)	2.10	2.21	2.13	2.31
Zn^{2+} (CAII)	2.11	2.10	2.12	2.05

TAB. 3.2 – Distances métal–ligand dans les sites métalliques de la ba_3 -cytochrome c oxydase de *Thermus thermophilus* [Soulimane *et al.*, 2000] et de l'anhydrase carbonique II humaine [Håkansson *et al.*, 1992]. H1, H2 et H3 sont les trois histidines des sites de chélation.

D'autres protéines comme la catéchol oxydase chez divers organismes (chez le champignon *Agaricus bisporus* [Longa *et al.*, 1996] ou chez la plante *Ipomoea batatas* [Klabunde *et al.*, 1998]) fixent le Cu^{II} dans des géométries «His₃O» similaires à la Cco de *Thermus thermophilus*.

3.3 Les déterminants de la sélectivité

Plusieurs facteurs sont soupçonnés de jouer un rôle dans la liaison sélective d'un métal donné dans un site protéique donné [McCall et Fierke, 2004] : la polarisabilité des ligands (théorie HSAB, *Hard and Soft Acids and Bases* de Pearson [Pearson, 1963, Pearson, 1966]), la taille du site de complexation et de l'ion métallique, la géométrie du site de liaison ou du métal, ou la capacité du site à proposer la coordination préférentielle de l'ion métallique [Cavet *et al.*, 2002, Pennella *et al.*, 2003].

3.3.1 Les ligands protéiques

La nature des ligands des métaux induit une certaine sélectivité vis-à-vis d'un ou de plusieurs métaux. Ainsi, la mutation des histidines 94, 96 et 119 dans CAII en asparagine ou en glutamine réduit la sélectivité du site pour le zinc [Lesburg *et al.*, 1997].

D'autre part, les différentes mutations en Asp, Glu, Asn, Gln et Cys de ces trois résidus affectent davantage l'affinité de CAII pour le Zn^{2+} que pour d'autres métaux comme Mn^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+} [McCall et Fierke, 2004]. McCall *et al.* ont en effet montré que, par exemple, la perturbation la plus faible sur l'affinité du site métallique pour un ion est observée pour la mutation H94D. Pourtant, alors que l'affinité de CAII pour les métaux non naturels est diminuée d'un facteur 0 à 50 environ, celle pour le zinc est réduite de 3 à 4 ordres de grandeur (son pK_D passe de 12 à 8.30).

Polarisabilité des ligands Selon la théorie HSAB de Pearson, un métal mou, ou fortement polarisable, tend à s'associer préférentiellement à un ligand mou, alors qu'un métal dur, ou faiblement polarisable, tend à s'associer préférentiellement avec un ligand dur. De façon surprenante, les mutants réalisés par McCall *et al.* [McCall et Fierke, 2004] suggèrent que la polarisabilité des ligands n'est pas un élément majeur dans la sélectivité de la chélation du zinc par CAII car la mutation des His en Asx et Glx augmente l'affinité de CAII pour Cd^{2+} par rapport à celle pour Zn^{2+} . Or, d'une part Cd^{2+} est plus polarisable que Zn^{2+} , et, d'autre part, l'oxygène du carbonyle de Asp/Glu est plus dur que celui de Asn/Gln, lui-même plus dur que les azotes de l'imidazole des His.

Taille du site de complexation Dans la même étude de McCall *et al.*, la longueur des chaînes latérales semble influencer, certes modestement, sur la capacité du site de liaison de CAII à accepter des ions plus gros. Les chaînes Asx sont plus courtes que celles de Glx et offrent un «volume de complexation» potentiel plus grand. Les rayons ioniques de Zn^{2+} et de Cd^{2+} diffèrent (0.88 Å et 1.09 Å respectivement). Les mutants de CAII présentent une affinité relative de Cd^{2+} vs Zn^{2+} favorable à Cd^{2+} en présence de ligands Asx, plutôt que Glx.

3.3.2 La protéine

Géométrie du site de coordination Le nombre et la disposition spatiale des ligands déterminent une certaine sélectivité d'un site pour un métal donné. Les mutants H94D, H94E, H119D, H119N et H119Q de CAII favorisent une géométrie trigonale bipyramidale que Zn^{2+} peut adopter, mais aussi Cu^{2+} [Lesburg *et al.*, 1997, McCall et Fierke, 2004]. Il semble donc probable que la protéine stabilise une géométrie tétraédrique de ses ligands de manière à pouvoir offrir au zinc un site préférentiel. La protéine semble ainsi posséder une certaine plasticité conformationnelle qui permet de positionner de manière optimale ses résidus pour qu'ils puissent se lier à un métal.

Une étude de la sélectivité du Zn^{2+} par rapport à Mg^{2+} menée par Dudev et Lim [Dudev et Lim, 2001] confirme cette hypothèse. Bien que Mg^{2+} soit un cation plus dur que Zn^{2+} , les deux ions semblent pouvoir occuper des sites analogues. Dans de nombreuses structures cristallographiques, ces deux ions occupent les mêmes sites. Néanmoins, Mg^{2+} préfère une coordination de 6 (géométrie préférentielle octaédrique), alors que Zn^{2+} est souvent accompagné de 4 ligands. L'étude théorique de Dudev et Lim montre que Zn^{2+} peut déplacer Mg^{2+} de son site de complexation octaédrique

mais la situation inverse n'est pas favorable. Mg^{2+} peut déloger Zn^{2+} d'un site de géométrie tétraédrique si des chaînes latérales (ou des facteurs exogènes) proches du site de chélation peuvent le lier directement et lui fournir ainsi une coordination octaédrique.

Seconde sphère de coordination Les acides aminés présents autour du site de chélation mais n'intervenant pas directement dans la complexation du métal, revêtent une importance primordiale dans la sélectivité à l'égard d'un métal donné. En effet, ces résidus assurent un réseau d'interactions qui positionnent convenablement les ligands de manière à optimiser et à stabiliser la géométrie du site. Ainsi, dans le cas de CAII (Fig. 3.3), les résidus hydrophobes F93, F95 et W97 servent d'ancres à H94 qui la préoriente dans une géométrie favorable à un site tétraédrique dans l'apoenzyme, notamment en positionnant Q92 pour qu'elle puisse contracter une liaison hydrogène avec $N_{\delta 1}^{H94}$ [Cox *et al.*, 2000]. L'hydroxyle de la chaîne latérale de T199 est également important car dans la protéine liée au zinc, il permet *via* une liaison hydrogène de positionner correctement le ligand exogène OH^- dans une géométrie tétraédrique [Håkansson *et al.*, 1992].

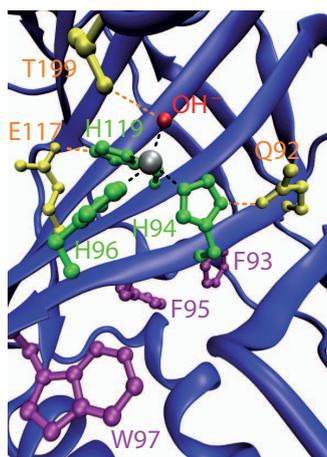


FIG. 3.3 – Arrangement tridimensionnel des résidus de la seconde sphère de coordination du Zn^{2+} dans l'anhydrase carbonique II.

3.3.3 Le milieu intracellulaire : rôle dans la sélectivité

Le milieu intracellulaire peut conférer une sélectivité pour un métal donné à une voie métabolique. Par exemple, quand la protéine NmtR de *Mycobacterium tuberculosis* lie $Ni^{(II)}$ ou $Co^{(II)}$, elle devient active. D'après l'étude de Cavet *et al.* [Cavet *et al.*, 2002], quand cette protéine est exprimée dans une cyanobactérie, elle perd toute sensibilité au $Ni^{(II)}$ qui est pourtant son effecteur allostérique le plus puissant. Elle est produite, accumulée dans le cytoplasme, fonctionnelle, compétente pour détecter la présence de cobalt(II), néanmoins totalement incapable de détecter le nickel, même à des concentrations létales. Cette observation révèle l'existence d'une sélectivité pour le nickel induite par le cytosol hôte. Clavet *et al.* propose l'existence d'une métallochaperone à $Ni^{(II)}$, cytosolique, partenaire de NmtR, qui

permet à NmtR de complexer le métal. Cette métallochaperone est absente du cytosol de la cyanobactérie.

La sélectivité du magnésium par rapport au zinc procède également en partie du milieu cellulaire. De nombreuses protéines ont opté pour Mg^{2+} comme cofacteur car il est extrêmement abondant dans la cellule. Pourtant, ce ne sont pas les protéines qui ont évolué pour sélectionner le magnésium des autres cations car $Zn^{(II)}$ peut, par exemple, facilement le déplacer des sites où il est lié.

A la place, c'est la machinerie cellulaire qui s'est développée pour contrôler la sélectivité des protéines pour les métaux en régulant les concentrations de Mg^{2+} et Zn^{2+} et en adressant les cations métalliques vers les protéines et les compartiments intracellulaires où ils sont nécessaires [Dudev et Lim, 2001].

Chapitre 4

Objectifs de la Thèse

Plusieurs structures tridimensionnelles de métallochaperones et de domaines de liaison des métaux de leurs ATPases cibles sont désormais disponibles. Ces structures ont été résolues dans diverses conditions, en présence ou en absence d'ion métallique chélaté. Il est intéressant de noter que parmi les holoprotéines dont la structure est connue, plusieurs ne comportent pas le métal qu'elles transportent *in vivo*. Ainsi, on dispose de structures d'Atx1 liées au $\text{Cu}^{(\text{I})}$, mais aussi au $\text{Hg}^{(\text{II})}$, ou d'Hah1 complexant un ion $\text{Cu}^{(\text{I})}$, $\text{Hg}^{(\text{II})}$ ou $\text{Cd}^{(\text{II})}$.

Le chapitre 2 a montré l'existence d'une grande homologie de séquence et de structure entre les diverses métallochaperones à cuivre, mais également à mercure. La question de la sélectivité des métallochaperones se pose donc. Plusieurs aspects de la sélectivité des métalloprotéines pour un métal ont été abordé au chapitre 3 et conduisent à se demander comment des protéines aussi proches dans leurs structures primaires, secondaires et tertiaires que les métallochaperones de la famille d'Atx1 et de MerP, peuvent transporter spécifiquement du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ou du $\text{Hg}^{(\text{II})}$ dans la cellule, et complexer, *a priori* aussi facilement (du moins *in vitro*), des métaux sans lien avec leur fonction biologique.

L'étude qui suit a ainsi cherché à déterminer quelles propriétés pouvaient supporter la sélectivité de la complexation du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ et du $\text{Hg}^{(\text{II})}$ par les protéines Atx1, Hah1 et MerP. Une étude de type structure-dynamique-sélectivité a donc été entreprise. L'intérêt d'étudier ces trois protéines permet d'effectuer une analyse croisée de la sélectivité : Atx1 et Hah1 sont des métallochaperones à cuivre, alors que MerP en est une à mercure. Les méthodes mises en œuvre sont la simulation de dynamique moléculaire pour une grande part, et l'absorption de rayons X.

La dynamique moléculaire est une méthode qui permet d'analyser des propriétés structurales et dynamiques des molécules simulées de façon très précise. Des potentiels d'interaction entre un $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ou un $\text{Hg}^{(\text{II})}$ ont été développés au laboratoire [Fuchs *et al.*, 2005], et utilisés dans les simulations. Chaque protéine a été simulée sous trois formes : apo, liée au $\text{Cu}^{(\text{I})}$ et liée au $\text{Hg}^{(\text{II})}$. A partir de ces simulations, une étude comparative entre les divers états d'une même protéine, et entre les trois protéines a été menée pour tenter d'identifier des propriétés fondamentales

pouvant être reliées à la sélectivité pour le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ou le $\text{Hg}^{(\text{II})}$ dans Atx1, Hah1 et MerP.

On dispose de données précises sur l'environnement du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ dans Hah1 grâce aux expériences d'absorption de rayons X de Ralle *et al.* [Ralle *et al.*, 2003]. On sait que dans certaines conditions, le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ est dans une géométrie linéaire quand il est complexé par Hah1. A l'inverse, CopZ de *Bacillus subtilis* ne chélate le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ que dans un environnement trigonal [Banci *et al.*, 2003b]. Concernant Atx1, depuis les expériences d'absorption de rayons X de Pufahl *et al.* [Pufahl *et al.*, 1997], un doute subsiste sur le site de chélation du $\text{Cu}^{(\text{I})}$. Il est supposé trigonal, mais cette géométrie est certainement imposée par un réducteur (le DTT) dans le milieu. De plus, le criblage de structures organo-métalliques dans la *Cambridge Structural Database* [Allen *et al.*, 1979] montre que le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ tend préférentiellement à développer des coordinations avec 3 ou 4 ligands, moins souvent avec 2. Par conséquent, afin de statuer sur le mode de coordination du $\text{Cu}^{(\text{I})}$, de nouvelles expériences d'absorption de RX ont été réalisés et confrontées aux résultats des simulations. Cela a conduit à proposer un modèle de sélectivité du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ pour Atx1, *in vitro* et *in vivo*.

Deuxième partie
Outils & Méthodologies

Chapitre 5

La Dynamique Moléculaire

Sommaire

5.1	La mécanique moléculaire	43
5.1.1	Principe	43
5.1.2	Le champ de forces	44
5.1.3	Paramétrisation de CHARMM	47
5.1.4	Nouveaux paramètres pour l'interaction cystéine–métal	50
5.2	La dynamique moléculaire	54
5.2.1	Dynamique newtonienne	54
5.2.2	Dynamique de Langevin	56
5.3	Techniques numériques de dynamique moléculaire	57
5.3.1	Intégration du temps	57
5.3.2	Conditions initiales	58
5.3.3	Durée du pas de temps	59
5.3.4	Conditions aux limites	59
5.3.5	Traitement des interactions à longue distance	60
5.3.6	Contrôle de la température	65
5.3.7	Contrôle de la pression	66
5.4	Protocole de simulation	67
5.5	Analyse des simulations de dynamique moléculaire	69
5.5.1	RMSD et RMSF	69
5.5.2	Carte des corrélations croisées dynamiques	70
5.5.3	Liaisons hydrogène	71
5.5.4	Repliement des protéines	71
5.5.5	Accessibilité au solvant	73
5.5.6	Estimation de l'erreur statistique sur une moyenne	73

La cristallographie de rayons X (RX) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) permettent aujourd'hui d'obtenir de nombreuses structures de molécules de complexes biologiques (protéines, acides nucléiques, complexes nucléoprotéiques, *etc.*). Ces structures dont le nombre croît rapidement, sont librement disponibles sur le site de la *Protein Data Bank*¹ [Berman *et al.*, 2000]. Résoudre une structure consiste à déterminer les coordonnées tridimensionnelles des atomes de la molécule d'intérêt. Néanmoins, il ne faut pas considérer les molécules biologiques comme des édifices figés. L'image statique des structures suggérée par les positions atomiques (x, y, z) doit être abandonnée au profit d'une représentation dynamique des molécules où les atomes sont en mouvement constant. Ces mouvements peuvent être locaux et rapides, ou collectifs et plus lents, impliquant ainsi des groupes d'atomes voire des domaines entiers de la molécule. Ils créent donc un ensemble de conformations possibles pour la molécule donnée à une température donnée. Le tableau 5.1 adapté de [McCammon, 1984] donne une classification de l'ensemble des mouvements internes des protéines.

Types de mouvements	Etendue spatiale (nm)	Amplitude (nm)	Temps caractéristique (s)
Vibration relative d'atomes liés	0.2-0.5	0.001-0.01	10^{-14} - 10^{-13}
<i>Vibration élastique de région globulaire</i>	<i>1-2</i>	<i>0.005-0.05</i>	<i>10^{-12}-10^{-11}</i>
<i>Rotation des chaînes latérales en surface</i>	<i>0.5-1</i>	<i>0.5-1</i>	<i>10^{-11}-10^{-10}</i>
<i>Libration torsionnelle de groupes enfouis</i>	<i>0.5-1</i>	<i>0.0.5</i>	<i>10^{-11}-10^{-9}</i>
<i>Mouvement relatif de différentes régions globulaires (charnière et courbure)</i>	<i>1-2</i>	<i>0.1-0.5</i>	<i>10^{-11}-10^{-7}</i>
Rotation de chaînes latérales de taille moyenne à l'intérieur de la protéine	0.5	0.5	10^{-4} -1
Transitions allostériques	0.5-4	0.1-0.5	10^{-5} -1
Dénaturation locale	0.5-1	0.5-1	10^{-5} -10

TAB. 5.1 – Caractéristiques de quelques mouvements de protéines (adapté de [McCammon, 1984]). En italique, les mouvements accessibles en dynamique moléculaire.

Ces fluctuations structurales, issues de la superposition de mouvements de vitesse et d'amplitude très différentes, contribuent à l'activité biologique des protéines et influent sur leur capacité à lier un substrat, une protéine partenaire ou un cofacteur. Les mouvements internes créent une variation d'une part, du volume du site de liaison du ligand et, d'autre part, de la disposition des groupements impliqués dans sa liaison. Ils modulent ainsi les interactions (électrostatiques, hydrophobes et liaisons hydrogène) au sein du site de liaison de manière à rendre la protéine plus *élastique*. L'exemple de l'aptitude de la myoglobine à lier O₂ et CO en est l'un des plus connus. Dans cette protéine, la réorientation de trois chaînes latérales par un mouvement de rotation locale permet au substrat de s'échapper de la protéine [Karplus et McCammon, 1983].

¹<http://www.rcsb.org/pdb>

Il est possible d'étudier expérimentalement les propriétés dynamiques des molécules biologiques. En plus des coordonnées atomiques, la diffraction de rayons X renseigne sur une certaine dynamique des atomes grâce au facteur de Debye-Waller (ou facteur de température), B :

$$B = \frac{8\pi^2}{3} \langle (\Delta \mathbf{r})^2 \rangle. \quad (5.1)$$

Le déplacement quadratique moyen apparent $\langle (\Delta \mathbf{r})^2 \rangle$ des atomes inclut une contribution à la fois du réseau cristallin, en traduisant le désordre intrinsèque du cristal, et des mouvements atomiques dépendant de la température (fluctuations conformationnelles et vibrationnelles). Le facteur B n'apporte donc que des informations partielles et moyennées sur l'ensemble des mailles du cristal concernant la dynamique interne de la protéine cristallisée.

Différentes techniques expérimentales (spectroscopies de fluorescence, de RX, neutrons, RMN *etc*) permettent de sonder la dynamique des protéines sur des échelles de temps allant de la femtoseconde à la microseconde. Pour la gamme entre la femtoseconde et la nanoseconde, une comparaison est alors possible avec la dynamique moléculaire.

Cependant, la caractérisation expérimentale de la dynamique des protéines à l'échelle atomique demeure difficile et incomplète tant les échelles de temps des divers mouvements sont différentes, allant de la femtoseconde à la seconde, voire à plusieurs dizaines de secondes. Une méthode alternative à l'étude *in vitro* des mouvements des protéines consiste à simuler *in silico* la dynamique des protéines grâce à la modélisation moléculaire. Plusieurs approches existent, dont celle de la dynamique moléculaire.

5.1 La mécanique moléculaire

5.1.1 Principe

La mécanique moléculaire décrit les interactions interatomiques intermoléculaires et intramoléculaires. Ces interactions sont modélisées empiriquement à l'aide d'un potentiel d'interaction reproduisant au mieux des données expérimentales disponibles, telles que des spectres vibrationnels, ou encore des grandeurs calculées *ab initio* par mécanique quantique. L'énergie potentielle de la molécule (U_p) est une somme de termes dépendant de plusieurs paramètres, tels que les positions et les charges partielles atomiques. La forme analytique de l'énergie potentielle et le jeu de paramètres d'interactions interatomiques nécessaires à son calcul constitue le champ de forces. Contrairement à la mécanique quantique, les électrons ne sont pas traités explicitement et les atomes sont représentés par des masses ponctuelles chargées. La mécanique moléculaire ne permet pas l'étude de la formation ou de la rupture de liaisons covalentes entre les atomes, ni même d'obtenir des informations sur des transferts d'électrons entre des atomes ou des états électroniques excités des atomes.

5.1.2 Le champ de forces

5.1.2.1 Expression générale

La fonction d'énergie potentielle caractérisant le champ de forces, a pour rôle de reproduire le plus fidèlement possible toutes les interactions intramoléculaires et intermoléculaires présentes dans le milieu. Les champs de forces classiques utilisés pour la simulation des protéines et des acides nucléiques, tels que CHARMM27 [Foloppe et MacKerell, 2000] et AMBER-*ff94* [Cornell *et al.*, 1995], ont des fonctions d'énergie potentielle assez proches définies en tant que sommes des contributions des interactions auxquelles chaque atome est soumis (propriété d'additivité des potentiels d'interaction). Le modèle moléculaire utilisé considère les atomes comme des boules, et les liaisons comme des ressorts. Dans CHARMM27, la fonction d'énergie potentielle peut être décomposée ainsi :

$$\begin{aligned}
 U_p = & \sum_{\text{liaisons}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{dièdres}} k_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta)) \\
 & + \sum_{\text{impropres}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{UB}} k_\xi (\xi - \xi_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{non liés}} \sum \left\{ \left[\left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right\} \quad (5.2)
 \end{aligned}$$

Deux types de termes existent selon les interactions que l'on considère : les termes liés (ou internes) et les termes non liés (ou externes).

Les premiers termes correspondent aux interactions entre des atomes distants d'au plus trois liaisons covalentes (Fig. 5.1a). Ils représentent les déformations subies par l'édifice covalent du fait des divers modes de vibration et de rotation des atomes. Ce sont les termes d'élongation des liaisons covalentes entre deux atomes (*stretching*), de déformation des angles de valence entre trois atomes (*bending*) et de torsion des angles dièdres formés par quatre atomes liés consécutivement (appelés dièdres propres).

A ceux-là s'ajoutent les termes de dièdre impropre et les termes d'Urey-Bradley. Les dièdres impropres (Fig. 5.1b) maintiennent une certaine disposition spatiale d'un groupe de quatre atomes qui ne se suivent pas séquentiellement. C'est le cas par exemple de la liaison peptidique et des cycles aromatiques dont la planéité est assurée par un angle impropre. Les dièdres impropres empêchent également les inversions de configuration des centres énantiomériques tels que les C_α des acides aminés (à l'exception de la glycine) qui sont tous en configuration absolue L. Les termes d'interaction 1-3 d'Urey-Bradley (Fig. 5.1c) ajoutent une contrainte de distance entre deux atomes espacés de deux liaisons covalentes.

L'ensemble des termes liés, à l'exception des termes de torsion, est traité de manière harmonique où $r - r_0$, $\theta - \theta_0$, $\omega - \omega_0$ et $\xi - \xi_0$ sont les déviations respectives des longueurs de liaison, des angles de valence, des dièdres impropres et des distances

d'Urey-Bradley, par rapport à leur position d'équilibre respective, r_0 , θ_0 , ω_0 et ξ_0 . Les facteurs k_r , k_θ , k_ω et k_ξ sont les constantes de force associées aux interactions. La variation des angles dièdres propres est modélisée par les premiers termes d'une série de Fourier où n est la périodicité et δ l'angle de phase du dièdre ϕ . k_ϕ est la constante de force du dièdre.

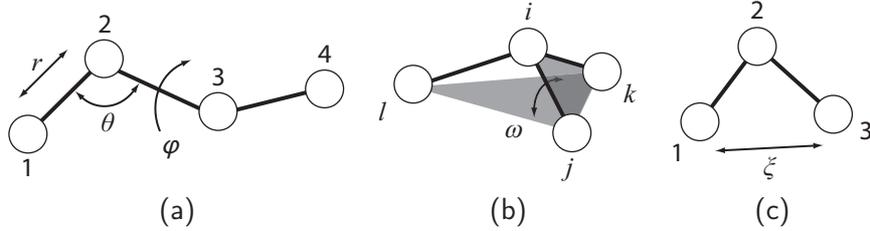


FIG. 5.1 – Illustration des termes liés utilisés dans le champ de forces de CHARMM : (a) termes associés aux liaisons covalentes, aux angles de valence et de torsion ; (b) terme de dièdre impropre ; (c) terme d'Urey-Bradley.

Les termes non liés concernent les interactions électrostatiques et de van der Waals entre les atomes séparés par plus de 4 liaisons covalentes. Les interactions électrostatiques sont traitées par un terme coulombien (avec q_i et q_j les charges partielles des atomes i et j distants de r_{ij} , ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide et ϵ_r la permittivité diélectrique relative du milieu).

Les interactions de van der Waals sont représentées grâce à un potentiel de Lennard-Jones (dit potentiel 6-12). Le potentiel de Lennard-Jones se compose d'un terme répulsif et d'un terme attractif. Le premier répond au principe d'exclusion de Pauli : deux nuages électroniques ne peuvent pas s'interpénétrer car deux électrons ne peuvent pas occuper le même état quantique. Le terme attractif rend compte de la dispersion (interaction dipôle induit–dipôle induit de London) : deux atomes sont soumis à des interactions attractives, indépendamment de l'électrostatique, dues aux mouvements des électrons autour des noyaux qui créent des dipôles instantanés. Les interactions de van der Waals n'agissent qu'à très courte distance. On peut formuler le potentiel de Lennard-Jones de façon plus explicite en fonction de l'énergie d'interaction ε_{ij} au minimum du puits de potentiel et de la distance r_{ij}^{\min} correspondant à cette énergie :

$$U_{\text{vdW}} = \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5.3)$$

r_{ij}^{\min} est calculé à partir des rayons de van der Waals R_i^{vdW} et R_j^{vdW} des deux atomes i et j ($r_{ij}^{\min} = R_i^{\text{vdW}} + R_j^{\text{vdW}}$). Le terme attractif entre les i et j varie en r_{ij}^{-6} tandis que le répulsif croît rapidement en r_{ij}^{-12} .

Les différences entre les divers champs de forces résident moins dans la forme des équations utilisées pour certains termes – par exemple AMBER et OPLS-AA [Jorgensen *et al.*, 1995] n'ont pas de terme d'Urey-Bradley – que dans le principe d'optimisation des termes non liés (q_i , σ_{ij} et ε_{ij}). Le traitement des hydrogènes diffère aussi : certains champs de forces sont dits «tout atome» (*all-atom*), tels que CHARMM22 [MacKerell *et al.*, 1998] et OPLS-AA, car tous les atomes sont explicitement traités dans le calcul de l'énergie potentielle, tandis que d'autres comme

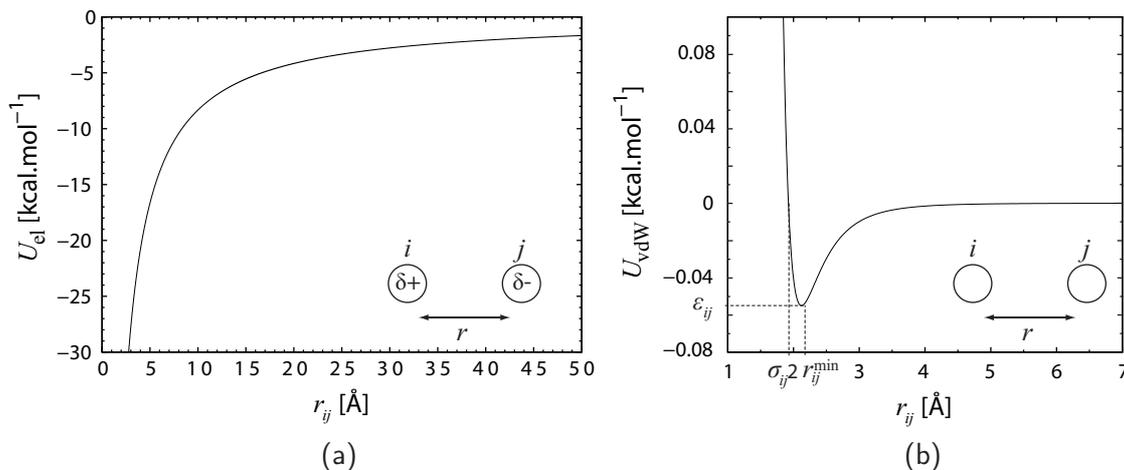


FIG. 5.2 – Illustration des termes non liés dans le champ de forces de CHARMM. (a) Interaction coulombienne entre deux atomes de charges partielles opposées (valeurs numériques tirées de CHARMM27 pour un H_{ζ} de lysine ($q = 0.33$) et un $O_{\epsilon 2}$ de glutamate ($q = -0.76$)). (b) Interaction de van der Waals entre deux atomes, r_{ij}^{\min} et ϵ_{ij} correspondent à la distance et à l'énergie au minimum du puits de potentiel (valeurs numériques tirées de CHARMM27 pour une interaction entre deux $C sp^3$ de méthylènes aliphatiques (type CT2) pour lesquels $\epsilon_{CT2,CT2} = -0.055$ kcal.mol $^{-1}$ et $r_{CT2,CT2}^{\min} = 2.175$ Å). σ_{ij} est la distance interatomique qui annule le potentiel.

CHARMM19 [Neria *et al.*, 1996] sont «atomes unifiés» ou «atomes étendus» (*united-atoms, extended-atoms*). Dans ce cas, les hydrogènes non polaires sont pris en compte implicitement dans les paramètres (masse, rayon de van der Waals) de l'atome lourd «étendu» auquel ils sont liés (carbones des méthylènes et des méthyles aliphatiques des chaînes latérales et soufre du sulfhydryle de la cystéine).

5.1.2.2 Les liaisons hydrogène

Un terme de liaison hydrogène est parfois ajouté à la fonction d'énergie potentielle U_p . Il peut prendre diverses formes analytiques comme un potentiel de Lennard-Jones de type 6-12 dans CHARMM27, OPLS-UA [Jorgensen et Rives, 1988] et AMBER-*ff94* [Cornell *et al.*, 1995], un potentiel 10-12 dans AMBER-*ff86* [Weiner *et al.*, 1984], auquel on peut ajouter une directionnalité grâce à un terme en cosinus, comme par exemple dans la première version de CHARMM (Eq. 5.4) [Brooks *et al.*, 1983] :

$$U_{LH} = \epsilon_{LH} \left[\left(\frac{C_{A \cdots H}}{r_{A \cdots H}} \right)^{12} - \left(\frac{D_{A \cdots H}}{r_{A \cdots H}} \right)^{10} \right] \cos(\theta_{D-H \cdots A}) \quad (5.4)$$

où pour tout couple d'atomes liés par une liaison hydrogène (LH), D et A sont respectivement les atomes donneur et accepteur de la liaison hydrogène. $\theta_{D-H \cdots A}$ est l'angle formé par la liaison covalente D–H et la liaison hydrogène $A \cdots H$.

Néanmoins, les versions récentes des champs de forces comme AMBER et CHARMM n'ont plus de terme explicite de liaison hydrogène. Elles sont traitées par une combinaison des termes de van der Waals et électrostatiques.

5.1.3 Paramétrisation de CHARMM

5.1.3.1 Philosophie de la paramétrisation

D'après l'équation 5.2 du champ de forces de CHARMM, il est possible de décrire toutes les interactions interatomiques d'un système connaissant les paramètres liés $\{k_r, r_0\}$ des liaisons covalentes, $\{k_\theta, \theta_0\}$ des angles de valence, $\{k_\phi, n, \delta\}$ des dièdres de torsion, $\{k_\omega, \omega_0\}$ des dièdres impropres, et $\{k_\xi, \xi_0\}$ des termes d'Urey-Bradley, ainsi que les charges partielles $\{q_i\}$ de tous les atomes, et les constantes d'interaction de van der Waals $\{\varepsilon_{ij}, \sigma_{ij}\}$ pour tout couple d'atomes. Chacun de ces paramètres est associé à un type donné d'atome dans un environnement covalent donné. Cela signifie qu'un atome d'oxygène de carbonyle est différent d'un oxygène d'hydroxyle, de même un atome de carbone d'une liaison simple C–C et un autre d'une liaison double C=C ont des paramètres distincts. De la qualité de l'ensemble de ces paramètres dépend la capacité et la précision à reproduire *in silico* par mécanique ou dynamique moléculaire des observables expérimentales ou des résultats de mécanique quantique.

Les paramètres d'un champ de forces sont issus de calculs effectués sur des composés modèles connus, décrits dans la littérature, et permettant de reproduire au mieux les caractéristiques de chacun des atomes ou de groupes d'atomes de la molécule à modéliser. Cela soulève deux points importants dans la philosophie de la paramétrisation d'un champ de forces : sa transférabilité et son applicabilité.

- **Transférabilité des champs de forces**

La transférabilité concerne la capacité du jeu de paramètres d'un champ de forces, optimisé à partir de quelques composés de référence et de certaines données issues de ces composés, à être utilisé pour simuler de nouvelles molécules. Ainsi, les paramètres de dièdre propre autour d'une liaison C–C peuvent être optimisés à partir de l'éthane. Dans un champ de forces transférable, ces paramètres peuvent être utilisés pour étudier la surface d'énergie rotationnelle de la liaison C²–C³ du *n*-butane. En revanche, dans l'hypothèse de non-transférabilité, les paramètres de torsion des dièdres C–C–C–C et C–C–C–H du *n*-butane sont considérés propres au *n*-butane et sont optimisés en utilisant les données du *n*-butane comme références.

La notion de transférabilité doit donc être traitée avec soin et elle est largement associée à la similarité chimique entre les molécules de référence et les molécules d'intérêt. De surcroît, les champs de forces utilisés en simulation biomoléculaire comme CHARMM et AMBER reposent sur une fonction d'énergie potentielle dont la forme mathématique apparaît trop simpliste pour pouvoir être employée sans précaution sur n'importe quel composé test. La meilleure démarche reste donc celle de l'hypothèse de transférabilité minimale : plus la molécule étudiée diffère des composés modèles utilisés pour paramétrer un champ de forces, moins les résultats obtenus des simulations doivent être considérés comme fiables et précis [Halgren, 1999].

- **Applicabilité des champs de forces**

Le critère d'applicabilité définit les molécules qui peuvent être simulées correctement avec le champ de forces. Ainsi, le champ de forces CHARMM22 a été réoptimisé de manière à mieux rendre compte des propriétés des acides nucléiques. Le nouveau champ de forces, CHARMM27 corrige les erreurs de CHARMM22.

L'applicabilité comprend aussi la représentation de l'environnement : simulation en phase gazeuse (*i.e.* dans le vide) ou condensée (en solution, dans une membrane ou un cristal), solvation explicite (CHARMM27, AMBER-*ff03* [Duan *et al.*, 2003]) ou implicite (CHARMM19, AMBER-*ff86*). Dans le cas où l'on traite explicitement du solvant, il faut aussi tenir compte du modèle de solvant utilisé lors de la paramétrisation. CHARMM est optimisé pour des molécules d'eau TIP3P [Jorgensen *et al.*, 1983] alors que GROMACS [Lindahl *et al.*, 2001] l'est pour les modèles SPC [Berendsen *et al.*, 1981] et SPC/E [Berendsen *et al.*, 1987]. Changer de modèle de solvant peut perturber la cohérence du jeu de paramètres et remettre en cause son applicabilité, même si *a priori* la molécule d'intérêt seule peut être simulée par un champ de forces donné.

5.1.3.2 Procédure de développement de paramètres

- **Sélection des composés modèles**

Le choix des composés modèles est primordial dans la paramétrisation. Une première difficulté à surmonter dans le développement d'un champ de forces tel que CHARMM, est la relative variabilité chimique des acides aminés : alcool, phénol, thiol, thioéther, amines, amide, *etc.* Cela requiert un grand nombre de composés de référence caractéristiques de chacune de ces classes chimiques, tels que le méthanol, l'éthanol, le propan-1-ol et l'isopropanol pour paramétrer la chaîne latérale de la sérine et de la thréonine. La fonction d'énergie potentielle doit également être paramétrée pour reproduire au plus juste les propriétés de la liaison peptidique, comme sa planéité et sa forte propension à contracter des liaisons hydrogène.

Par ailleurs, le développement de paramètres suppose que l'on ait déjà créé la topologie de chaque acide aminé, *i.e.* identifié les différents types d'atomes dans chaque acide aminé ainsi que leur connectivité. La topologie est étroitement liée au nombre de paramètres à développer. Par exemple, si on prend les hydrogènes, combien de types d'hydrogène sont nécessaires pour correctement décrire l'ensemble des acides aminés? Les H du C_β et des C_γ de la valine peuvent-ils être jugés chimiquement équivalents entre eux? Un H est-il similaire selon qu'il est dans un méthylène d'une chaîne alkyle, dans un cycle aryle de phénylalanine, dans un cycle phénol de tyrosine, dans un indol de tryptophane ou dans un méthylthio de méthionine? Ces questions sont cruciales pour la transférabilité du champ de forces.

Si l'on développe de nouveaux paramètres à partir d'un jeu de paramètres préexistants, il s'agit alors d'identifier quels nouveaux types d'atomes doivent être créés.

- **Données cibles**

L'optimisation des paramètres s'effectue en confrontant les propriétés simulées des composés modèles avec les données expérimentales disponibles. Il est évident que le choix des composés modèles est ici fondamental. Il est préférable de disposer d'un maximum de données cibles afin d'optimiser les paramètres avec le plus de précision. Ces données sont de plusieurs types : thermodynamiques (ΔG et ΔH de solvation, énergies d'interaction intermoléculaire, *etc*), structurales (propriétés conformationnelles, géométrie des molécules, paramètres du réseau cristalin, *etc*), et spectroscopiques (spectres vibrationnels).

En outre, la multiplicité de sources pour les propriétés cibles (mécanique quantique, calorimétrie, cristallographie, spectroscopies IR, Raman, microondes et RMN, diffraction de neutrons, *etc*) garantit que l'on minimise les limitations et les erreurs intrinsèques à chacune des techniques utilisées. Cependant, la mécanique quantique (MQ) fournit des informations caractéristiques d'une molécule en phase gazeuse. C'est un point extrêmement important dans la philosophie de développement d'un champ de forces comme CHARMM27 et de son applicabilité car il faut *in fine* reproduire des valeurs propres à une phase condensée.

On peut également utiliser des données statistiques sur la géométrie des molécules en phase condensée grâce à des bases de données comme la *Cambridge Crystal Database* (CSD) [Allen *et al.*, 1979], qui recense de nombreuses structures cristallines. Les informations fournies en criblant la CSD sont moyennées et permettent de s'affranchir des interactions interatomiques et intermoléculaires propres à chaque cristal.

L'optimisation des termes non liés doit veiller à reproduire au mieux les interactions solvant-solvant (eau-eau), solvant-soluté (eau-protéine) et soluté-soluté (interactions intramoléculaires) pour que les paramètres finaux traduisent l'équilibre naturel du partitionnement de chaque partie de la protéine. Par exemple, si les interactions de la chaîne latérale de la glutamine avec l'eau sont surestimées, la glutamine tendra à s'exposer démesurément au solvant. Le choix du type de modèle de solvant présent dans les données cibles se pose également.

- **Optimisation des paramètres**

Elle se déroule de manière itérative de telle sorte que le jeu final de paramètres soit cohérent et reproduise au mieux toutes les données cibles, sans qu'un des termes liés ou non liés ne soit surestimé au détriment des autres.

La paramétrisation débute par les termes non liés car ils ont le plus d'influence sur les géométries et les surfaces d'énergie conformationnelle empiriques finales, bien que les termes liés et non liés soient finalement fortement corrélés.

Avec ce genre d'approche, il est nécessaire de disposer de critères de convergence afin de juger de la justesse des paramètres optimisés et de passer à l'étape suivante. Pour cela, en fonction de la nature des paramètres développés, on définit une déviation maximale autorisée entre les valeurs cibles et simulées.

• Test des paramètres optimisés

Cette dernière étape valide la transférabilité du champ de forces car on teste les nouveaux paramètres sur des molécules différentes des composés modèles. On utilise des oligopeptides cycliques et linéaires pour lesquels des structures sont disponibles (souvent à l'état cristallisé), et des protéines dont les structures ont été résolues par cristallographie de rayons X ou par RMN, généralement la crambine, le lysozyme, la myoglobine et l'inhibiteur de la trypsine du pancréas de bœuf (BPTI, *bovine pancreatic trypsin inhibitor*). Les propriétés structurales et dynamiques produites par les simulations (RMSD des positions des atomes lourds, rayon de gyration *etc*) sont comparées aux données expérimentales (RMN, diffraction de rayons X, neutrons *etc*).

5.1.4 Nouveaux paramètres pour l'interaction cystéine–métal

L'étude de l'interaction des protéines avec des métaux par la simulation de dynamique moléculaire nécessite le développement de paramètres pour ces métaux dans le champ de forces utilisé. Les protéines de la famille d'Atx1 complexant le cuivre(I) et le mercure(II) grâce à leurs résidus cystéines situés dans le motif consensus MXCXXC, des paramètres reproduisant l'interaction de deux ligands cystéinates avec un ion $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ou $\text{Hg}^{(\text{II})}$ ont été développés au laboratoire pour être implémentés dans CHARMM [Fuchs *et al.*, 2005].

5.1.4.1 Choix des composés modèles

Les chaînes latérales des cystéines liées au mercure et au cuivre ont été mimées par des méthylthiolates CH_3S^- . Les complexes modèles sont alors le diméthylthiolatocuprate(I) $[\text{Cu}(\text{SCH}_3)_2]^-$ et le diméthylthiolatomercure(II) $\text{Hg}(\text{SCH}_3)_2$. La formule générale de ces complexes $\text{M}(\text{SCH}_3)_2$ ($\text{M}=\text{Cu},\text{Hg}$) est illustrée sur la figure 5.3.

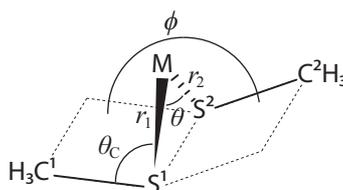


FIG. 5.3 – Composés modèles utilisés pour le développement de paramètres pour l'interaction $\text{M}\cdot\text{Cys}_2$ ($\text{M}=\text{Cu}^{(\text{I})},\text{Hg}^{(\text{II})}$).

Une chose importante à noter est la géométrie du métal que ces deux composés modèles impliquent : dans les deux complexes, l'ion métallique est dans une géométrie digonale. Par conséquent, les paramètres développés pour le cas de cystéinates liant le cuivre(I) ou le mercure(II) ne sont optimisés que lorsque deux cystéines viennent interagir avec l'un des deux ions *via* leur groupement thiolate (et non thiol).

5.1.4.2 Calcul des charges atomiques partielles

Le potentiel électrostatique créé par l'ensemble des atomes du complexe a été calculé pour des points situés sur 10 sphères concentriques, centrées sur chaque atome à

des distances variant entre 2.45 Å et 6.95 Å du centre. Cette approche présente l'avantage de s'éloigner du noyau des atomes et donc de pouvoir reproduire précisément l'effet des charges atomiques à longue distance. Si le potentiel est évalué trop près du centre des atomes, alors on s'expose à des problèmes tels qu'une trop forte densité électronique près des paires d'électrons libres, qui biaisent la mesure du potentiel.

La géométrie des deux complexes qui est utilisée est celle à l'équilibre (complexes linéaires). Elle a été calculée par MQ grâce au programme GAUSSIAN.

La détermination des charges atomiques partielles de ces fragments dans les protéines, a suivi ensuite trois règles :

- (i) les atomes de type chimique équivalent portent la même charge,
- (ii) les charges des atomes de carbone sont fixées à la même valeur que celle des C_β des cystéines dans CHARMM, à savoir $q_{C_\beta} = 0.11$,
- (iii) l'ensemble final de charges correspond à un minimum local de la fonction d'évaluation \mathcal{F}_Q de la qualité de l'ajustement de moins de 1 kcal.mol⁻¹. Cette fonction est l'écart-type entre les potentiels calculés *ab initio* et par mécanique moléculaire.

Une fois qu'un jeu de charges respectant la condition (i) a été calculé, l'ajustement des charges a consisté à satisfaire les points (ii) et (iii) en faisant varier la charge du métal et des soufres sur une grille bidimensionnelle. La charge des atomes H_β est contrainte de telle sorte que la somme des charges partielles soit égale à la charge globale du complexe M•Cys₂, à savoir -1 pour Cu^(I)•Cys₂ et 0 pour Hg^(II)•Cys₂.

Au final, les charges dans le tableau 5.2 ont été trouvées avec des minima inférieurs à 0.6 kcal.mol⁻¹ pour les fonctions d'évaluation \mathcal{F}_Q .

Complexes	Charges partielles				\mathcal{F}_Q [kcal.mol ⁻¹]
	M	S	C	H	
Cu(SCH ₃) ₂	0.15	-0.60	-0.11	0.045	0.413
Hg(SCH ₃) ₂	0.31	-0.27	-0.11	0.075	0.549

TAB. 5.2 – Charges atomiques partielles calculés pour les complexes modèles diméthylthiolato-Mⁿ⁺.

La variation de la fonction d'évaluation \mathcal{F}_Q en fonction des charges q_{Cu} et q_S du cuivre et des soufres de Cu(SCH₃)₂ est montrée sur le graphique 5.4. On y voit distinctement le minimum de \mathcal{F}_Q à moins de 0.42 kcal.mol⁻¹ pour le couple de charges $q_{Cu} = 0.15$ et $q_S = -0.60$.

5.1.4.3 Calcul des paramètres de van der Waals des métaux

Un profil d'énergie d'interaction entre chaque complexe M(SCH₃)₂ et une molécule d'eau du type TIP3P a été calculé *ab initio*. On en déduit les paramètres suivants pour CHARMM : $R_{vdW} = 1.40$ Å et $\varepsilon = 0.19$ kcal.mol⁻¹ pour Cu^(I), et $R_{vdW} = 1.60$ Å et $\varepsilon = 1.0$ kcal.mol⁻¹ pour Hg^(II). Ces valeurs permettent de reproduire correctement l'énergie totale d'interaction *ab initio*, ainsi que l'énergie de van der Waals (obtenue

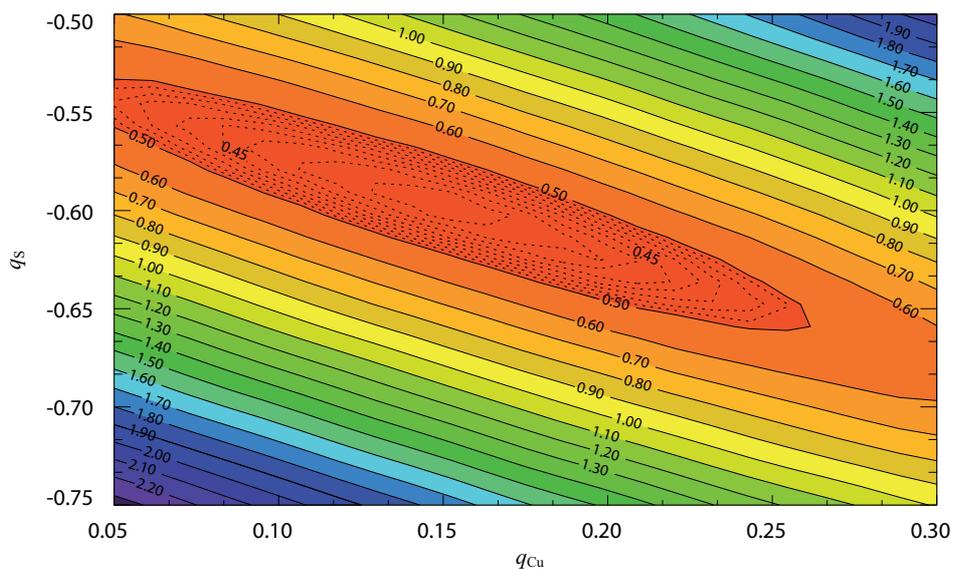


FIG. 5.4 – Carte des valeurs de la fonction d'évaluation \mathcal{F}_Q lorsque les charges des sulfures (q_S) et du cuivre (q_{Cu}) du complexe $Cu(SCH_3)_2$ varient.

par soustraction de la contribution électrostatique), comme le montre la figure 5.5 pour le cas du $Hg^{(II)}$ dans $Hg(SCH_3)_2$.

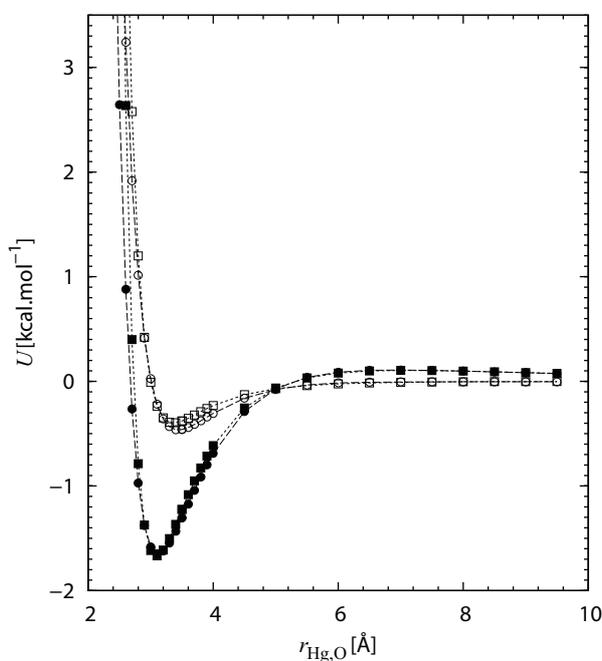


FIG. 5.5 – Profils des énergies totales et de van der Waals calculés *ab initio* et avec CHARMM pour l'interaction $Hg(SCH_3)_2-H_2O$ en fonction de la distance $Hg^{(II)}-O$. Énergie totale calculée *ab initio* (\bullet) ou avec CHARMM (\blacksquare); énergie de van der Waals calculée *ab initio* (\circ) ou avec CHARMM (\square).

5.1.4.4 Ajustement des termes liés

Les termes internes pour les liaisons C–H et C–S, et pour les angles (H,C,S) n’ont pas été modifiés et ont été repris directement du champ de forces CHARMM27.

Ainsi, ont été ajustés :

- les termes de la liaison M–S et de l’angle (S^1, M, S^2) (Fig. 5.3) ; leur ajustement a été réalisé simultanément à partir d’une surface d’énergie potentielle calculée *ab initio* et correspondant à diverses valeurs de r_1 , r_2 et θ .
- l’angle θ_C à partir des variations de l’énergie potentielle *ab initio* en fonction de θ_C . La fonction utilisée pour l’ajustement est du type :

$$U(\theta_C) = u_{\theta_C} + k_{\theta_C}(\theta_C - \theta_{C_0})^2 \quad (5.5)$$

où u_{θ_C} est une constante d’ajustement.

- l’angle dièdre ϕ entre les atomes C^1 , S^1 , S^2 et C^2 , à partir des variations de l’énergie potentielle *ab initio* en fonction de ϕ . La fonction d’ajustement s’exprime comme :

$$U(\phi) = u_\phi + k_\phi^1 (1.0 + \cos(\phi - \phi_0^1)) + k_\phi^2 (1.0 + \cos(2\phi - \phi_0^2)) \quad (5.6)$$

avec u_ϕ une constante d’ajustement.

La variation de l’angle S^1 –M– S^2 est représentée par un terme harmonique classique :

$$U(\theta) = u_\theta + k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (5.7)$$

Le terme des distances S–M peut être ajusté de deux façons. On peut utiliser un terme harmonique tel que :

$$U_h(r_1, r_2) = u_r^h + k_r^h(r_1 - r_0)^2 + k_r^h(r_2 - r_0)^2 \quad (5.8)$$

de manière à assurer une compatibilité avec les paramètres préexistants dans le champ de force de CHARMM. Néanmoins, ce potentiel harmonique ne permet pas un ajustement optimal des valeurs de la surface d’énergie potentielle $U(r_1, r_2, \theta)$. Un potentiel anharmonique assure une meilleure reproduction des variations de la distance S–M lorsque l’on s’éloigne de la distance d’équilibre r_0 :

$$U_a(r_1, r_2) = u_r^{\text{corr}} + k_r^{\text{corr}}(r_1 - r_0)^2 + k_r^{\text{corr}}(r_2 - r_0)^2 + k_r^a(r_1 - r_0)^3 + k_r^a(r_2 - r_0)^3 \quad (5.9)$$

$U_a(r_1, r_2)$ implique un terme correctif harmonique du potentiel de l’équation 5.8. La figure 5.6 montre que le potentiel U_a permet un meilleur ajustement avec les valeurs calculées *ab initio*, notamment pour des distances r_1 (r_2) inférieures à r_0 où l’intérêt de l’ajout d’un terme en r^3 apparaît clairement pour obtenir un meilleur accord avec les données *ab initio*. Les distances d’équilibre r_0 entre le métal et les soufres sont respectivement de 2.14 Å et 2.32 Å pour $\text{Cu}^{(I)}$ et $\text{Hg}^{(II)}$. Les valeurs de θ_0 trouvées pour les angles S^1 – $\text{Cu}^{(I)}$ – S^2 et S^1 – $\text{Hg}^{(II)}$ – S^2 sont très proches de 180° , ce qui est normal car ce sont des complexes modèles $M(\text{SCH}_3)_2$ linéaires.

Les constantes de force k_θ et k_r sont plus faibles que celles fréquemment rencontrées pour les protéines, ce qui signifie que les liaisons de coordination soufre–métal ont un caractère partiellement covalent.

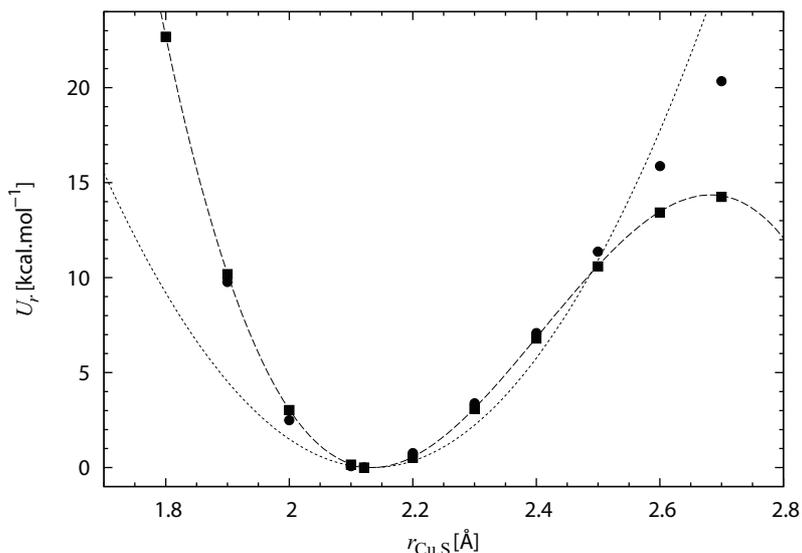


FIG. 5.6 – Profils des énergies de liaison Cu-S calculés *ab initio* (●) et avec CHARMM (■). Les courbes représentent le potentiel ajusté avec un terme harmonique uniquement (U_h) (.....) ou avec un potentiel en $r^2 + r^3$ (U_a) (---).

L'ensemble des paramètres servant à décrire les termes liés des complexes $M \cdot \text{Cys}_2$ ($M = \text{Cu}^{(\text{I})}, \text{Hg}^{(\text{II})}$) est reporté dans le tableau 5.3. Le développement et les tests de ces paramètres sont détaillés dans l'article de Fuchs *et al.* [Fuchs *et al.*, 2005].

5.2 La dynamique moléculaire

L'image réelle d'un système moléculaire est loin d'être l'image statique suggérée par la mécanique moléculaire. Les atomes et les groupes d'atomes sont en perpétuel mouvement. Ces mouvements peuvent être concertés et essentiels à la fonction des molécules biologiques. La mécanique moléculaire permet d'obtenir des informations à partir d'une géométrie unique de la molécule. A l'inverse, la dynamique moléculaire produit une succession de conformations qui décrit l'évolution au cours du temps de la position des atomes (leur trajectoire). Les variations des positions atomiques résultent des diverses forces auxquelles les atomes sont soumis au cours du temps. La mécanique et la dynamique moléculaires partagent la même fonction d'énergie potentielle U_p pour décrire l'ensemble des interactions interatomiques du système d'étude.

5.2.1 Dynamique newtonienne

On considère chaque atome comme une masse ponctuelle. Les atomes ne peuvent pas se déplacer librement au cours du temps du fait des diverses forces auxquelles ils sont soumis. Dès lors, pour un intervalle de temps suffisamment court où les forces ne varient pas, on peut exprimer le mouvement des atomes grâce à l'équation fonda-

<i>Liaisons S–M</i>		
Définition (types atomiques)	Constantes de force (k_r) [kcal.mol ⁻¹ .Å ⁻²]	Valeurs à l'équilibre (r_0) [Å]
SCU CU	82.0	2.135
SHG HG	97.0	2.319

<i>Angles de valence</i>		
Définition (types atomiques)	Constantes de force (k_θ) [kcal.mol ⁻¹ .rad ⁻²]	Valeurs à l'équilibre (θ_0) [°]
SCU CT2 CT1	58.0	112.5
SCU CT2 HA	46.1	111.3
CT2 SCU CU	32.8	105.9
SCU CU SCU	18.0	182.0
SHG CT2 CT1	58.0	112.5
SHG CT2 HA	46.1	111.3
CT2 SHG HG	47.1	102.9
SHG HG SHG	26.0	178.5

<i>Angles dièdres</i>			
Définition (types atomiques)	Constantes de force (k_ϕ) [kcal.mol ⁻¹]	Périodicité (n)	Phase (ϕ_0) [°]
CT2 SCU SCU CT2	0.36	1	83.6
CT2 SCU SCU CT2	0.52	2	2.9
HA CT2 SCU CU	0.20	3	0.0
CT1 CT2 SCU CU	0.24	1	0.0
CT1 CT2 SCU CU	0.15	2	0.0
CT1 CT2 SCU CU	0.27	3	0.0
CT2 SHG SHG CT2	-0.089	1	-62.9
CT2 SHG SHG CT2	0.450	2	-0.5
HA CT2 SHG HG	0.20	3	0.0
CT1 CT2 SHG HG	0.24	1	0.0
CT1 CT2 SHG HG	0.15	2	0.0
CT1 CT2 SHG HG	0.27	3	0.0

TAB. 5.3 – Paramètres des termes liés des complexes M[•] Cys₂ (M=Cu^(I),Hg^(II)); d'après [Fuchs *et al.*, 2005]. Les types d'atomes sont : CT2 pour les groupements –CH₂–, CT1 pour –CH–, HA pour les protons liés à un C aliphatique, SCU et SHG pour les S_γ des cystéines liés respectivement au Cu^(I) (CU) et au Hg^(II) (HG).

mentale de la dynamique (Seconde loi de Newton) :

$$\sum_j \mathbf{F}_{ij} = m_i \mathbf{a}_i \quad (5.10)$$

où \mathbf{F}_{ij} sont les forces exercées par les atomes j sur l'atome i de masse m_i et d'accélération \mathbf{a}_i au temps t . \mathbf{F}_{ij} et \mathbf{a}_i peuvent être facilement évaluées à partir des coordonnées atomiques :

$$\mathbf{a}_i(t) = \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} \quad (5.11)$$

$$\mathbf{F}_{ij}(t) = -\nabla_{\mathbf{r}} U_p(\mathbf{r}_i, t) \quad (5.12)$$

avec $\mathbf{r}_i(t)$ la position instantanée de l'atome i . Connaissant l'accélération, on peut calculer la vitesse d'un atome à l'étape suivante, au temps $t + \Delta t$. A partir des positions, vitesses et accélérations atomiques à tout moment au cours du temps, on détermine les positions, vitesses et accélérations à l'étape suivante. Ainsi l'intégration selon des pas infinitésimaux conduit à la trajectoire du système. Celle-ci s'accompagne d'une variation de son énergie potentielle au cours du temps.

5.2.2 Dynamique de Langevin

L'équation de Langevin permet de coupler le mouvement des atomes à un bain thermostatique par l'inclusion de termes stochastiques dans l'équation de Newton de la dynamique classique (déterministe) :

$$m_i \dot{\mathbf{v}}_i = -\nabla_{\mathbf{r}} U_p(\mathbf{r}_i, t) - m_i \gamma_i \mathbf{v}_i(t) + \mathcal{R}_i(t) \quad (5.13)$$

avec γ_i un terme de friction, dissipatif, qui s'oppose au mouvement de l'atome i et $\dot{\mathbf{v}}_i = \mathbf{a}_i = d\mathbf{v}_i/dt$. γ_i est une fréquence de collisions qui peut être reliée au coefficient de friction ξ_i de l'atome i tel que

$$\gamma_i = \frac{\xi_i}{m_i} \quad (5.14)$$

$\mathcal{R}_i(t)$ est une force aléatoire due aux collisions associées aux mouvement browniens des particules environnantes (comme les molécules de solvant) qui vérifie la relation

$$\langle \mathcal{R}_i(t) \rangle = 0 \quad (5.15)$$

En outre, $\mathcal{R}_i(t)$ est décorrélée dans le temps, *i.e.* que $\mathcal{R}_i(t_1)$ et $\mathcal{R}_i(t_2)$ sont des variables aléatoires indépendantes. La corrélation entre $\mathcal{R}_i(t_1)$ et $\mathcal{R}_i(t_2)$ est nulle si $t_1 \neq t_2$.

Historiquement, la dynamique de Langevin a été utilisée comme une alternative à la dynamique moléculaire en solvation explicite pleine. On sépare le système simulé en deux régions : une première sphère, interne (de rayon r_L), où les atomes sont propagés par la dynamique moléculaire classique en solvation explicite, et une seconde externe ($r > r_L$), en solvation implicite, où on utilise la dynamique de

Langevin pour modéliser les mouvements du soluté. L'effet des molécules de solvant sur le mouvement des atomes de soluté est pris en compte par les forces de frictions $\mathbf{f}_i = m_i \gamma_i \mathbf{v}_i(t)$ et par la force stochastique $\mathcal{R}_i(t)$.

On utilise aussi la dynamique de Langevin en solvation explicite ($r_L = 0$) pour contrôler la température du système (cf. §5.3.6).

5.3 Techniques numériques de dynamique moléculaire

5.3.1 Intégration du temps

La dynamique moléculaire repose sur l'algorithme d'intégration du temps, autrement nommé propagateur, qui nécessite d'intégrer l'équation du mouvement de tous les atomes pour suivre la trajectoire.

Le principe de base consiste à déterminer les vitesses et les positions atomiques à l'instant $t + \Delta t$ connaissant celles à l'instant t . Le choix du pas de temps Δt est primordial car de sa durée dépend le temps total de simulation (le temps de simulation est donné par $\Delta t N_t$, N_t le nombre de pas de simulation).

Nous avons utilisé l'algorithme du *leapfrog* (algorithme saute-mouton) apparenté à celui de Verlet, tous deux basés sur des méthodes de différences finies où le temps est discrétisé.

Algorithme de Verlet Il repose sur le triplet $\{\mathbf{r}_i(t), \mathbf{r}_i(t - \Delta t), \mathbf{a}_i(t)\}$ [Verlet, 1967]. En faisant un développement de Taylor à l'ordre 3 des positions $\mathbf{r}_i(t)$, on a

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t)\Delta t + \frac{1}{2} \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} (\Delta t)^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3 \mathbf{r}}{dt^3} (\Delta t)^3 + \mathcal{O}(\Delta t)^4 \quad (5.16)$$

et de manière similaire,

$$\mathbf{r}_i(t - \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \mathbf{v}_i(t)\Delta t + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{2m_i} (\Delta t)^2 - \frac{1}{6} \frac{d^3 \mathbf{r}}{dt^3} (\Delta t)^3 + \mathcal{O}(\Delta t)^4 \quad (5.17)$$

En sommant ces 2 équations, on obtient l'expression de propagation des positions :

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) + \mathbf{r}_i(t - \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} (\Delta t)^2 + \mathcal{O}(\Delta t)^4 \quad (5.18)$$

Le calcul des nouvelles positions est donc effectué avec une précision de l'ordre de $(\Delta t)^4$. Les vitesses sont quant à elles déterminées ainsi :

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} + \mathcal{O}(\Delta t)^2 \quad (5.19)$$

Cette méthode de calcul des vitesses introduit des approximations dommageables à l'évaluation de l'énergie cinétique.

Il est important de noter que l'algorithme de Verlet est réversible dans le temps. Il est dit symétrique. En effet en changeant $\Delta t \rightarrow -\Delta t$, l'Eq. 5.18 demeure inchangée. La conséquence de cette propriété est que, si à un instant t de la simulation on inverse le temps, la trajectoire revient sur ses pas. Les erreurs d'arrondis de la simulation font que le processus n'est pas totalement réversible.

Algorithme du leapfrog Les vitesses sont calculées pour des intervalles de temps semi-entiers et les positions sont obtenues pour les intervalles de temps entiers. Cet algorithme utilise le triplet $\{\mathbf{r}_i(t), \mathbf{v}_i(t - \Delta t/2), \mathbf{a}_i(t)\}$ [Hockney *et al.*, 1974]. Si on définit les vitesses pour les temps $t + \frac{\Delta t}{2}$ et $t - \frac{\Delta t}{2}$:

$$\mathbf{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t)}{\Delta t} \quad (5.20)$$

$$\mathbf{v}_i \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right) = \frac{\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)}{\Delta t} \quad (5.21)$$

on obtient alors immédiatement

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) \Delta t \quad (5.22)$$

$$\mathbf{r}_i(t - \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \mathbf{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) \Delta t \quad (5.23)$$

En combinant ces deux équations à l'Eq. 5.18, on déduit

$$\mathbf{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) = \mathbf{v}_i \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \Delta t + \mathcal{O}(\Delta t)^3 \quad (5.24)$$

Puisqu'il est aussi basé sur l'Eq. 5.18, l'algorithme du *leapfrog* est identique à celui de Verlet quant au calcul des trajectoires. Les vitesses aux temps demi-entiers n'apparaissent que comme des intermédiaires de calcul. En revanche, les deux algorithmes diffèrent pour évaluer des grandeurs thermodynamiques. Ainsi, tandis que la moyenne de l'énergie potentielle peut être calculée aux temps entiers (grâce aux $\mathbf{r}_i(t)$), celle de l'énergie cinétique l'est aux temps demi-entiers (en faisant intervenir les vitesses) (Fig. 5.7).

En pratique, les valeurs calculées et gardées en mémoire sont, pour tous les atomes du système, les positions $\mathbf{r}_i(t)$ et accélérations $\mathbf{a}_i(t)$ instantanées et les vitesses au demi-temps d'intégration précédent $\mathbf{v}_i \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right)$. L'équation des vitesses est d'abord incrémentée de Δt pour obtenir $\mathbf{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right)$. Ensuite, on évalue les vitesses instantanées des atomes :

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{1}{2} \left[\mathbf{v}_i \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right) + \mathbf{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) \right] \quad (5.25)$$

5.3.2 Conditions initiales

Pour initier la simulation d'un système, l'algorithme d'intégration nécessite les coordonnées (x, y, z) et les vitesses (v_x, v_y, v_z) de tous les atomes au temps $t = t_0$.

Les positions atomiques initiales $\{\mathbf{r}_i(t = t_0)\}$ sont généralement issues de l'expérience (à partir d'une structure RMN ou de cristallographie de rayons X).

La seule information concernant les vitesses initiales est la température T de la simulation. Si on ne dispose pas de vitesses initiales, on attribue aléatoirement les vitesses

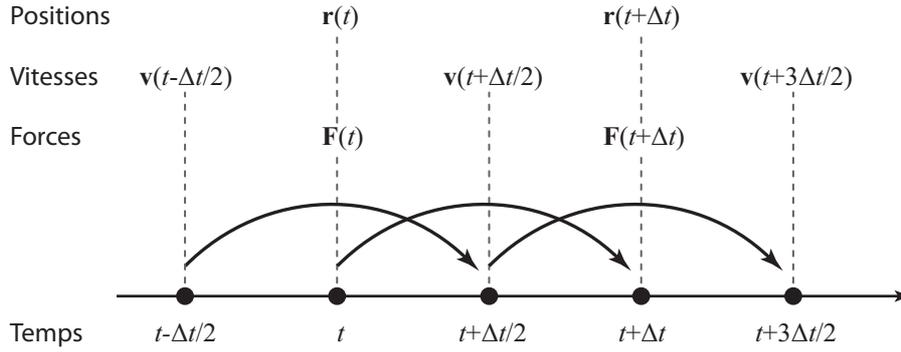


FIG. 5.7 – Schéma de principe de l'algorithme du *leapfrog*.

$\{\mathbf{v}_i(t = t_0)\}$ à tous les atomes du système selon une distribution de Maxwell-Boltzmann centrée sur la température T qui permet le calcul des densités de probabilité $f(\mathbf{v}_i)$:

$$f(\mathbf{v}_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}\right) \quad (5.26)$$

et pour chaque composante des \mathbf{v}_i :

$$f(\mathbf{v}_{ix}) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} \exp\left(-\frac{m_i v_{ix}^2}{2k_B T}\right) \quad (5.27)$$

La distribution initiale des vitesses n'est pas équilibrée. Une période d'équilibration du système est nécessaire afin de stabiliser la simulation et d'éviter des zones «chaudes» ou «froides» dans le système.

5.3.3 Durée du pas de temps

Les équations du mouvement sont résolues numériquement et propagées grâce à des algorithmes relativement rapides à mettre en œuvre. Néanmoins, ils imposent une restriction sévère sur la longueur du pas d'intégration.

Un pas de temps Δt trop grand introduit des erreurs significatives dans l'évaluation de l'énergie et peut faire diverger la simulation. Il faut tenir compte des fréquences de vibrations les plus rapides de telle sorte que Δt soit 10 à 20 fois plus petit que la période de l'oscillation la plus rapide. En pratique, dans les molécules organiques, les liaisons qui vibrent le plus rapidement sont les liaisons C–H (avec une période de vibration de l'ordre de 10 fs). La valeur maximale de Δt doit être approximativement le dixième de cette période, soit 1 fs.

L'algorithme SHAKE [Ryckaert *et al.*, 1977] permet de geler certains mouvements à haute fréquence et ainsi d'augmenter le pas d'intégration jusqu'à 2 fs. On peut donc générer des simulations plus longues sans avoir à accroître le temps de calcul.

5.3.4 Conditions aux limites

Lorsque l'on simule un système en solvataion explicite dans une boîte, l'environnement des atomes périphériques est biaisé du fait des effets de bord comparé aux

atomes situés au centre de la boîte. Pour s'en affranchir, il faut s'assurer que l'environnement des atomes devienne indépendant de leur position. On recourt ainsi aux conditions périodiques aux limites qui consistent à répliquer un ensemble fini et relativement restreint de particules dans une boîte centrale dans les trois directions de l'espace (Fig. 5.8), de telle sorte que les forces agissant sur les particules soient équivalentes à celles d'un système beaucoup plus grand et donc plus réaliste.

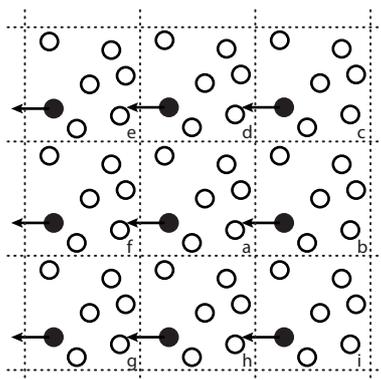


FIG. 5.8 – Représentation bidimensionnelle des conditions aux limites périodiques d'une boîte de simulation répliquée dans les trois dimensions de l'espace. En utilisant les conditions de limites périodiques, lorsqu'une molécule quitte la boîte centrale a, ses images dans les cellules fantômes voisines se déplacent de manière analogue.

Les mouvements des atomes dans la boîte centrale sont copiés dans toutes les boîtes images. Par conséquent, si une particule quitte la boîte centrale au cours de la simulation, elle est remplacée par une particule image d'une boîte adjacente du côté opposé. Le nombre d'atomes dans la boîte centrale reste donc constant. Les calculs d'énergie sont effectués sur les molécules de la boîte centrale. Les interactions non liées des molécules de solvant proches des parois de la boîte centrale sont calculées à l'aide des molécules virtuelles de solvant des boîtes contiguës. Avec la méthode des conditions aux limites périodiques, on ne peut toutefois pas étudier des fluctuations d'amplitudes plus grande que les dimensions de la boîte, à moins d'en augmenter la taille. Dans ce cas, le nombre d'atomes dans le système augmente, accroissant d'autant le nombre d'interactions à calculer.

5.3.5 Traitement des interactions à longue distance

La simulation d'un système nécessite que son énergie potentielle soit calculée à chaque instant. Or, une grande partie du temps de calcul est dédié à l'évaluation des interactions entre atomes non liés dont le nombre varie en N^2 (car ce sont des potentiels de paire). En outre, au-delà d'une certaine distance entre deux atomes, l'effet des interactions de van der Waals devient négligeable car le potentiel de Lennard-Jones devient vite très faible au fur et à mesure que la distance interatomique croît (il varie en r^{-6}).

Pour réduire le nombre d'interactions non liées à calculer, qui décroissent très lentement, plusieurs méthodes ont été développées : convention de l'image minimale et

introduction de rayons de coupure. Pour les interactions électrostatiques, des méthodes spécifiques ont été développées.

5.3.5.1 Convention de l'image minimale

Dans cette approximation, on suppose que chaque atome i de la boîte centrale interagit avec l'image la plus proche de tous les autres atomes j , comme indiqué sur la figure 5.9. Les interactions avec les atomes les plus lointains sont alors négligées. Pour les interactions électrostatiques cela introduit des imprécisions et d'autres méthodes doivent être utilisées.

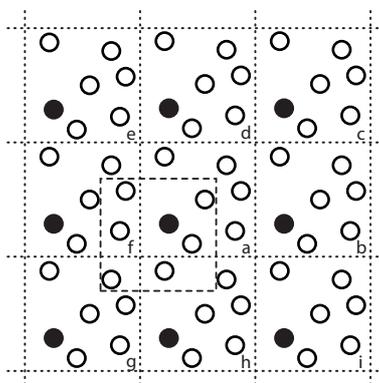


FIG. 5.9 – Représentation de la convention d'image minimale. La boîte délimitée par des tirets à cheval sur les cellules a, f, g et h symbolise la convention d'image minimale pour la particule noire de la cellule centrale a.

5.3.5.2 Troncature sphérique

Pour chaque atome i , on définit une distance, ou *cutoff*, au-delà de laquelle les interactions avec les atomes j ne sont plus calculées. Cette approximation est d'autant plus valable que la portée des interactions est faible. La convention de l'image minimale implique que le rayon de troncature R_c soit plus court que la moitié de la dimension du plus petit côté de la boîte.

Toutefois, l'utilisation d'un *cutoff* ne réduit pas autant qu'on pourrait le croire la durée de calcul des interactions non liées, puisqu'il faut en premier lieu établir une liste de toutes les distances interatomiques. On définit deux sphères, une première de rayon R_c , et une seconde de rayon $R_{\text{paire}} > R_c$ pour dresser la liste de tous les voisins de i . Cette liste des paires $\{i, j\}$ est mise à jour périodiquement pour tenir compte du mouvement des atomes les uns par rapport aux autres.

On utilise généralement deux distances de coupure différentes pour les interactions non liées, car la portée des interactions de van der Waals est plus faible que celle des interactions électrostatiques.

Fonctions *shift* et *switch* L'introduction d'un *cutoff* ne permet pas de conserver l'énergie du fait de la brusque coupure qu'il crée dans les interactions. On en atténue l'effet grâce à des fonctions de lissage utilisées comme facteurs multiplicatifs des termes non liés [Steinbach et Brooks, 1994]. L'application des fonctions *shift* et *switch* pour tronquer les interactions de van der Waals est représentée sur la Fig. 5.10.

La fonction *shift* agit sur l'ensemble de la surface d'énergie potentielle sous la forme :

$$\mathcal{S}_{shift}(r_{ij}, R_c) = \begin{cases} \left(1 - \left(\frac{r_{ij}}{R_c}\right)^2\right)^2 & \text{si } r_{ij} < R_c \\ 0 & \text{si } r_{ij} \geq R_c \end{cases} \quad (5.28)$$

L'inconvénient de cette méthode est que l'on modifie l'ensemble du potentiel pour le faire tendre vers 0 à $r_{ij} = R_c$.

La fonction *switch* modifie quant à elle le potentiel d'interaction au voisinage de R_c uniquement, à partir de la distance $R_{on} < R_c$:

$$\mathcal{S}_{switch}(r_{ij}, R_{on}, R_c) = \begin{cases} 1 & \text{si } r_{ij} < R_{on} \\ \frac{(R_c^2 - r_{ij}^2)(R_c^2 + 2r_{ij}^2 - 3R_{on}^2)}{(R_c^2 - R_{on}^2)^3} & \text{si } R_{on} \leq r_{ij} < R_c \\ 0 & \text{si } r_{ij} \geq R_c \end{cases} \quad (5.29)$$

5.3.5.3 Calculs des forces électrostatiques

Pour des potentiels à courte portée (décroissance plus rapide que $1/r^3$), l'interaction entre deux atomes i et j peut être correctement approchée comme l'interaction entre i et l'image de j la plus proche selon la convention de l'image minimale. C'est le cas pour des potentiels 6-12 de Lennard-Jones (en $1/r_{ij}^6$) des interactions de van der Waals. En revanche, cette approximation se révèle insuffisante dans le cas de potentiels à longue portée car l'énergie d'interaction entre i et j décroît trop lentement pour pouvoir se limiter à la première image (par exemple, sur la Fig 5.2, l'interaction coulombienne $\text{H}_c^{\text{Lys}}-\text{O}_{e2}^{\text{Glu}}$ n'est pas encore totalement négligeable quand les deux atomes sont distants de 50 Å). Cela rend de fait critique l'utilisation du rayon de coupure.

En outre, dans un système périodique, il existe un nombre infini de boîtes images de la boîte centrale. Si on considère un système de N particules chargées tel que la charge totale du système soit nulle, $\sum_i q_i = 0$, dans une boîte cubique de longueur L avec conditions aux limites périodiques, alors à une particule i située à \mathbf{r}_i dans la boîte centrale correspond une infinité d'images dans les copies de cette boîte et de coordonnées $\mathbf{r}_i + \mathbf{n}L$, où \mathbf{n} est un vecteur de composantes entières. L'énergie électrostatique totale du système s'exprime ainsi :

$$U_{\text{el}} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \sum_{|\mathbf{n}|=0}^{\infty} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{|\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i + \mathbf{n}L|} \quad (5.30)$$

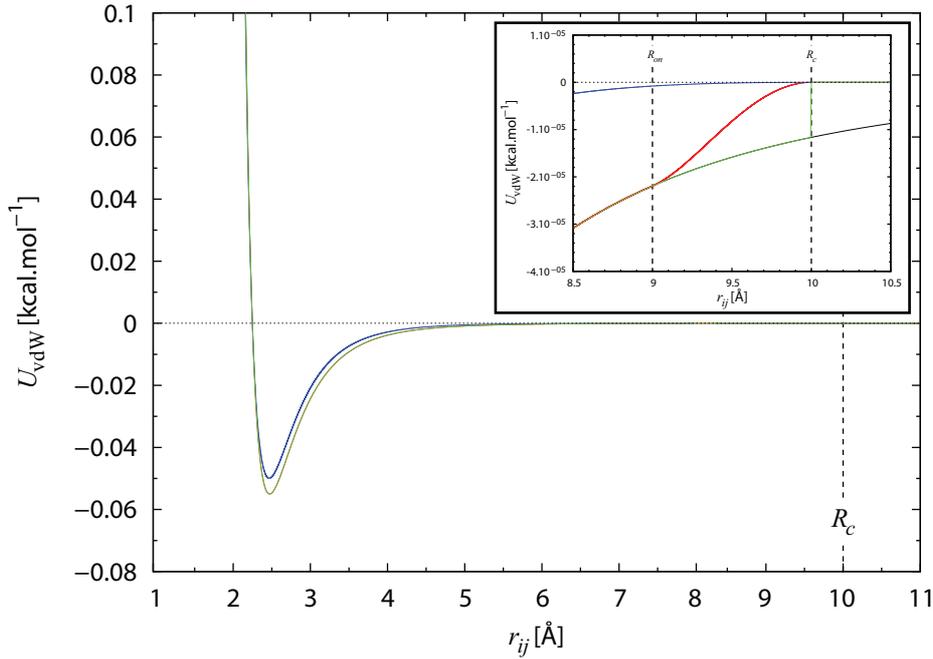


FIG. 5.10 – Fonctions de troncature sphérique appliquées à l’interaction de van der Waals entre deux atomes C sp^3 de méthylène aliphatique (détails des paramètres à la Fig. 5.2). Les interactions sont tronquées à partir de $R_c = 10$ Å. (—) Interaction de van der Waals non tronquée. (—) Troncature sphérique non lissée, la fonction de Lennard-Jones est identique à la fonction non tronquée quand $r_{ij} < R_c$. (—) Troncature sphérique lissée avec une fonction *shift*, l’ensemble de la fonction de Lennard-Jones est modifiée pour s’annuler à $r_{ij} = R_c$. (—) Troncature sphérique lissée avec une fonction *switch* ($R_{on} = 9$ Å), seule la région $r_{ij} \geq R_{on}$ est différente de la fonction de Lennard-Jones native.

La somme est effectuée sur toutes les boîtes et sur toutes les particules, sauf pour $i = j$ quand $|\mathbf{n}| = 0$, *i.e.* dans la boîte centrale. Or cette équation converge très lentement et seulement sous quelques conditions.

Pour remédier à ce problème, différentes méthodes permettant une décroissance lente et harmonieuse de la fonction d’énergie potentielle et une continuité dans le calcul des forces, ont été développées, telles que la méthode *particle-mesh Ewald* (PME) [Darden *et al.*, 1993, Essmann *et al.*, 1995] que nous avons utilisée dans nos simulations et qui repose sur la sommation d’Ewald.

La sommation d’Ewald C’est une méthode de calcul des interactions d’une charge avec toutes ses images périodiques. L’idée est d’imaginer que la charge q_i d’un atome i et de ses images périodiques, peut être considérée comme une charge ponctuelle q_i entourée d’une paire de densités de charge continues (Fig. 5.11) : une première, $\rho_{1i}(\mathbf{r})$, centrée sur r_i de charge totale $-q_i$ est une densité de contre-ion ; et une seconde, $\rho_{2i}(\mathbf{r})$, la densité de co-ion, de même forme que la densité de contre-ion, centrée sur r_i également, mais de charge opposée, *i.e.* q_i . Ainsi, le potentiel électrostatique créé par q_i à une distance \mathbf{r} équivaut au potentiel dû à q_i écranté par une certaine densité de charges ($\rho_{1i}(\mathbf{r})$), elle-même blindée par la densité

de charge «basale» de l'environnement ($\rho_{2i}(\mathbf{r})$). L'effet de $\rho_{1i}(\mathbf{r})$ et $\rho_{2i}(\mathbf{r})$ s'annule finalement.

La distribution de ces nuages de charge est généralement approchée par une distribution gaussienne :

$$\begin{cases} \rho_{1i}(\mathbf{r}) = -q_i \kappa^3 \frac{e^{-\kappa^2 |\mathbf{r}-\mathbf{r}_i|^2}}{\sqrt{\pi^3}} \\ \rho_{2i}(\mathbf{r}) = q_i \kappa^3 \frac{e^{-\kappa^2 |\mathbf{r}-\mathbf{r}_i|^2}}{\sqrt{\pi^3}} \end{cases} \quad (5.31)$$

κ est une constante positive qui définit la largeur des gaussiennes.

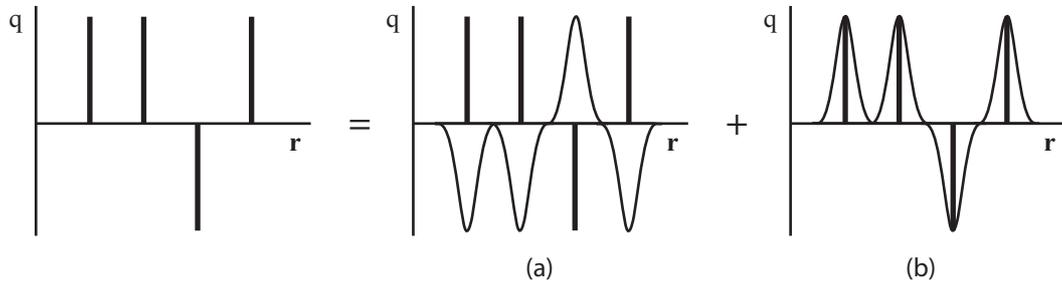


FIG. 5.11 – Représentation des composantes d'une somme d'Ewald dans un système unidimensionnel de charges ponctuelles. Les charges ponctuelles sont symbolisées par des traits verticaux. Chaque charge est entourée d'une distribution gaussienne de charge de contre-ion (a) de densité $\rho_{1i}(\mathbf{r})$ et d'amplitude égale aux charges ponctuelles. Cette contribution est elle-même blindée par une distribution gaussienne de charge de signe opposé (b) $\rho_{2i}(\mathbf{r})$.

Ensuite, on calcule séparément les contributions à l'énergie électrostatique des charges ponctuelles écrantées par les nuages de contre-ions (interaction de courte portée) d'une part, et des nuages de co-ions d'autre part. L'énergie correspondant à ces derniers est évaluée dans l'espace réciproque en utilisant une transformée de Fourier pour résoudre l'équation de Poisson $\nabla^2 \varphi_i(\mathbf{r}) = -4\pi \rho_i(\mathbf{r})$, φ_i le potentiel électrostatique créé par la charge i . La transformée décroît rapidement et la somme converge de la même manière.

En pratique, le paramètre κ de l'Eq. 5.31 et le nombre de cellules sur lesquelles la sommation de Fourier est calculée, définissent la précision du calcul de la sommation d'Ewald, et donc la rapidité du calcul.

Méthode *particle-mesh Ewald* L'approche de la sommation d'Ewald présente un coût en temps de calcul fonction de N^2 . L'algorithme de type *particle-mesh Ewald* (PME) permet de le réduire en $N \ln N$ grâce à l'emploi d'une transformée de Fourier rapide pour évaluer le potentiel électrostatique dans l'espace réciproque.

Pour cela, une grille tridimensionnelle est construite dans l'espace de la simulation (Fig. 5.12). Les charges ponctuelles du système sont interpolées sur cette grille. La distribution de charges correspondante est calculée. La contribution à longue distance du potentiel électrostatique due à la densité de co-ions est ensuite évaluée dans l'espace

réciproque. Enfin, les forces et le potentiel liés à cette contribution sont interpolés en chaque point de la grille, de sorte que leur effet en retour sur les charges ponctuelles permet de mettre à jour les positions de ces dernières dans l'espace réel.

En outre, dans la méthode PME, on a recours à l'approche de la troncature sphérique pour le calcul de la contribution des densité de charge des contre-ions dans l'espace réel.

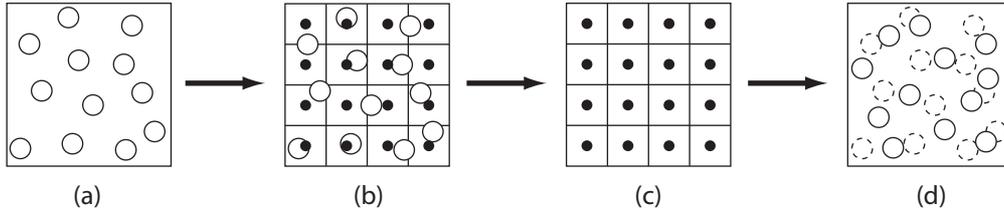


FIG. 5.12 – Principe de la méthode *particle-mesh Ewald* sur un réseau bidimensionnel de charges. (a). Système de charges à l'instant t . (b) Les charges sont interpolées sur une grille bidimensionnelle dans l'espace réciproque. (c) Le potentiel et les forces électrostatiques sont calculés en chaque point de la grille. (d) Les forces sont interpolées en retour vers les charges dont la position est mise à jour à l'instant $t + \Delta t$.

5.3.6 Contrôle de la température

Plusieurs méthodes plus ou moins sophistiquées ont été développées pour permettre de réaliser des simulations numériques isothermes.

Recalibrage des vitesses Cette méthode apparaît la plus simple. On utilise le théorème d'équipartition de l'énergie selon lequel chaque degré de liberté d'un système correspond à une énergie cinétique moyenne de $k_B T/2$, soit pour un système de N atomes :

$$\langle E_c \rangle = \frac{3N}{2} k_B T \quad (5.32)$$

où T est la température désirée du système (k_B la constante de Boltzman). Or, au cours de la simulation, l'énergie cinétique instantanée $E_c(t)$ varie et s'éloigne de $\langle E_c \rangle$. Pour y remédier, il faut périodiquement recalibrer les vitesses (étape dite de *rescaling*) d'un facteur λ tel que $E_c(t)$ tende vers $\langle E_c \rangle_t$: $\mathbf{v}_i(t) \rightarrow \lambda \mathbf{v}_i(t)$. Ainsi :

$$\frac{3}{2} k_B T = \frac{1}{2} m_i [\lambda v_i(t)]^2 \quad (5.33)$$

La correction des vitesses s'effectue ensuite par l'intermédiaire des températures :

$$\lambda = \sqrt{\frac{T}{T(t)}} \quad (5.34)$$

où $T(t)$ est la température cinétique instantanée.

Ce type de recalibrage des vitesses en maintenant E_c constante s'appelle un thermostat isocinétique. Néanmoins cette méthode entraîne des sauts artificiels d'énergie totale du système qui n'est alors plus conservée. C'est pourquoi on l'utilise plutôt au cours du chauffage ou de l'équilibration d'un système.

Thermostat de Langevin Dans l'équation de Langevin 5.13, les termes γ_i et $\mathcal{R}_i(t)$ sont couplés :

$$|\mathcal{R}_i(t)| = \sqrt{\frac{2m_i\gamma_i k_B T}{\Delta t}} \cdot \zeta(t) \quad (5.35)$$

$\zeta(t)$ représente des nombres aléatoires tirés d'une distribution gaussienne à chaque pas Δt . Dans la dynamique de Langevin, chaque atome est couplé à un bain thermique de température T . L'échange de chaleur avec le bain thermique est continu. Les atomes sont thermalisés par l'intermédiaire de leurs vitesses, elles-mêmes couplées aux termes de friction γ_i .

Thermostat de Nosé-Hoover Dans cette méthode, on utilise également le terme de friction pour thermaliser les atomes à l'image d'un piston thermique qui couple les vitesses atomiques à un réservoir thermostatique. On reprend l'équation du mouvement contraint de l'équation de Langevin :

$$m_i \dot{\mathbf{v}}_i = -m_i \gamma_i \mathbf{v}_i + \mathcal{R}_i(t)$$

Dans le formalisme de Nosé-Hoover [Hoover, 1985], le terme de friction γ_i est maintenant déterminé tel que $\dot{\gamma}_i = 3Nk_B(T(t) - T)/\mathcal{Q}$, soit

$$\dot{\gamma}_i = \frac{1}{\mathcal{Q}} \left(\sum_{i=1}^N m_i v_i^2 - 3Nk_B T \right) \quad (5.36)$$

où \mathcal{Q} désigne le paramètre d'inertie thermique qui régule les fluctuations thermiques (souvent appelé «masse du bain thermostatique», alors que sa dimension n'est pas celle d'une masse).

L'avantage de ce thermostat est qu'il présente un temps de réponse lent aux fluctuations de température sans générer de saut d'énergie :

- si $T(t) > T$: $\dot{\gamma}_i > 0$, γ_i augmente afin de ralentir par friction les atomes. Le système est refroidi.
- si $T(t) < T$: $\dot{\gamma}_i < 0$, γ_i décroît pour accélérer les atomes. Le système est réchauffé.

5.3.7 Contrôle de la pression

De la même manière qu'un système simulé peut être couplé à un bain thermique, on peut utiliser un «réservoir de pression» pour réguler sa pression au cours du temps.

Barostat du piston de Langevin On utilise la méthode de système étendu développée par Andersen [Andersen, 1980] associée à un thermostat de Nosé-Hoover qui permet de réaliser des simulations isobares-isothermes. CHARMM permet l'emploi d'une variante de la méthode du système étendu où l'équation de Langevin sert au contrôle de la pression [Feller *et al.*, 1995].

On couple le système au volume V de la boîte de simulation pour symboliser l'action d'un piston barostatique.

L'effet du mouvement du piston peut être décrit par la variation de V au cours du temps selon l'équation de Langevin :

$$\ddot{V} = \frac{P(t) - P}{\mathcal{M}_p} - \Gamma \dot{V} + \mathcal{R}_p(t) \quad (5.37)$$

Γ désigne la fréquence de collision et $\mathcal{R}_p(t)$ est une force stochastique. \mathcal{M}_p est assimilable à la masse du piston (bien que de dimension réelle homogène à $M.L^{-4}$). $P(t)$ et P sont respectivement la pression instantanée et la pression de référence. L'expression \ddot{V} représente l'«accélération» du volume dû au mouvement du piston.

La température T du bain thermostatique de Nosé-Hoover intervient dans le contrôle de la pression :

- $\mathcal{R}_p(t)$ est extrait d'une distribution gaussienne de moyenne nulle et de variance $2\Gamma k_B T \delta(t) / \mathcal{M}_p$
- La pression instantanée $P(t)$ est dérivée du théorème du viriel : $P(t)V = \frac{2}{3} N k_B T$, soit

$$P(t) = \frac{1}{V} \left(N k_B T - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i(t) \cdot \mathbf{F}_i(t) \right) \quad (5.38)$$

avec $P(t)V = \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{F}_i(t)$. $\mathbf{F}_i(t)$ est l'ensemble des forces exercées sur l'atome i à l'instant t .

5.4 Protocole de simulation

Les structures initiales des protéines sont celles disponibles sur le site Internet de la PDB. Pour les simulations des holoprotéines, quand la structure disponible est celle d'une forme liée à un autre métal, ce dernier a été changé. Par exemple, pour HgHah1, comme seule la structure liée au cuivre a été résolue, le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ a été «muté» en $\text{Hg}^{(\text{II})}$. L'énergie de l'ensemble des systèmes a été minimisée préalablement aux simulations.

Pour les mutants d'Hah1, leur structure est créée à partir des structures sauvages (dites «WT» pour *wild type*) respectives d'apoHah1^{WT}, CuHah1^{WT} et HgHah1^{WT}. Les atomes communs de l'acide aminé à muter dans les formes WT et mutantes sont conservés tandis que les autres sont ajoutés grâce aux coordonnées internes de CHARMM.

Les simulations sont réalisées avec des conditions périodiques aux limites en présence de molécules d'eau TIP3P. L'algorithme *particle-mesh Ewald* est employé pour le calcul des forces électrostatiques à longue distance. Le détail des systèmes simulés est exposée au tableau 5.4.

Les simulations de dynamique moléculaire sont menées en deux étapes :

1. Simulation NVT : Une fois les vitesses assignées à chaque atome, le système est relaxé pendant 30 ps, sous une pression de 1 atm à 300 K (ensemble micro-nanonique NVT, nombre de particules N , volume de la boîte de simulation V et

Protéines	Fichiers PDB sources	Commentaires	Caractéristiques de simulation
<i>Atx1</i>			
Apo	1FES	Structure moyenne	Contraintes NOE
	1FES ^{exp}	Structure expérimentale	Contraintes NOE
Cu ^(I)	1FD8	Structure moyenne	Contraintes NOE
Hg ^(II)	1CC8	Ajout de Met1	Contraintes NOE
	1CC8	Ajout de Met1	
	1FD8	Cu ^(I) remplacé par Hg ^(II)	Contraintes NOE
<i>Hah1^{WT}</i>			
Apo	1TL5		
Cu ^(I)	1TL4		
Hg ^(II)	1TL4	Cu ^(I) remplacé par Hg ^(II)	
<i>Mutants M10A et M10S d'Hah1</i>			
Apo	1TL5	} Structures initiales : la dernière conformation des simulations respectives d'Hah1 ^{WT} a été mutée, puis son énergie a été minimisée.	
Cu ^(I)	1TL4		
<i>MerP</i>			
Apo	1AFI		
Cu ^(I)	1AFJ	Hg ^(II) remplacé par Cu ^(I)	
Hg ^(II)	1AFJ		

TABLE 5.4 – Tableau récapitulatif des simulations réalisées.

température T constants).

La dynamique et le piston de Langevin sont utilisés pour le contrôle de la température et de la pression, avec un coefficient de friction de 3 ps^{-1} pour tous les atomes lourds de la protéine (*i.e.* pour tous les atomes qui ne sont pas des hydrogènes). Des contraintes harmoniques de constante de force $k = 1 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ sont appliquées sur ces derniers pendant les 5 premières picosecondes, puis progressivement relâchées toutes les 5 ps de $0.2 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$, de telle sorte qu'après 30 ps où aucun mouvement atomique n'est plus contraint, aucune zone «chaude» (des atomes conservent des vitesses élevées par rapport au reste du système) ou «froide» (des atomes ont des vitesses trop faibles) ne persiste dans le système.

2. Simulation NPAT : Ensuite, les simulations sont poursuivies dans l'ensemble thermodynamique isotherme-isobare *NPT* (pression P et température T constants) où la longueur des deux plus petits côtés de la boîte de simulation (b sur l'axe y et c sur l'axe z) sont constantes (ensemble dit *NPAT*, A l'aire de la surface $bc = C^{te}$). La pression est appliquée de manière anisotrope, *i.e.* uniquement suivant l'axe x avec une pression de référence $P_x = 1 \text{ atm}$ ($P_y = P_z = 0$) grâce à l'algorithme de pression du système étendu (*extended system pressure algorithm*). La température du système est maintenue en moyenne à $T = 300 \text{ K}$ en couplant chaque atome à un bain thermostatique contrôlé par l'algorithme de Nosé-Hoover.

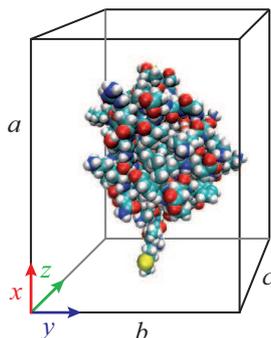


FIG. 5.13 – Schéma de la boîte de simulation. La longueur a de la dimension de la boîte alignée sur l'axe x peut varier dans les simulations *NPAT*. L'aire bc de la boîte est constante. Les molécules d'eau ne sont pas représentées pour plus de clarté.

Concernant les simulations d'Atx1, le protocole a différé suite à des problèmes d'équilibration du système d'apoAtx1. Des contraintes de distance de type NOE ont été ajoutées à deux paires d'atomes d'Atx1 pour l'empêcher de se déplier par son extrémité C-terminale. Les raisons en seront détaillées plus loin.

5.5 Analyse des simulations de dynamique moléculaire

5.5.1 RMSD et RMSF

Le RMSD (*Root Mean Square Deviation*, écart quadratique moyen) permet de mesurer la différence entre deux structures S_0 et S_1 préalablement superposées au mieux, d'une molécule de n atomes :

$$\text{RMSD}(S_0, S_1) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\mathbf{r}_{i,1} - \mathbf{r}_{i,0}|^2} \quad (5.39)$$

avec $\mathbf{r}_{i,0}$ et $\mathbf{r}_{i,1}$ les vecteurs positions respectifs de l'atome i dans S_0 et S_1 .

La structure de référence est souvent la structure expérimentale utilisée initialement (issue de la RMN ou de la cristallographie RX) ou la première conformation générée par la simulation. On peut ainsi calculer l'évolution du RMSD au cours d'une simulation en évaluant successivement à chaque pas de temps, le RMSD de chaque conformation par rapport à S_0 .

Le RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*, fluctuation quadratique moyenne) d'un atome utilise une formule proche du RMSD, si ce n'est que S_0 est la structure moyenne de la simulation. En outre, les écarts quadratiques sont moyennés sur l'ensemble des conformations N_k pour un atome donné i :

$$\text{RMSF}(i) = \sqrt{\frac{1}{N_k} \sum_{k=1}^{N_k} |\mathbf{r}_{i,k} - \langle \mathbf{r}_i \rangle_k|^2} \quad (5.40)$$

où $\mathbf{r}_{i,k}$ est le vecteur position de l'atome i dans la conformation k , et $\langle \mathbf{r}_i \rangle_k$, le vecteur position moyen de i calculé sur les N_k conformations.

Le RMSF renseigne sur la mobilité de chaque atome i au cours d'une simulation donnée. Il est lié au facteur de température B utilisé en cristallographie, tel que :

$$B = \frac{8\pi^2}{3}(\text{RMSF})^2 \quad (5.41)$$

Tous les RMSF présentés dans ce document sont calculés à partir des seules positions des atomes C_α des aminoacides.

5.5.2 Carte des corrélations croisées dynamiques

Les mouvements relatifs des atomes les uns par rapport aux autres dans une protéine peuvent être étudiés en calculant la covariance c_{ij} entre les déplacements des atomes i et j :

$$c_{ij} = \langle (\mathbf{r}_i - \langle \mathbf{r}_i \rangle)(\mathbf{r}_j - \langle \mathbf{r}_j \rangle) \rangle = \langle \mathbf{r}_i \mathbf{r}_j \rangle - \langle \mathbf{r}_i \rangle \langle \mathbf{r}_j \rangle \quad (5.42)$$

\mathbf{r}_i et \mathbf{r}_j sont les positions des atomes à chaque instant t de la simulation. Les parenthèses $\langle \rangle$ dénotent des moyennes sur le temps de la simulation. Si $i = j$, c_{ii} n'est autre que le RMSD² de l'atome i . Les RMSD croisés c_{ij} sont ensuite normalisés par les RMSD des atomes i et j . On obtient une matrice $[C_{ij}]$ des RMSD croisés normalisés (autrement appelée matrice des corrélations croisées ou des covariances normalisées) [Ichiye et Karplus, 1991] :

$$C_{ij} = \frac{c_{ij}}{\sqrt{c_{ii}\sqrt{c_{jj}}}} = \frac{\langle \mathbf{r}_i \mathbf{r}_j \rangle - \langle \mathbf{r}_i \rangle \langle \mathbf{r}_j \rangle}{[(\langle \mathbf{r}_i^2 \rangle - \langle \mathbf{r}_i \rangle^2)(\langle \mathbf{r}_j^2 \rangle - \langle \mathbf{r}_j \rangle^2)]^{1/2}} \quad (5.43)$$

La valeur de C_{ij} renseigne sur les mouvements relatifs de atomes i et j : pour des mouvements totalement corrélés, $C_{ij} = 1$ (Fig. 5.14a), et pour des mouvements totalement anticorrélés, $C_{ij} = -1$ (Fig. 5.14c). S'ils sont complètement décorrélés, $C_{ij} = 0$ (Fig. 5.14b). Une corrélation complète signifie que les déplacements de i et de j ont la même phase et la même période (dans le cas de l'anticorrélation, ils sont en opposition de phase). Toute déviation de 1 (ou de -1) indique que les mouvements de la paire d'atomes sont moins corrélés (ou anticorrélés) ou qu'ils ne sont pas alignés suivant la même direction. Ainsi, si les fluctuations des positions de deux atomes sont parfaitement en phase avec la même période, mais qu'elles sont orientées selon un angle de 90° , $C_{ij} = 0$.

Statistiquement, C_{ij} serait également nul si \mathbf{r}_i et \mathbf{r}_j adoptent toutes les orientations possibles, indépendamment les uns des autres).

La représentation graphique de la matrice $[C_{ij}]$ conduit à une carte des RMSD croisés normalisés, ou carte des corrélations croisées dynamiques (DCCM, *dynamical cross-correlation map*).

L'intervalle de temps sur lequel les éléments C_{ij} sont calculés revêt une certaine importance selon les corrélations que l'on souhaite observer. Les corrélations entre

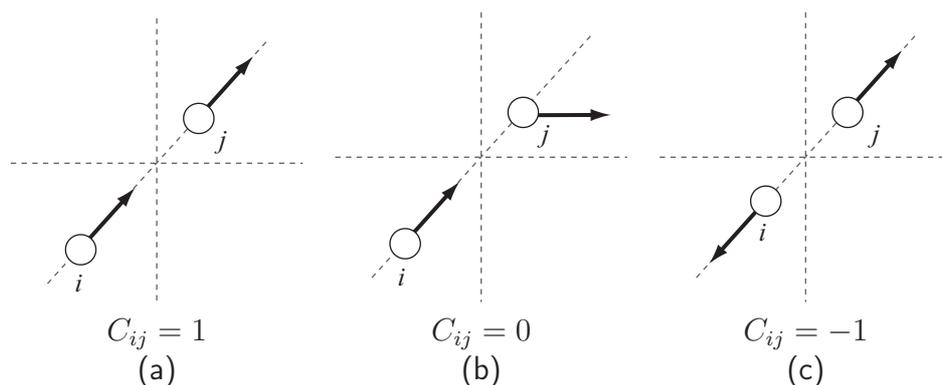


FIG. 5.14 – Illustration de la corrélation entre les mouvements de deux atomes i et j . (a) Mouvements totalement corrélés. (b) Mouvements totalement décorrélés. (c) Mouvements totalement anticorrélés.

des atomes proches d'un même domaine apparaissent bien établies sur un intervalle de temps plus court que les corrélations entre des domaines distincts d'une protéine [Harte *et al.*, 1992].

Les cartes des RMSD croisés normalisés présentées par la suite seront basées uniquement sur les positions des atomes C_α .

5.5.3 Liaisons hydrogène

Il existe plusieurs critères pour définir une liaison hydrogène. Le plus souvent, on utilise une distance maximale r_{\max} entre l'atome A accepteur de liaison hydrogène et l'atome H, qui peut être combiné à un angle maximal θ_{\max} de déviation de la liaison par rapport au cas idéal où les atomes A, H et D (donneur de liaison hydrogène) sont alignés (Fig. 5.15). Plusieurs valeurs de r_{\max} associés ou non à un critère angulaire ont été testées [De Loof *et al.*, 1992]. Les critères permettant la meilleure identification des liaisons hydrogène par rapport aux données expérimentales, sont : $r_{\max} < 2.4 \text{ \AA}$ et $\theta_{\max} > 135^\circ$ [Åqvist *et al.*, 1985].

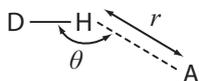


FIG. 5.15 – Illustration des paramètres géométriques définissant les liaisons hydrogène ($r_{\max} < 2.4 \text{ \AA}$ et $\theta_{\max} > 135^\circ$).

5.5.4 Repliement des protéines

Les éléments de structure secondaire des protéines sont déterminés avec le programme STRIDE [Frishman et Argos, 1995]. STRIDE combine deux propriétés fondamentales des structures secondaires pour leur assignement : les liaisons hydrogène et la géométrie du squelette peptidique exprimée par le couple d'angle dièdre (ϕ, ψ) .

STRIDE s'inspire du programme DSSP [Kabsch et Sander, 1983] déjà largement employé et qui n'utilise que le seul critère de liaison hydrogène. La définition des hélices α et des feuillets et brins β a été améliorée dans STRIDE, tandis que les critères d'identification des hélices 3_{10} et π sont identiques à ceux de DSSP avec néanmoins une autre formule empirique pour l'énergie de liaison hydrogène.

Hélices α , feuillets et brins β L'énergie de liaison hydrogène entre les groupements N-H du résidu i et C=O du résidu j du squelette peptidique est pondérée par les probabilités que les couples de dièdres (ϕ_i, ψ_i) et (ϕ_j, ψ_j) des résidus i et j respectivement appartiennent à une structure α et β . Ces probabilités résultent d'une analyse statistique du diagramme de Ramachandran des valeurs des dièdres (ϕ, ψ) des résidus identifiés dans une hélice α ou un feuillet β dans les fichiers PDB des 226 structures (RMN et X) test (aux lignes HELIX et SHEET).

L'énergie de liaison hydrogène entre les résidus i et j est évaluée à partir de critères géométriques.

Coudes β , hélices 3_{10} et π Il n'est pas possible d'employer la même méthode pour l'identification des autres types d'hélices (π , 3_{10} et hélices gauches) car elles ne sont pas suffisamment répandues et les valeurs des dièdres (ϕ, ψ) sont relativement variables d'une protéine à l'autre. En outre, les hélices 3_{10} se révèlent plutôt irrégulières avec des angles (ϕ, ψ) moins localisés que les autres types hélicoïdaux sur un diagramme de Ramachandran. Par conséquent, STRIDE utilise les mêmes règles générales que DSSP pour les assigner, mais les liaisons hydrogène sont définies selon la méthode de Stickle et al. [Stickle *et al.*, 1992] et non celle de Kabsch et Sander [Kabsch et Sander, 1983]. Ces critères prennent en compte la distance entre les atomes donneur et accepteur de liaison hydrogène, le type de ces atomes (donneur ou accepteur, élément chimique, hybridation) et leur environnement (par exemple des tests de planéité sont ajoutés).

Les coudes β sont identifiés en utilisant la nomenclature de Wilmot et Thornton [Wilmot et Thornton, 1990]. Cette classification a l'avantage de mieux tenir compte des différentes valeurs que les couples (ϕ, ψ) peuvent prendre. Elle se base sur la valeur de ces angles dièdres des résidus $i + 1$ et $i + 2$ du coude β .

Etude du repliement au cours des simulations STRIDE permet d'identifier les éléments de structure secondaire à partir d'un fichier PDB. Les simulations de dynamique moléculaire génèrent un fichier PDB toutes les 5 ps. Cela permet alors de suivre l'évolution temporelle des hélices (α , π et 3_{10} , des brins/feuillets β et des coudes β) au cours des simulations.

Le repliement moyen des protéines à l'issue de chacune des simulations est déterminé. Pour cela, on attribue à chaque acide aminé l'élément de structure secondaire auquel il appartient pendant au moins 50% du temps de la phase de production (5 ns).

5.5.5 Accessibilité au solvant

Les accessibilités au solvant des aminoacides et des atomes des protéines sont calculées avec le programme NACCESS² (version 2.1.1) développé par S. Hubbard et disponible sur Internet. Les surfaces accessibles au solvant sont évaluées en utilisant la méthode de Lee et Richards [Lee et Richards, 1971] : une sphère d'essai de rayon 1.4 Å (rayon d'une molécule d'eau si on la considère sphérique) est déplacée sur des atomes représentés par des sphères de rayon égale à leur rayon de van der Waals. La surface accessible est définie comme étant l'enveloppe moléculaire englobant le volume décrit par les sphères de van der Waals augmentées du rayon de la sphère de test (Fig. 5.16).

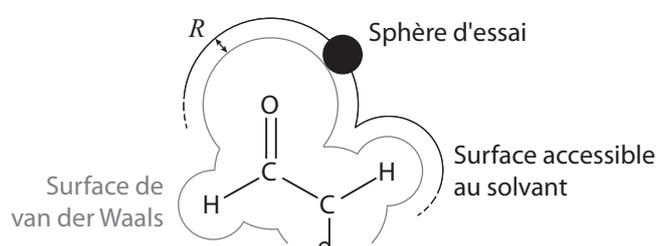


FIG. 5.16 – Illustration de la surface accessible au solvant d'une molécule selon la méthode de Lee et Richards. Une sphère d'essai de rayon R est déplacée sur la surface de van der Waals de la molécule. La surface décrite par le centre de la sphère définit la surface accessible au solvant de la molécule.

La surface relative accessible au solvant (SRA) d'un acide aminé est calculée en divisant la valeur de sa surface accessible dans l'environnement où on l'étudie, par une valeur de référence. Pour les acides aminés, les surfaces accessibles de référence sont tabulées et utilisées par NACCESS. Pour un résidu X donnée, elles sont évaluées à partir du tripeptide Ala-X-Ala [Hubbard *et al.*, 1991].

Pour le calcul des accessibilités au solvant des ions $\text{Cu}^{(\text{I})}$ et $\text{Hg}^{(\text{II})}$ dans les protéines, le rayon de van der Waals utilisé est celui déterminé au laboratoire par Fuchs *et al.* [Fuchs *et al.*, 2005], à savoir : 1.40 Å pour $\text{Cu}^{(\text{I})}$, et 1.60 Å pour $\text{Hg}^{(\text{II})}$.

NACCESS permet d'avoir directement accès aux surfaces accessibles des résidus entiers ou de leur seule chaîne latérale (les atomes d'hydrogènes sont inclus dans le calcul des SRA). Dans ce cas-ci, les atomes C_α sont compris dans les chaînes latérales de sorte que la chaîne latérale des glycines peut avoir une accessibilité relative au solvant.

5.5.6 Estimation de l'erreur statistique sur une moyenne

Une évaluation de l'erreur sur la valeur moyenne d'une quantité calculée à partir d'une simulation de dynamique moléculaire, peut conduire à une sous-estimation à cause de l'importante corrélation entre les N points d'une série temporelle. Ceci est

²<http://wolf.bi.umist.ac.uk/naccess>

d'autant plus vrai que les coordonnées atomiques sont sauvegardées fréquemment. Ainsi, paradoxalement, plus on «regarde» d'images instantanées du système, plus on risque de se tromper sur l'erreur commise lors de l'évaluation d'une moyenne. En effet l'erreur sur la moyenne varie selon $1/\sqrt{N_{\text{ind}}}$, où N_{ind} est le nombre de points *indépendants* utilisés pour son calcul.

Une méthode pour contourner cette difficulté, consiste à calculer les moyennes sur m sous-ensembles supposés non corrélés et l'erreur correspondante sur les m moyennes, appelées sous-moyennes par la suite. Cette erreur (σ_μ) n'est autre qu'un RMSD. Si tous les N points sont indépendants (non corrélés), alors σ_μ est équivalent à la dispersion σ_d des points autour de la moyenne calculée sur les N points. Le problème revient alors à savoir quelle taille doivent avoir ces sous-ensembles pour qu'ils puissent être considérés comme non corrélés.

L'approche de Straatsma *et al.* [Straatsma *et al.*, 1986] propose d'estimer l'erreur σ_μ sur les sous-moyennes en se fondant sur le calcul de la fonction de corrélation elle-même. Cette méthode permet d'accéder à la valeur du nombre de points indépendants N_{ind} à partir des valeurs ρ_k de la fonction d'autocorrélation telles que :

$$\rho_k = \frac{\text{cov}(x_i, x_{i+k})}{\text{var}(x_i)} \quad (5.44)$$

Le nombre de points indépendants est alors défini par :

$$N_{\text{ind}} = \frac{N}{1 + 2 \sum_{k \geq 1} \rho_k} \quad (5.45)$$

et

$$\sigma_\mu = \sigma_d \frac{N}{N_{\text{ind}}} \quad (5.46)$$

Ainsi, le nombre de points indépendants est toujours inférieur au nombre total de points N de la série, d'autant plus si la fonction d'autocorrélation est longue à tendre vers 0 ($\sum_{k \geq 1} \rho_k$ est la «longueur de corrélation» de la série). Si tous les coefficients de corrélation ρ_k sont nuls, $N_{\text{ind}} = N$.

D'un point de vue pratique, la fonction d'autocorrélation peut être approximée par une exponentielle décroissante lorsqu'elle devient trop bruitée et que sa convergence vers 0 n'est pas assurée.

Chapitre 6

L'Absorption de Rayons X

Sommaire

6.1	Interactions des rayons X avec la matière	76
6.1.1	Règle d'or de Fermi	77
6.1.2	Seuils d'absorption atomiques	77
6.1.3	Transitions atomiques	78
6.2	Spectroscopies d'absorption de rayons X	78
6.2.1	XANES et EXAFS	78
6.2.2	Equation simplifiée de l'EXAFS	79
6.2.3	Traitement des données EXAFS	80
6.2.4	Extraction du signal EXAFS	80
6.2.5	Transformée de Fourier	81
6.2.6	Analyse des données EXAFS	81
6.3	Mise en œuvre expérimentale	82
6.4	Expériences d'absorption de rayons X du Cu^(I)	83

La RMN et la cristallographie des protéines ont accompli de prodigieux progrès ces dernières années. Il est désormais possible d'obtenir des structures de protéines à haute résolution (inférieure à 2 Å) avec la cristallographie. Dans de nombreux cas, la résolution atomique (moins de 1.2 Å, où les atomes deviennent visibles) reste difficile du fait de limites de diffraction inhérentes aux cristaux étudiés (désordre statique trop grand). La détermination de la structure locale des centres métalliques des métalloprotéines nécessite donc l'emploi d'autres techniques car de l'environnement immédiat des métaux dans les protéines, dépendent les propriétés des centres métalliques et des protéines elles-même. Les métalloprotéines utilisent la chimie des métaux. Les réactions chimiques qu'elles réalisent sont souvent accompagnées d'un changement structural très fin autour du métal. Or la cristallographie ne peut pas définir de distance entre le métal et ses ligands avec une précision meilleure que 0.1 Å. Des incertitudes de cet ordre de grandeur sont chimiquement significatives. La spectroscopie d'absorption X se révèle ici un outil très précieux pour l'étude précise des centres métalliques, notamment l'EXAFS (*Extended X-ray*

Absorption Fine Structure) qui peut fournir des longueurs de liaisons métal-ligand avec une précision de $\pm 0.02 \text{ \AA}$. Les informations à très haute résolution produites par l'EXAFS ouvrent la voie à l'étude précise de l'environnement des métaux dans les protéines.

C'est le cas des cuprédoxines (ou protéines dites *blue copper*) qui assurent le transfert d'électron grâce à leur ion $\text{Cu}^{\text{(II)}}$. La structure des formes réduite et oxydée de l'azurine II de *Alcaligenes xylosoxidans* a été résolue par cristallographie à 1.75 \AA de résolution [Dodd *et al.*, 2000], et la structure locale du cuivre a été affinée par EXAFS [Cheung *et al.*, 2000]. La sphère de coordination du cuivre compte deux azotes (N_δ des histidines 46 et 117), et deux soufres (S_γ de la cystéine 112 et S_δ de la méthionine 121), complétée par l'oxygène du squelette peptidique de la glycine 45. Les distances cuivre-ligand issues de la structure X et de l'EXAFS ont été comparées (6.1) [Hasnain, 2000]. Bien qu'il y ait un accord général entre les distances mesurées par les deux techniques, l'effet de la réduction du centre métallique est le plus visible avec l'EXAFS. La cristallographie atteint cependant ses limites car la résolution ne permet pas véritablement la mise en évidence des changements fins dus à la réduction du $\text{Cu}^{\text{(II)}}$. C'est le plus visible pour les distances Cu-N_δ de H^{46} dans la forme oxydée où l'écart avec l'EXAFS est près de 0.1 \AA .

Ligands	Distances mesurées par RX		Distances mesurées par EXAFS	
	Oxydée [\AA]	Réduite [\AA]	Oxydée [\AA]	Réduite [\AA]
$\text{N}_\delta^{\text{H}46}$	2.04	2.03	1.86	1.90
$\text{N}_\delta^{\text{H}117}$	1.99	2.02	1.94	2.01
$\text{S}_\gamma^{\text{C}112}$	2.14	2.16	2.12	2.17
$\text{O}_\gamma^{\text{G}45}$	2.27	2.75	2.82	2.98
$\text{S}_\delta^{\text{M}121}$	3.26	3.26	3.40	3.35

TAB. 6.1 – Comparaison des distances Cu-ligands de l'azurine II oxydée et réduite de *Alcaligenes xylosoxidans* obtenues par cristallographie X et EXAFS. Les distances EXAFS du $\text{S}_\delta^{\text{M}121}$ ont été raffinées en les incluant d'abord dans le modèle à leurs positions cristallographiques.

6.1 Interactions des rayons X avec la matière

Dans le domaine des rayons X d'énergie supérieure à 3 keV , le phénomène d'absorption suivi de l'émission d'un photoélectron est le processus majoritaire devant les diffusions Thomson et Compton. Si on les néglige, l'intensité I du faisceau transmis par un échantillon homogène et d'épaisseur uniforme x , peut être calculée suivant la loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (6.1)$$

avec I_0 l'intensité du faisceau incident (monochromatique tel que $\lambda = hc/E$, λ et E la longueur d'onde et l'énergie du faisceau incident, h la constante de Planck et c la vitesse de la lumière) et μ le coefficient d'absorption des rayons X.

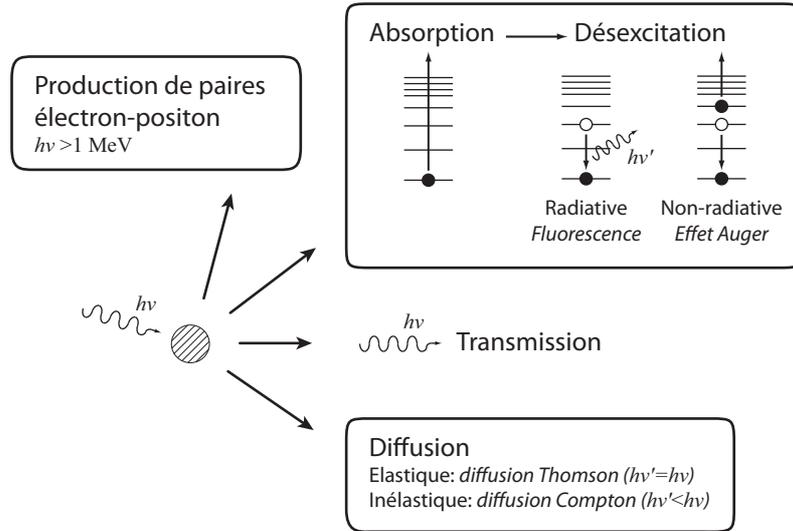


FIG. 6.1 – Processus d’interaction des rayons X avec la matière ; adapté de [Fontaine, 1993].

6.1.1 Règle d’or de Fermi

L’absorption des rayons X par un atome repose sur un principe fondamental : la règle d’or de Fermi. Celle-ci donne une expression générale de la probabilité de transition μ d’un électron de cœur de l’état fondamental à l’état initial, décrit par une fonction d’onde ψ_i et une énergie E_i , vers un état excité à l’état final de fonction d’onde ψ_f et d’énergie E_f , suite à l’absorption d’un photon X d’énergie $h\nu$:

$$\mu(E) \propto \sum |\langle \psi_f | H | \psi_i \rangle|^2 \delta(h\nu - (E_f - E_i)) \quad (6.2)$$

H est l’hamiltonien d’interaction de la matière avec le rayonnement. La somme est effectuée sur l’ensemble des états finaux qui conservent l’énergie totale du système. Dans un formalisme de diffusion, $|\psi_f\rangle$ représente tous les trajets possible de l’électron émis par l’atome absorbeur, subissant toutes les interactions élastiques possibles avec les atomes du milieu avant de revenir à son site initial. La fonction de Dirac δ indique que l’absorption n’intervient que lorsque l’énergie du photon X est égale à l’énergie de la transition $i \rightarrow f$.

6.1.2 Seuils d’absorption atomiques

μ présente des discontinuités appelées seuils d’absorption. Elles sont dues à l’effet photoélectrique.

Les seuils d’absorption correspondent à des transitions électroniques depuis un niveau de cœur de l’atome central. Ils sont donc caractéristiques des couches électroniques d’un élément donné. On associe ainsi aux transitions d’un niveau de cœur $1s, 2s, 2p$ etc vers un état vacant situé juste au-dessus du niveau de Fermi, les seuils K, L_I, L_{II} etc selon les règles de transition dipolaire.

Quand $E < E_0$ (E_0 l’énergie d’un seuil d’absorption donné), la transition d’un électron du niveau de cœur (couches K, L ou M) n’est pas possible, le coefficient d’absorption

décroît de façon monotone. Il n'y a pas d'absorption. Au-delà du seuil ($E > E_0$), l'énergie d'un photon incident est suffisamment grande pour éjecter un électron (appelé photoélectron) vers des états du continuum avec une certaine énergie cinétique E_c (c'est l'effet photoélectrique) :

$$E_c = \frac{1}{2}m_e v^2 = E - E_{\text{couche}} = h\nu - \Phi \quad (6.3)$$

où m_e est la masse de l'électron, v sa vitesse, ν la fréquence de l'onde associée au photon X absorbé et $E_{\text{couche}} = \Phi$ l'énergie de liaison de l'électron à la couche atomique avant éjection. Φ est le travail d'extraction de l'électron ou l'énergie d'ionisation de l'atome. C'est l'énergie qu'il faut apporter à l'électron pour l'exciter et l'éjecter de sa couche initiale. L'excédent d'énergie est transformé en énergie cinétique.

μ dépend ainsi fortement de l'énergie du photon incident et du numéro atomique Z de l'élément absorbé :

$$\mu \propto \frac{Z^4}{E^3} \quad (6.4)$$

6.1.3 Transitions atomiques

Dans le cadre de l'approximation dipolaire, le moment de transition atomique est gouverné par des règles de sélection de transition dipolaires. Si ΔS est la variation de l'état de spin total de l'atome absorbé au cours de la transition, ΔL la variation de son moment angulaire orbital et ΔJ de son moment angulaire total ($J = L + S$), une transition atomique est autorisée si $\Delta S = 0$, $\Delta L = \pm 1$ et $\Delta J = \pm 1$.

Aux seuils K et L_I , un électron s (moment angulaire orbital de l'électron $l = 0$) ne peut être excité que vers des orbitales atomiques de symétrie p où $l = 1$ ($\Delta L = +1$). Il ne peut y avoir de transition vers une orbitale atomique s ($\Delta L = 0$) ou d ($\Delta L = +2$). Au seuil L_{II} et L_{III} , l'électron est dans une orbitale atomique $2p$ ($l = 1$). Son excitation entraîne une transition vers un état vacant de symétrie s ($l = 0 \Rightarrow \Delta L = -1$) ou, avec une probabilité plus grande, d ($l = 2 \Rightarrow \Delta L = +1$). Cet électron est soumis à un couplage spin-orbite ($l = 1$, moment angulaire total $j = l \pm \frac{1}{2}$). Il existe donc deux états atomiques : $P_{\frac{1}{2}}$ pour lequel $j = \frac{1}{2}$, et $P_{\frac{3}{2}}$ pour lequel $j = \frac{3}{2}$. Le seuil L_{II} est associé à l'état $P_{\frac{1}{2}}$ et L_{III} à $P_{\frac{3}{2}}$. Ainsi aux seuils L_{II} - L_{III} , on observe majoritairement les transition $2p^6 3d^n \rightarrow 2p^5 3d^{n+1}$.

La spectroscopie d'absorption X permet de sonder le moment orbital des états vacants de l'atome absorbé. Le choix de l'énergie des photons X incidents permet une double sélectivité : celle de l'élément sondé et celle du niveau orbitalaire excité.

6.2 Spectroscopies d'absorption de rayons X

6.2.1 XANES et EXAFS

On distingue deux régimes suite à l'absorption du photon X. Lorsque E est légèrement supérieure à E_0 , le photoélectron est émis avec une énergie cinétique faible vers des états vacants situés juste au-dessus du niveau de Fermi. Il est alors impliqué dans des phénomènes de diffusion multiples avec les atomes environnants (diffusion à

n corps). Cette partie du spectre d'absorption s'étend jusqu'à environ 50 eV au-delà du seuil. C'est le XANES (*X-ray Absorption Near-Edge Structure*). Le XANES est accompagné de structures plus fines qui apportent des informations sur l'ordre local autour de l'atome absorbeur et sur sa structure électronique.

La partie EXAFS suit le XANES et s'étend jusqu'à 1000 eV après le seuil. L'électron est éjecté vers les états du continuum avec une énergie cinétique importante. Le photoélectron est essentiellement impliqué dans des phénomènes de diffusion simple ($n = 2$) avec les atomes voisins de l'absorbeur.

Le coefficient d'absorption atomique μ décroît alors que E augmente. Si l'atome est isolé (gaz monoatomique), le coefficient d'absorption au-delà du seuil reste monotone. On l'appelle coefficient d'absorption atomique μ_0 . Dans le cas contraire, si l'atome absorbeur a des voisins autour de lui, le coefficient d'absorption présente des oscillations jusqu'à 1000 eV au-delà du seuil d'absorption. Ces oscillations sont à l'origine du signal EXAFS, $\chi(E)$. $\chi(E)$ est la composante oscillatoire du coefficient d'absorption :

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E)} \quad (6.5)$$

6.2.2 Equation simplifiée de l'EXAFS : diffusion simple au seuil K

Dans un cluster d'atomes tel qu'illustré sur la figure 6.2, quand le photoélectron est éjecté de l'atome absorbeur A, plusieurs chemins de diffusion sont possibles avant que le photoélectron ne rétrodiffuse *in fine* vers A. En plus des trajets aller-retour 1 et 2 qui représentent la diffusion simple, d'autres chemins où le photoélectron diffuse d'un nombre variable d'atomes (diffusion double, diffusion triple *etc*) existent. Le chemin 3 est un exemple de diffusion triple où le photoélectron diffuse de deux atomes voisins. En fait, pour ce chemin-ci, il existe deux chemins de diffusion double selon l'atome à partir duquel le photoélectron diffuse en premier. Les chemins 4 et 5 sont des chemins de diffusion double et triple respectivement. Ils présentent néanmoins la particularité d'avoir les atomes rétrodiffuseurs alignés. Les diffusions sont alors dites colinéaires. Les chemins de diffusions sont donc multiples et peuvent impliquer un nombre d'atomes voisins très variable. Le chemin 6 illustre la complexité d'une diffusion d'ordre élevé

En tenant compte de plusieurs approximations, Sayers, Stern et Lythe proposèrent en 1971 une équation de l'EXAFS dans le cas de la diffusion simple d'un électron au seuil K [Sayers *et al.*, 1971] :

$$\chi(k) = \sum_j \frac{N_j |f_j(\pi, k)|}{k R_j^2} S_0^2 e^{-2k^2 \sigma_j^2} e^{-2R_j/\lambda} \sin(\varphi_j(R_j, k)) \quad (6.6)$$

où N_j est le nombre d'atomes rétrodiffuseurs de type j , σ_j^2 la variation quadratique moyenne des distances R_j autour de la distance moyenne $\langle R_j \rangle$, f_j l'amplitude de rétrodiffusion de l'atome j et λ le libre parcours moyen du photoélectron. S_0^2 est un facteur de réduction dû à des effets multiélectroniques. Sous l'effet de la perturbation, suite à la création du trou de cœur, il y a une réorganisation des électrons de valence

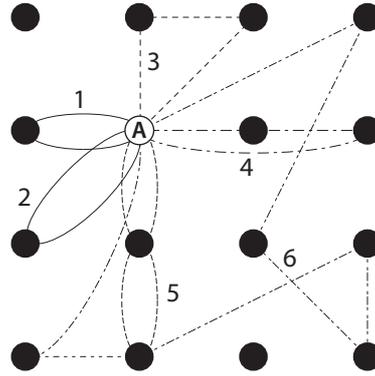


FIG. 6.2 – Représentation schématique des chemins de diffusion dans un cluster d'atomes ; adapté de [Ravel, 2004].

de l'atome. λ et S_0^2 traduisent deux processus inélastiques.

Quand l'onde du photoélectron se propage autour de l'atome absorbeur, elle interfère (soit de manière constructive, soit de manière destructive) avec l'onde rétrodiffusée par les atomes voisins. φ_j représente les perturbations de l'onde rétrodiffusée par l'atome j voisin de A. Cela explique les oscillations de χ .

Les atomes de type j définissent une couche de coordination autour de l'atome absorbeur central, *i.e.* qu'ils sont de même nature (mêmes Z) et à la même distance de l'atome central (mêmes R_j). χ est donc la somme des phases pondérées par les atomes de type j .

Dans cette formulation de l'EXAFS, on peut distinguer deux types de paramètres pour chaque sphère de coordination : les paramètres structuraux d'une part (N_j , R_j et σ_j^2), et les paramètres électroniques d'autre part ($f_j(\pi, k)$, λ et $\varphi_j(R_j, k)$). Ces derniers sont des propriétés de diffusion de chaque atome j et dépendent de leur numéro atomique Z .

6.2.3 Traitement des données EXAFS

Une procédure relativement standard permet de convertir les données brutes d'un spectre en oscillations EXAFS $\chi(k)$.

6.2.4 Extraction du signal EXAFS

La première étape consiste à soustraire le fond d'absorption continue avant le seuil $\mu_p(E)$ (due notamment à l'échantillon et au bruit des détecteurs) à l'ensemble du spectre. Pour cela, on modélise souvent $\mu_p(E)$ par une droite.

Ensuite, il s'agit d'extraire le signal EXAFS normalisé en tenant compte de $\mu_p(E)$:

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E) - \mu_p(E)} = \frac{\Delta\mu(E)}{\Delta\mu(E_0)} \quad (6.7)$$

$\Delta\mu(E_0) = \mu_0(E) - \mu_p(E)$ est le saut au seuil d'absorption. L'énergie E_0 du seuil est tabulée mais on la détermine généralement expérimentalement soit au point

d'inflexion au saut d'absorption, soit au maximum de la raie blanche (sa valeur sera ajustée plus tard).

Pour déterminer $\Delta\mu(E)$, on peut extrapoler le fond d'absorption du préseuil jusqu'au domaine EXAFS du spectre, puis le soustraire à l'ensemble du spectre. Cette procédure peut créer des anomalies sur le spectre final. On lui préfère généralement la méthode de normalisation de Lengeler-Eisenberger [Lengeler et Eisenberger, 1980] qui permet d'extraire directement $\chi(E)$: on extrait $\mu_0(E)$ après le seuil avec une fonction polynomiale ou *spline* cubique généralement ; puis, on extrapole $\mu_p(E)$ jusqu'à E_0 pour calculer $\Delta\mu(E_0)$.

Pour la suite du traitement des données on raisonnera généralement en terme de vecteur d'onde du photoélectron k plutôt qu'en énergie :

$$k = \sqrt{\frac{2m_e}{\hbar^2}(E - E_0)} \quad (6.8)$$

si bien que $\chi(k) = \chi[k(E)]$.

Le programme ATHENA [Ravel, 2005] permet d'effectuer l'ensemble de ces opérations.

6.2.5 Transformée de Fourier

Le signal EXAFS extrait du spectre expérimental correspond à la somme des contributions des différentes couches d'atomes autour de l'atome absorbeur. On effectue une première transformée de Fourier (TF) de $\chi(k)$ de l'espace des k vers l'espace des distances R_j . Dans l'équation de l'EXAFS développée par Sayers *et al.* (Eq. 6.6), la fonction $\chi(k)$ est une somme de sinusoides amorties. La TF de $\chi(k)$ permet d'extraire des oscillations de $\chi(k)$ les contributions des sphères de coordination autour de l'atome absorbeur. La fonction $\chi(k)$ est généralement d'abord pondérée d'un facteur k^n ($n = 1, 2$ ou 3) car $\chi(k)$ décroît fortement pour des k croissants du fait des termes d'amortissement liés au libre parcours moyen et au facteur de Debye-Waller. La puissance de k est choisie de manière à renforcer le signal à grand k sans pour autant augmenter l'amplitude du bruit.

Le module de la TF de $k^n\chi(k)$ est une fonction de distribution radiale composée de plusieurs pics à des distances \tilde{R}_j relatives aux différentes couches de coordination de l'atome absorbeur. Leur amplitude est proportionnelle au nombre d'atomes N_j dans chaque sphère de coordination. Les distances \tilde{R}_j ne sont pas les distances interatomiques R_j réelles à cause des termes de déphasage $\varphi_j(R_j, k)$ qui interviennent dans l'équation de $\chi(k)$.

6.2.6 Analyse des données EXAFS

Le but de l'analyse du signal EXAFS est de pouvoir en extraire les constantes N_j et R_j caractéristiques du complexe métallique d'intérêt. On utilise alors des composés

cristallins modèles pour évaluer les paramètres électroniques φ_j , λ et f_j . Ces composés de référence ont une géométrie et une stœchiométrie supposées proches de celle du complexe étudié (nombre et nature des ligands similaires). Le programme FEFF [Rehr et Albers, 2000] permet de calculer *ab initio* les paramètres électroniques f_j et φ_j pour chaque chemin de diffusion possible à partir des coordonnées atomiques d'un composé modèle. Ensuite, connaissant l'amplitude de rétrodiffusion et le déphasage théoriques du composé modèle, on affine de manière itérative les paramètres structuraux puis électroniques spécifiques de chaque sphère de coordination du complexe métallique d'intérêt. Le programme ARTEMIS [Ravel, 2005] permet de réaliser cette procédure d'affinement. Les paramètres que l'on ajuste sont : N_j , R_j , S_0^2 , E_0 et σ_j^2 . La valeur de E_0 est ici affinée car elle avait été déterminée arbitrairement au début du traitement du signal de $\mu(E)$. Au cours de l'ajustement des paramètres sur le signal expérimental, S_0^2 doit s'approcher le plus possible de 1.

Le processus d'affinement des variables est répété jusqu'à ce que la somme des signaux EXAFS affinés pour chaque chemin s'ajuste correctement au signal EXAFS expérimental.

6.3 Mise en œuvre expérimentale

Le signal XAFS est relativement faible comparé aux autres signaux dus aux interactions des rayons X avec l'échantillon. Le flux de photons incidents doit donc être important pour pouvoir le détecter avec un rapport signal/bruit convenable. C'est pourquoi les expériences d'absorption de rayons X nécessitent un rayonnement synchrotron.

Le signal EXAFS est généralement mesuré en transmission (Fig. 6.3a) ou en fluorescence (Fig. 6.3b). Le coefficient d'absorption μ se mesure en enregistrant l'intensité du faisceau avant (I_0) et après avoir traversé l'échantillon (intensité transmise I ou intensité de fluorescence I_F). Le montage expérimental de base est constitué d'un monochromateur et de deux détecteurs placés avant et après l'échantillon. Le monochromateur permet d'obtenir un faisceau incident monochromatique. L'énergie du faisceau est balayée depuis le préseuil jusqu'à plusieurs centaines d'électrons-volts après le seuil d'absorption.

Le signal mesuré en fluorescence inclut non seulement le signal propre au métal étudié suite à l'absorption de photons X, mais aussi les signaux de fluorescence d'autres éléments de l'échantillon, ainsi que la diffusion élastique (Thomson) et inélastique (Compton) de rayons X. On détecte donc le signal dans une fenêtre d'énergie ne comportant que les raies de fluorescence du métal étudié.

Les expériences d'absorption de rayons X ont été réalisées à l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*), Grenoble, sur la ligne de lumière BM30B/FAME. Sur cette ligne, le monochromateur est précédé et suivi de deux miroirs, M1 et M2 (Fig. 6.4).

M1 permet de focaliser le faisceau de rayons X sortant de l'anneau de stockage dans le plan vertical avant d'atteindre le monochromateur. M1 assure la réjection des harmoniques du faisceau de longueur d'onde choisie, et ainsi filtre les longueurs d'onde

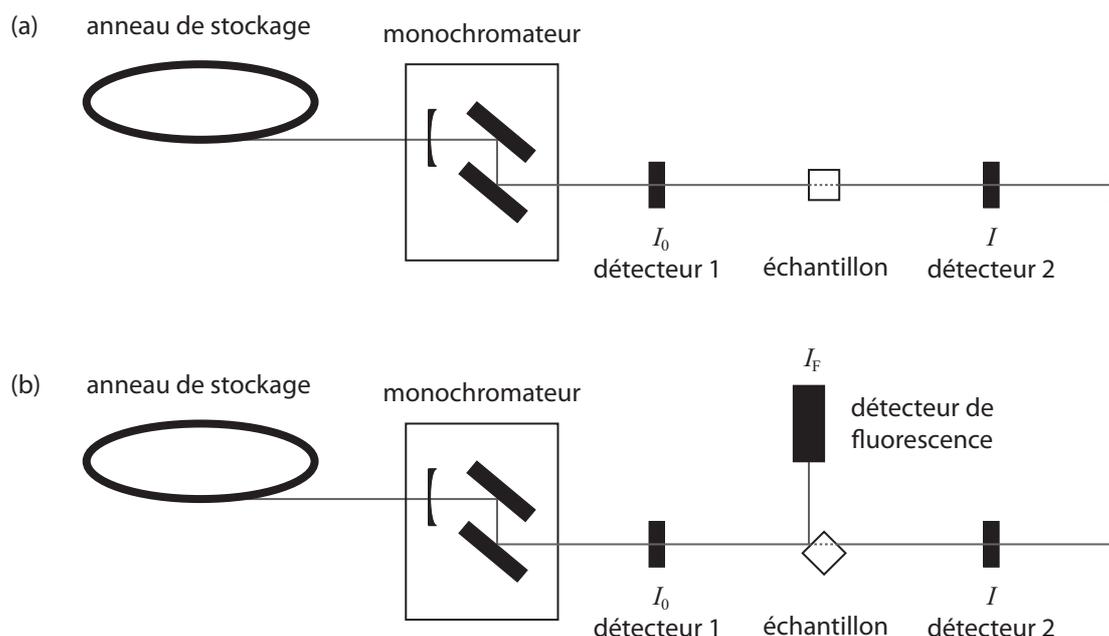


FIG. 6.3 – Montages expérimentaux de la mesure du signal XAFS en transmission (a) et en fluorescence (b). I_0 , I et I_F sont les intensités des faisceau incident, transmis et de fluorescence respectivement.

de haute énergie de sorte à réduire la chaleur créée à la surface des miroirs du monochromateur par les rayons X incidents. M1 est refroidi avec du N_2 liquide. Le principal rôle de M2 est de focaliser dans le plan vertical le faisceau sortant du monochromateur.

Le monochromateur extrait du faisceau polychromatique de rayons X de l'anneau de stockage du synchrotron, un faisceau monochromatique de longueur d'onde ajustable grâce au contrôle de l'inclinaison des deux cristaux qui le composent. Le premier cristal dissipe l'énergie de tous les photons X incidents qui n'ont pas la longueur d'onde désirée. Il est refroidi avec du N_2 liquide. Le second cristal focalise le faisceau dans le plan horizontal.

L'échantillon peut être refroidi avec du N_2 liquide ou du He liquide (qui permet d'abaisser la température jusqu'à environ 10 K) en utilisant un cryostat. Cela réduit le bruit du signal détecté et améliore ainsi sa qualité. le bruit peut être notamment dû aux mouvements des atomes et se retrouve notamment dans le facteur de Debye-Waller σ^2 de l'équation de l'EXAFS.

6.4 Expériences d'absorption de rayons X du $\text{Cu}^{(\text{I})}$

Trois échantillons contenant du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ont été préparés : un mélange glutathion- $\text{Cu}^{(\text{I})}$ (échantillon **A**) et deux solutions d'Atx1- $\text{Cu}^{(\text{I})}$ en absence et en présence de glutathion (échantillons **B** et **C** respectivement).

Tous ces échantillons ont été préparés en réduisant *in situ* le $\text{Cu}^{(\text{II})}$ en $\text{Cu}^{(\text{I})}$ grâce au sulfite de sodium Na_2SO_3 . Les concentrations finales en $\text{Cu}^{(\text{I})}$ dans les solutions

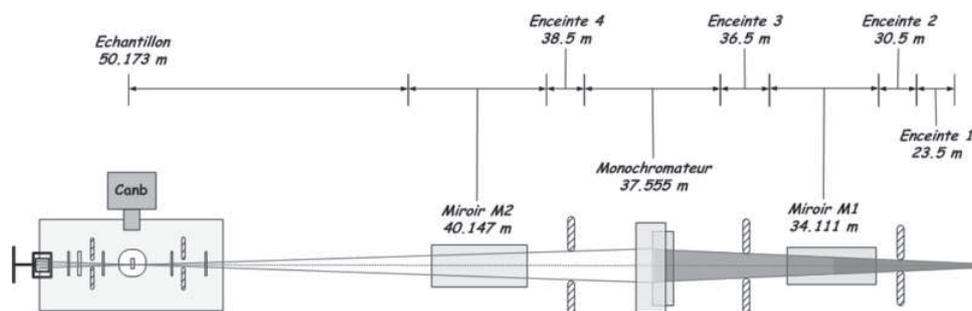


FIG. 6.4 – Schéma technique de la ligne FAME à l'ESRF. *Canb* est le détecteur de fluorescence (http://www.esrf.fr/exp_facilities/BM30B/BM30Bb-en.html).

sont d'environ 1 mM. La concentration en métal est toujours limitante par rapport aux concentrations en glutathion ou en protéine, de telle sorte qu'il n'y a pas de métal libre en solution.

Les expériences d'absorption des RX sont réalisées à moyennement basse température (200 K) pour réduire le bruit dans le signal d'absorption dû à l'agitation thermique. On utilise le glycérol comme cryoprotectant en concentration 20% (v/v) dans les solutions finales.

Les données sont mesurées en transmission pour les composés modèles, et en fluorescence pour les échantillons. Le monochromateur est calibré au seuil K du cuivre à l'aide d'une feuille de cuivre métallique, en utilisant le maximum du spectre d'absorption à 8993.9 eV (première dérivée nulle). L'absorption d'une feuille de cuivre a été enregistrée comme référence entre chaque changement d'échantillon.

Préparation de la solution $Cu^{(I)}$ -glutathion (A)

Na_2SO_3 (1.5 eq en cuivre) est ajouté à une solution de Cu_2SO_4 tamponnée à pH 8.5 par 100 mM EPPS, préalablement mélangée à du glycérol. Le glutathion (noté GSH) est ensuite ajouté dans un rapport Cu:GSH de 1:5. Le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante avant d'être plongé dans le cryostat et de démarrer la mesure.

Préparation des solutions $Cu^{(I)}$ -Atx1 (B) et $Cu^{(I)}$ -Atx1-GSH (C)

Une solution d'apoAtx1 (0.5 mM dans 40 mM MOPS, pH 7.2) est ajoutée à un mélange de Na_2SO_3 (15 mM) et de glycérol (20% v/v) dans un tampon EPPS 330 mM (pH 8.5). $CuSO_4$ est ensuite ajouté (1 Eq en protéine) puis incubé 15 min avant l'acquisition des données. Si du glutathion est nécessaire (échantillon C), il est ajouté avant apoAtx1 (GSH:Atx1 15:1). Sinon, il est remplacé par de l'eau dans la solution finale (échantillon B).

Composés modèles des complexes $Cu^{(I)}$ -thiolates

Trois composés modèles ont été utilisés comme référence des symétries typiques des

sites $\text{Cu}^{(I)}$ (Fig. 6.5). Ces composés ont été conditionnés sous la forme de pastilles à haute pression, dans une matrice de nitrure de bore BN. Il s'agit de :

- $[\text{Et}_4\text{N}][\text{Cu}(\text{SAd})_2]$ (composé modèle **I**) : complexe linéaire avec une symétrie C_2 (AdS^- : adamantane-2-thiolate) [Fujisawa *et al.*, 1998],
- $[\text{Et}_4\text{N}]_2[\text{Cu}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-Cl})_3]$ (**II**) : complexe trigonal plan (symétrie D_{3h}) [Fujisawa *et al.*, 2000],
- $[\text{Cu}(\text{SC}_5\text{H}_5\text{N})_3]_2\text{Cl}_2$ (**III**) : complexe quasi-tétraédrique (symétrie T_d) [Stergioudis *et al.*, 1987].

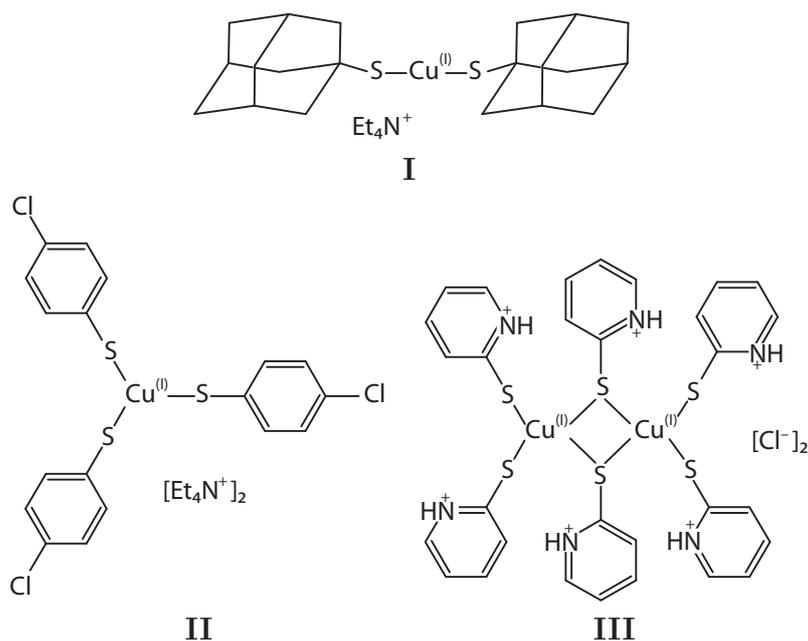


FIG. 6.5 – Complexes modèles $\text{Cu}^{(I)}$ -thiolates utilisés pour les expériences d'absorption des RX.

Troisième partie

Résultats

Chapitre 7

Résultats des Simulations de Dynamique Moléculaire

Sommaire

7.1	Détermination de la phase d'équilibration	89
7.1.1	Stabilité des paramètres de simulation	90
7.1.2	Comportement des protéines simulées	94
7.2	Validation des paramètres du champ de forces du Cu^(I) et du Hg^(II)	113
7.2.1	Cu ^(I) dans CuHah1	113
7.2.2	Hg ^(II) dans HgAtx1	115
7.3	Effets globaux et locaux de la liaison des métaux aux métallochaperones	117
7.3.1	Liaison du Cu ^(I) sur les chaperones à cuivre, Hah1 et Atx1 .	117
7.3.2	Liaison du Hg ^(II) sur une chaperone à mercure, MerP	129
7.3.3	Effet de la nature du métal	135
7.4	La méthionine du motif MTCXXC et le cœur hydrophobe	147
7.4.1	Définition du cœur hydrophobe	147
7.4.2	Propriétés dynamiques et structurales du cœur hydrophobe	148
7.4.3	Mutants M10A et M10S d'Hah1	151
7.5	Interactions entre les boucles L_1, L_3 et L_5 des métallochaperones	158
7.5.1	Interactions entre L_1 , L_3 et L_5 dans Hah1	159
7.5.2	Comparaison avec Atx1 et MerP	163

7.1 Détermination de la phase d'équilibration

Le temps de simulation demeure un problème majeur en dynamique moléculaire. En effet, alors que les positions atomiques et leurs fluctuations sont bien décrites par cette méthode, les propriétés dynamiques du système simulé (corrélations entre des mouvements atomiques) sont souvent mal échantillonnées si bien que différentes

simulations de courte durée (< 1 ns) d'un même système peuvent produire des variations dans les propriétés de déplacements collectifs d'atomes [Clarage *et al.*, 1995].

Il s'agit donc en premier lieu de déterminer pour chaque simulation de dynamique moléculaire, le temps de simulation à partir duquel le système paraît avoir atteint un état stationnaire pendant la phase de production de la simulation. La durée nécessaire pour atteindre cet état est la phase d'équilibration. Les paramètres physiques, structuraux et dynamiques du système sont analysés au cours de la phase de production.

Plusieurs paramètres structuraux et thermodynamiques ont été choisis pour décider si les simulations de dynamique moléculaire sont équilibrées et ont atteint un état stationnaire au cours des cinq dernières nanosecondes, durée définissant dans les simulations présentées ici les phases de production. Ces paramètres sont : la pression, la température, les dimensions de la boîte de simulation, l'énergie du système, ainsi que le RMSD des positions des atomes du squelette peptidique (atomes N, C, O et C_α), par rapport à la structure moyenne de la phase de production et par rapport à la structure expérimentale initiale. Une attention particulière a aussi été prêtée au repliement des protéines pour vérifier qu'elles ne se déplient pas. Bien que la dynamique d'une protéine implique que ses éléments de structure secondaire varient au cours du temps, tant par leur nature que par leur longueur, ce critère s'est révélé extrêmement précieux dans la validation de certaines simulations.

Selon les protéines étudiées, l'équilibration des systèmes s'est révélée plus ou moins longue et difficile. Seules les équilibrations de deux protéines dans leur forme apo, Atx1 (durée totale de la simulation : 26 ns) et Hah1 (durée totale de la simulation : 7 ns) sont exposées ici. Dans le cas d'apoHah1, l'équilibration s'est déroulée sans problème dans les conditions qui sont celles de toutes les protéines (Hah1 et MerP) aussi bien dans leurs formes apo que holo. Concernant Atx1 (apo et holo), elle a nécessité une équilibration plus longue avec un protocole différent.

7.1.1 Stabilité des paramètres de simulation

La température, la pression et la taille de la boîte de simulation sont les trois paramètres qui renseignent sur la stabilité du système. Ils sont directement liés aux contraintes imposées au système du fait du choix de l'ensemble de simulation *NPAT*. Leur stabilité est impérative pour définir si le système a atteint un état stationnaire.

7.1.1.1 Pression

La pression se stabilise très rapidement (vers $t = 1$ ns) autour d'une valeur moyenne nulle : $\langle P \rangle = -0.52$ atm pour apoAtx1 et $\langle P \rangle = -0.54$ atm pour apoHah1 au cours des phases de production. Comme on peut le voir sur la figure 7.1, les variations de la pression s'avèrent néanmoins relativement importantes au cours des simulations avec un écart-type sur les valeurs de la pression d'environ 250-300 atm. Ces valeurs élevées sont dues au fait que pour le calcul de la pression, l'amplitude des forces appliquées

au système est divisée par une surface très petite, celle de la boîte de simulation (d'environ 250 \AA^2).

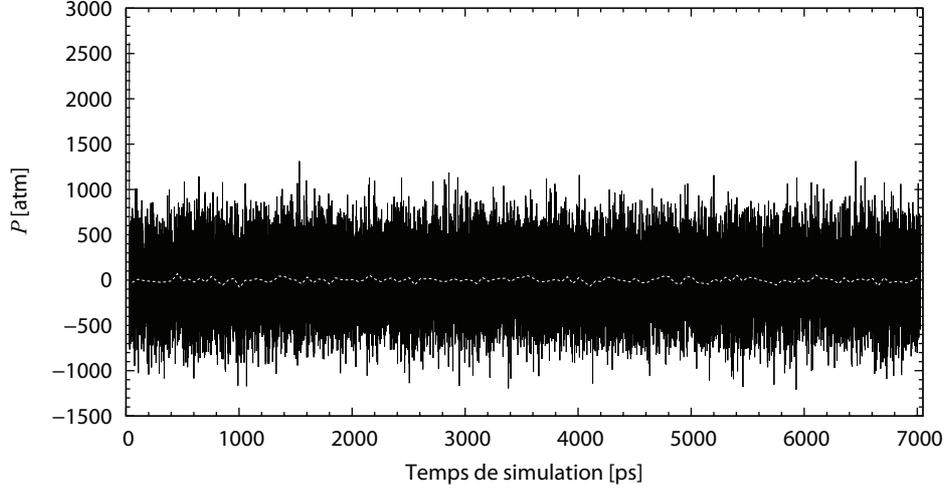


FIG. 7.1 – Evolution temporelle de la pression P dans la boîte de simulation d'apoHah1 (valeurs enregistrées toutes les 0.2 ps lors de la simulation). En traits blancs, les variations de la pression moyenne calculée toutes les 50 ps.

Volume et taille de la boîte de simulation

Lors de l'équilibration dans l'ensemble $NPAT$, le système répond aux conditions de température et de pression en adaptant le volume total V de la boîte de simulation (d'après l'équation $PV \simeq NRT$, R la constante des gaz parfaits). Comme les côtés b et c sont constants au cours des simulations, seule la longueur a du côté de la boîte alignée sur l'axe x varie afin d'ajuster V (cf. §5.4, Fig. 5.13, p. 69). Le système est considéré stable lorsque a ne varie plus de manière importante mais se stabilise autour d'une valeur moyenne. Cela se produit très vite, dès le début de l'équilibration en condition $NPAT$, pour l'ensemble des systèmes. Les variations de a au cours de la simulation d'apoHah1 sont reportées sur la Fig. 7.2.

Les dimensions moyennes des boîtes de simulation d'apoAtx1 et d'apoHah1 au cours des phases de production sont indiquées dans le tableau 7.1. L'écart-type σ_a (l'explication détaillée en est donnée au §5.5.6, p. 73) correspond à la dispersion des données tandis que σ_μ est l'écart-type sur l'ensemble des valeurs des moyennes calculées par intervalle de 50 ps (nommées sous-moyennes). σ_μ renseigne sur les fluctuations de a au cours du temps. Si la valeur de a est plus élevée en début de production qu'à la fin, alors la dispersion des sous-moyennes augmente. A l'inverse, si la simulation est stationnaire, les fluctuations entre chaque intervalle sont faibles (*i.e.* la dispersion des sous-moyennes est faible) et globalement, la moyenne et les sous-moyennes ont des valeurs très proches. Ici, les dispersions σ_μ sont très faibles, démontrant que les simulations atteignent un état stationnaire concernant a . La dispersion des données autour de la moyenne est également faible. Il n'y a donc pas de fluctuations importantes de a .

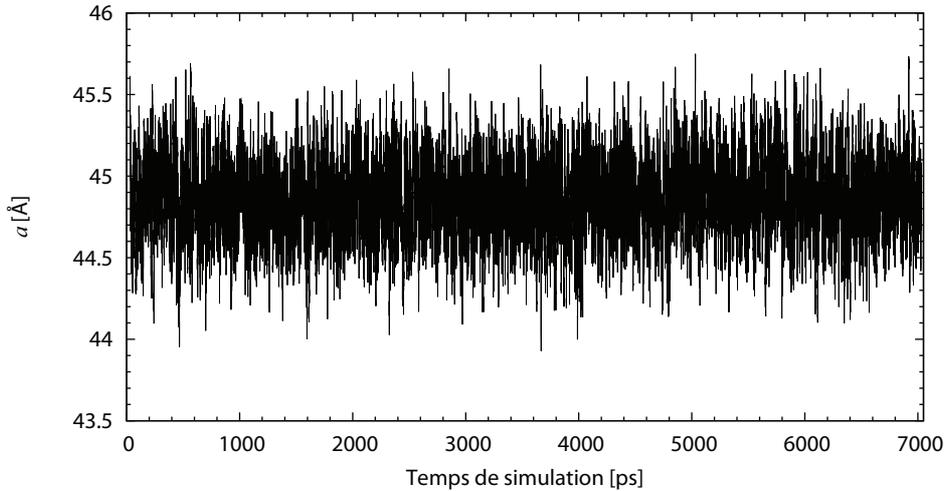


FIG. 7.2 – Evolution temporelle de la dimension a de la boîte de simulation d'apoHah1 (valeurs enregistrées toutes les 0.2 ps lors de la simulation).

Alors qu'Hah1 et Atx1 possèdent des structures similaires, la dimension a de la boîte d'apoAtx1 est plus grande d'environ 15 Å que celle d'apoHah1 ($\langle a \rangle \approx 61$ Å pour apoAtx1 et $\langle a \rangle = 45$ Å pour apoHah1). Atx1 présente en effet une queue en N-terminal (M1, A2 et E3) qui interagit peu avec le reste de la protéine et forme plutôt une protubérance plus ou moins exposée au solvant (d'autant plus que la chaîne latérale de M1 adopte parfois une conformation étendue).

Protéines	a (initialement) [Å]	a (en production) [Å]	b [Å]	c [Å]
apoAtx1	61.347	60.953 $\sigma_d = 0.270$ $\sigma_\mu = 0.008$	48.586	38.629
apoHah1	45.705	44.865 $\sigma_d = 0.236$ $\sigma_\mu = 0.006$	44.335	39.052

TAB. 7.1 – Dimensions moyennes des boîtes de simulation d'apoAtx1 et d'apoHah1.

7.1.1.2 Energies et température

L'évolution de l'énergie totale du système (E_{tot}) au cours du temps constitue un critère efficace pour identifier l'instant à partir duquel le système atteint l'équilibre. Ainsi, pour apoAtx1, E_{tot} s'est stabilisée après environ 15 ns d'équilibration. Pour Hah1, l'équilibration a été plus rapide : environ 1.5 ns avant que E_{tot} n'atteigne une valeur stable (Fig. 7.3).

Les contributions potentielle, U_p , et cinétique, E_c , à E_{tot} ($E_{tot} = U_p + E_c$) sont également intéressantes à vérifier car ces deux termes doivent s'équilibrer pour s'assurer

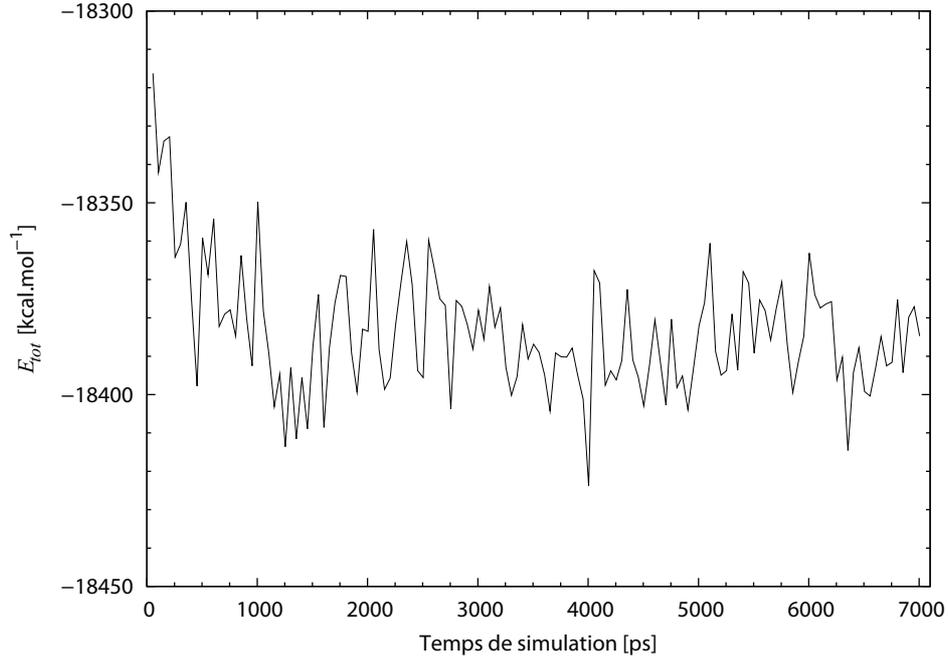


FIG. 7.3 – Evolution temporelle de l'énergie totale du système d'apoHah1. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes calculées toutes les 50 ps.

que la simulation ne diverge pas. Comme l'énergie cinétique dépend de la température (grâce au thermostat de Nosé-Hoover), l'analyse de ce paramètre renseigne directement sur les variations de E_c . Les valeurs moyennes des contributions à E_{tot} au cours de la phase de production sont reportées au tableau 7.2.

La dispersion des valeurs est très faible pour les deux apoprotéines : moins de 0.5% par rapport aux énergies moyennes, et environ 1% par rapport aux températures moyennes. En outre, la dispersion des sous-moyennes s'avère également très réduite. Ces deux informations indiquent indubitablement que les énergies se sont stabilisées et que le système a atteint un état stationnaire.

Protéines	E_{tot} [kcal.mol ⁻¹]	U_p [kcal.mol ⁻¹]	T [K]
apoAtx1	-26 682.2	-33 468.5	300.00
	$\sigma_d = 110.8$	$\sigma_d = 91.4$	$\sigma_d = 2.82$
	$\sigma_\mu = 1.9$	$\sigma_\mu = 1.4$	$\sigma_\mu = 0.01$
apoHah1	-18 386.1	-23 230.2	300.00
	$\sigma_d = 93.8$	$\sigma_d = 77.3$	$\sigma_d = 3.32$
	$\sigma_\mu = 1.2$	$\sigma_\mu = 1.2$	$\sigma_\mu = 0.02$

TAB. 7.2 – Energies et températures moyennes d'apoAtx1 et d'apoHah1 durant les phases de production.

7.1.2 Comportement des protéines simulées

La stabilité des protéines est évaluée en analysant les positions atomiques des conformations générées au cours de la simulation par rapport à une structure de référence. En général, la structure de référence utilisée est une structure résolue expérimentalement par RMN ou par diffraction de rayons X.

7.1.2.1 Simulations d'apoAtx1

Les résultats présentés jusqu'ici pour apoAtx1 ont concerné la simulation de dynamique moléculaire de cette protéine ayant satisfait l'ensemble des critères de stabilité des simulations. Néanmoins, cette simulation – réussie – a fait suite à une succession d'autres simulations d'apoAtx1, toutes infructueuses, ayant amené à modifier le protocole de simulation, mais également à prêter une attention particulière au repliement de la protéine au cours des simulations. Par ailleurs, la nature de la structure initiale s'est avérée déterminante pour la qualité des simulations produites.

• Simulations d'apoAtx1 à partir de la structure de la *Protein Data Bank*

Simulation \mathcal{S}_1

La structure disponible librement pour apoAtx1 sur le site de la PDB, est la structure RMN moyenne dont l'énergie a été minimisée en tenant compte des contraintes expérimentales (structure 1FES) [Arnesano *et al.*, 2001a]. Cette structure a été initialement utilisée comme structure de départ. La simulation de dynamique moléculaire d'apoAtx1 1FES (nommée \mathcal{S}_1) a été effectuée dans les conditions exposées précédemment.

Bien que \mathcal{S}_1 paraisse se stabiliser à partir de $t \approx 6$ ns et soit stationnaire au cours des 5 dernières nanosecondes, après examen des divers paramètres de simulation (Tab. 7.3 et Fig. 7.4), les variations temporelles des RMSD des positions atomiques du squelette peptidique par rapport à la structure RMN 1FES (dont l'énergie a été minimisée avec CHARMM sans aucune contrainte) se révèlent problématiques. En effet, le RMSD tend à augmenter sans se stabiliser avec parfois des sauts de près de 1 Å en moins de 500 ps (Fig. 7.5). Si l'on calcule le RMSD en ne tenant compte que des résidus les moins mobiles (noté RMSD*), le RMSD* se stabilise et fluctue autour d'une valeur moyenne proche de 1.5 Å. Les résidus conservés pour calculer le RMSD* sont ceux dont le RMSF de l'atome C_α est inférieur à 1.5 Å sur l'ensemble de la simulation. Les résidus exclus du calcul sont les résidus 1, 2, 14-19, 40-41 et 70-73. Cette méthode est similaire à celle qui consiste à ne conserver que les aminoacides des structures secondaires pour évaluer le RMSD, mais présente l'avantage de ne pas être sensible à la perte éventuelle d'éléments de structure secondaire.

De surcroît, l'évolution des éléments de structure secondaire d'apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_1 (Fig. 7.6) avec le programme STRIDE [Frishman et Argos, 1995], suggère que la protéine perd son brin β_4 à partir de $t \approx 9$ ns. Le réseau de liaisons hydrogène entre les brins β_1 et β_4 s'affaiblit, puis s'effondre presque quand $t > 9$ ns, comme le montre

Simulations	E_{tot} [kcal.mol ⁻¹]	U_p [kcal.mol ⁻¹]	T [K]
\mathcal{S}_1	-26 664.2	-33 445.1	300.00
	$\sigma_d = 112.2$	$\sigma_d = 91.8$	$\sigma_d = 2.83$
	$\sigma_\mu = 1.7$	$\sigma_\mu = 1.5$	$\sigma_\mu = 0.02$
\mathcal{S}_2	-26 655.3	-33 436.3	300.00
	$\sigma_d = 111.1$	$\sigma_d = 90.6$	$\sigma_d = 2.84$
	$\sigma_\mu = 1.6$	$\sigma_\mu = 1.3$	$\sigma_\mu = 0.02$

TAB. 7.3 – Energies et températures moyennes d'apoAtx1 au cours des 5 dernières nanosecondes de \mathcal{S}_1 et \mathcal{S}_2 .

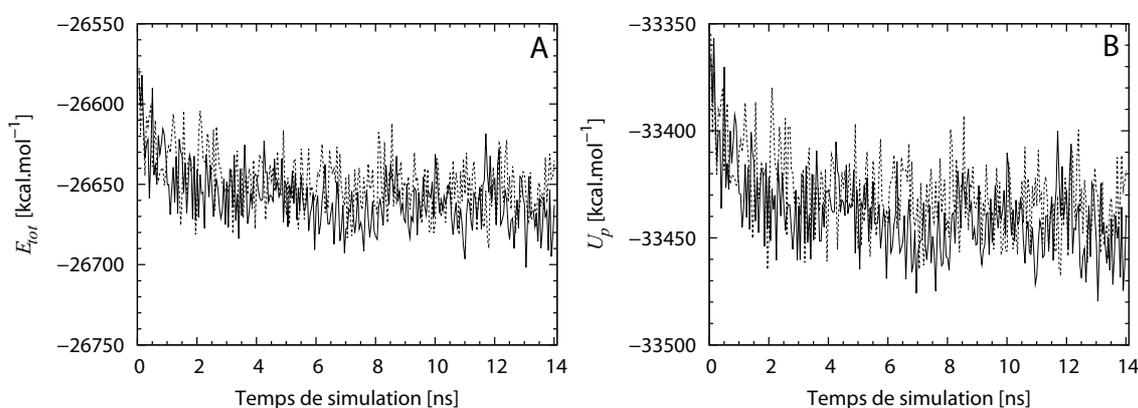


FIG. 7.4 – Evolution temporelle des énergies totales (A) et potentielles (B) d'apoAtx1 au cours des simulations \mathcal{S}_1 (—) et \mathcal{S}_2 (.....). Les valeurs représentées correspondent aux moyennes calculées toutes les 50 ps.

la figure 7.7. Progressivement, β_4 se désolidarise du feuillet β : la protéine semble se déplier par son extrémité C-terminale. Les liaisons hydrogène les plus proches de l'extrémité C-terminale (à savoir les liaisons $O^{V8} \dots H - N^{K71}$, $O^{K71} \dots H - N^{V8}$ et $O^{S69} \dots H - N^{N10}$) disparaissent, et seule la liaison $O^{N10} \dots H - N^{R68}$ parvient à se maintenir tout au long de \mathcal{S}_1 . Les liaisons hydrogène perdues entre les atomes O et N du squelette peptidique sont partiellement remplacées par des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau pontantes entre β_1 et β_4 (liaisons de type $O \dots H_w - O_w \dots H - N$).

Simulation \mathcal{S}_2

Afin de vérifier que l'instabilité du feuillet β d'apoAtx1 dans \mathcal{S}_1 n'est pas due aux conditions initiales, une deuxième simulation de dynamique moléculaire (\mathcal{S}_2) a été réalisée avec une semence différente pour la génération des vitesses atomiques initiales.

Comme le montrent le tableau 7.3 (p. 95) et la figure 7.4 (p. 95), \mathcal{S}_2 paraît *a priori* stabilisée dès 5 ns de simulation. Malheureusement, là encore, les valeurs des RMSD par rapport à la structure RMN 1FES ne se stabilisent pas et augmentent de façon continue tout au long de \mathcal{S}_2 pour atteindre environ 3 Å en fin de simulation ($t = 14$ ns). Au même titre que \mathcal{S}_1 , \mathcal{S}_2 n'est donc pas non plus satisfaisante.

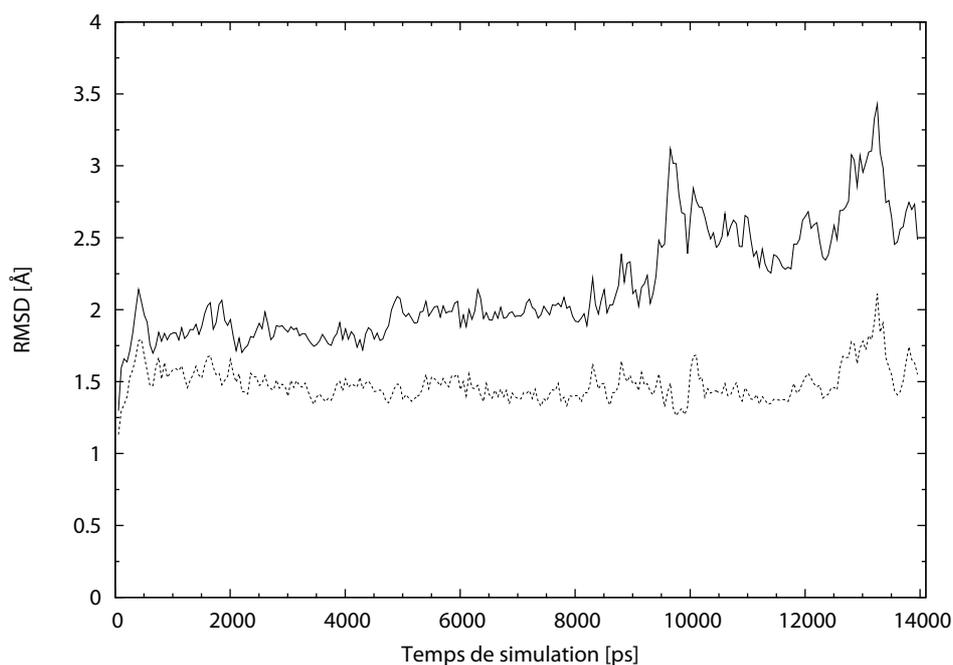


FIG. 7.5 – Evolutions temporelles des RMSD au cours de la simulation \mathcal{S}_1 d'apoAtx1. (—) RMSD par rapport à la structure RMN 1FES des positions atomiques du squelette peptidique. (.....) RMSD par rapport à la structure RMN 1FES des positions des atomes du squelette peptidique des résidus dont le RMSF de l'atome C_α est inférieur à 1.5 \AA (RMSD*).

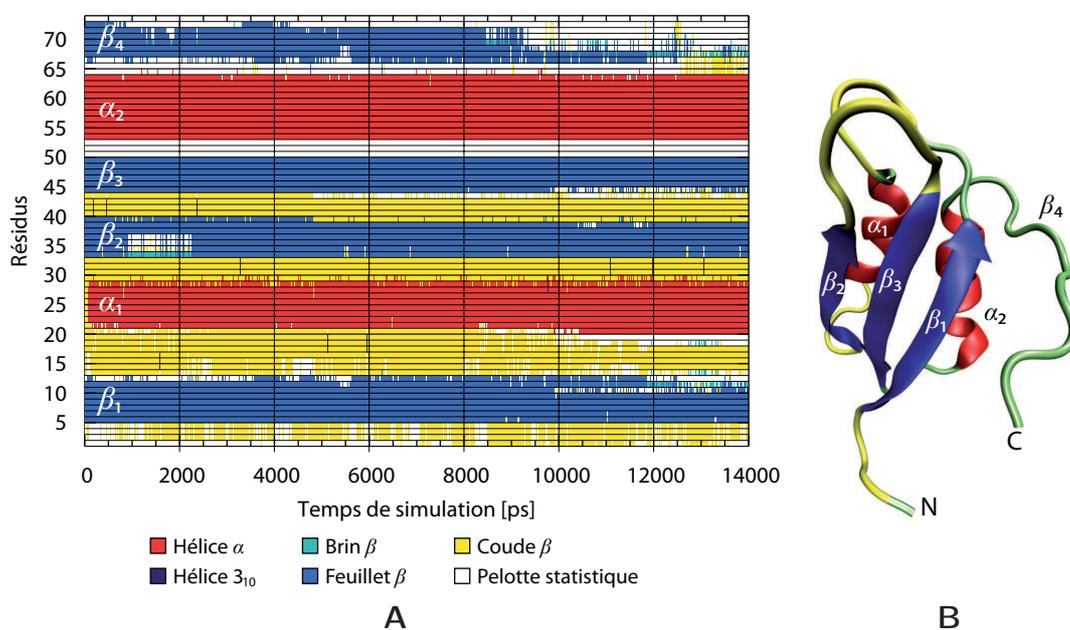


FIG. 7.6 – (A) Evolution temporelle des éléments de structure secondaire d'apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_1 . Les éléments de structures secondaires β_1 , α_1 , β_2 , β_3 , α_2 et β_4 sont indiqués à gauche sur le graphique. (B) Structure d'apoAtx1 à la fin de \mathcal{S}_1 . L'emplacement du brin natif β_4 est indiqué bien qu'il ait disparu en fin de simulation.

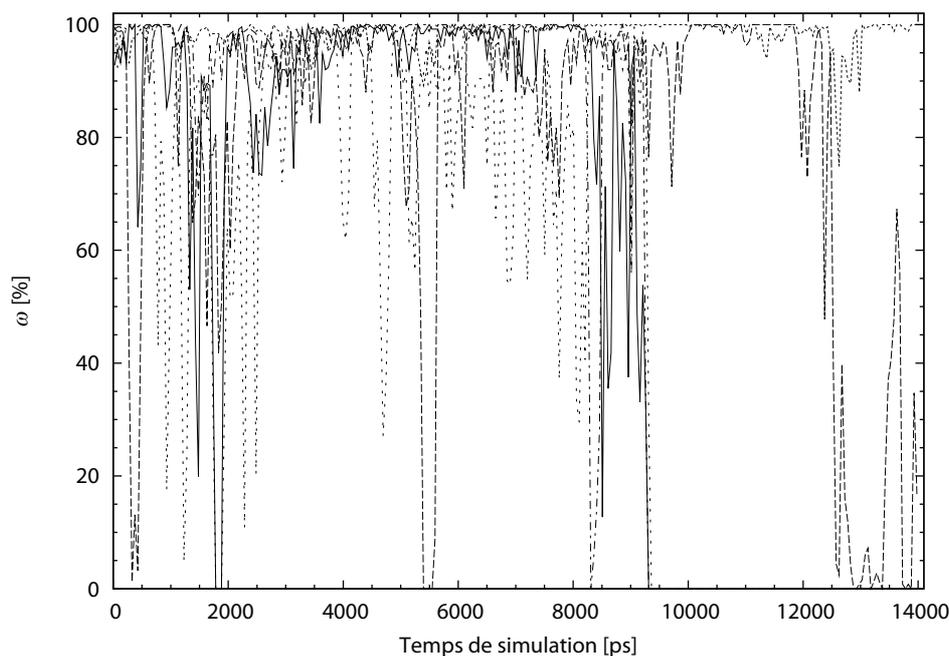


FIG. 7.7 – Evolutions des probabilités de formation (ω) des liaisons hydrogènes entre les brins β_1 et β_4 d'apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_1 . (—) Liaison hydrogène $O^{V8} \dots H - N^{K71}$. (.....) Liaison hydrogène $O^{N10} \dots H - N^{R68}$. (---) Liaison hydrogène $O^{E66} \dots H - N^{V12}$. (---) Liaison hydrogène $O^{S69} \dots H - N^{N10}$. (···) Liaison hydrogène $O^{K71} \dots H - N^{Q8}$. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes calculées toutes les 50 ps.

• Simulations d'apoAtx1 à partir d'une structure expérimentale

Etant donné que la structure initiale 1FES utilisée pour \mathcal{S}_1 et \mathcal{S}_2 est une structure moyenne de la famille de conformations déterminées par RMN, la signification physique de cette structure peut être sujette à quelques réserves. Nous nous sommes donc procuré les structures résolues expérimentalement (appelées 1FES^{exp}) auprès de F. Arnesano (*Centro Risonanze Magnetiche*, Université de Florence, Italie).

La structure 1FES est la moyenne d'une famille de 35 conformations. Le repliement de chacune d'entre elles est reporté sur la figure 7.8. Le repliement général d'apoAtx1 est identifié ainsi [Arnesano *et al.*, 2001a] :

$$\begin{array}{ll}
 \beta_1 : \text{résidus } 5-12 & \beta_3 : \text{résidus } 44-49 \\
 \alpha_1 : \text{résidus } 21-28 & \alpha_2 : \text{résidus } 52-63 \\
 \beta_2 : \text{résidus } 33-39 & \beta_4 : \text{résidus } 66-73
 \end{array}$$

Dans trois conformations (les 15^e, 17^e et 29^e), l'hélice α_1 est remplacée par une hélice de type 3_{10} . Dans une autre (la 33^e), la protéine ne présente pas d'hélice entre les brins β_1 et β_3 . L'hélice α_1 se révèle ainsi le seul élément de structure secondaire variable, suggérant une certaine mobilité des aminoacides 21 à 28.

Simulation \mathcal{S}_3

Une nouvelle simulation de dynamique moléculaire à partir de la première structure expérimentale du fichier PDB envoyé par F. Arnesano (simulation \mathcal{S}_3 ,

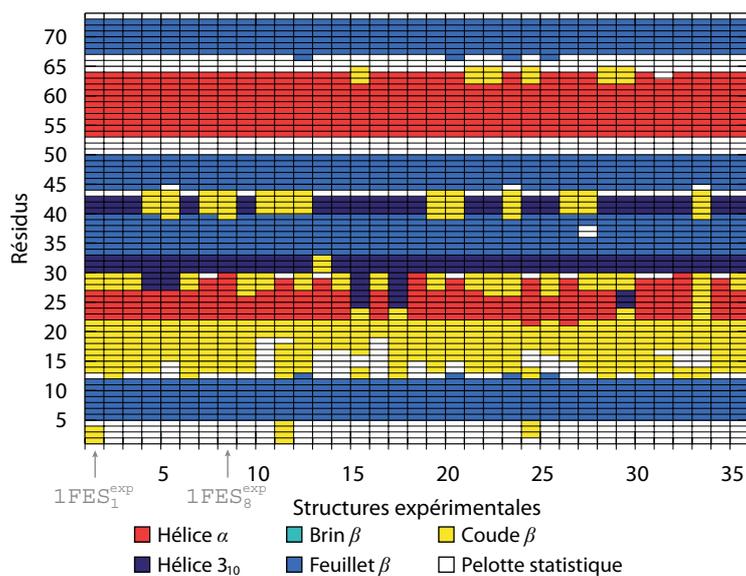


FIG. 7.8 – Structures secondaires des 35 conformations expérimentales d’apoAtx1 $1FES^{exp}$ résolues par Arnesano *et al.*. La position des conformères $1FES_1^{exp}$ et $1FES_8^{exp}$ sont indiqués sous le graphique. [Arnesano *et al.*, 2001a]

structure initiale $1FES_1^{exp}$) a été conduite. Les paramètres de simulation de \mathcal{S}_3 sont identiques à ceux de \mathcal{S}_1 .

Le brin β_4 montre également une instabilité marquée et la protéine tend à se déplier par son extrémité C-terminale d’une façon similaire observée pour \mathcal{S}_1 . Le comportement relativement labile des liaisons hydrogène entre β_1 et β_4 apparaît d’autant plus surprenant que β_4 est bien défini entre les résidus 67 à 72 pour les 35 conformations expérimentales.

Simulation \mathcal{S}_4

Une nouvelle simulation, identique à \mathcal{S}_3 , a été réalisée en présence de contraintes de distance de type NOE. En effet, afin de s’assurer que les brins β_1 et β_4 ne s’éloignent pas l’un de l’autre et qu’aucune molécule d’eau ne surgisse entre eux, il a été imposé aux atomes O et N de Q8 et K71 de rester proches grâce à des contraintes de type NOE.

Les deux liaisons hydrogène entre ces résidus s’avèrent les plus instables et les premières à s’effondrer pour $t > 9$ ns au cours de \mathcal{S}_1 (Fig. 7.7), mais également au cours de \mathcal{S}_3 où leur probabilité de formation se révèle très variable (Fig. 7.9).

Ainsi, lors de la simulation \mathcal{S}_1 , les distances entre les atomes O et les protons du squelette peptidique de ces deux résidus augmentent brusquement peu après 9 ns de simulation et signent la perte des liaisons hydrogène (Fig. 7.10).

Des contraintes de distance entre ces deux résidus empêchent le dépliement du

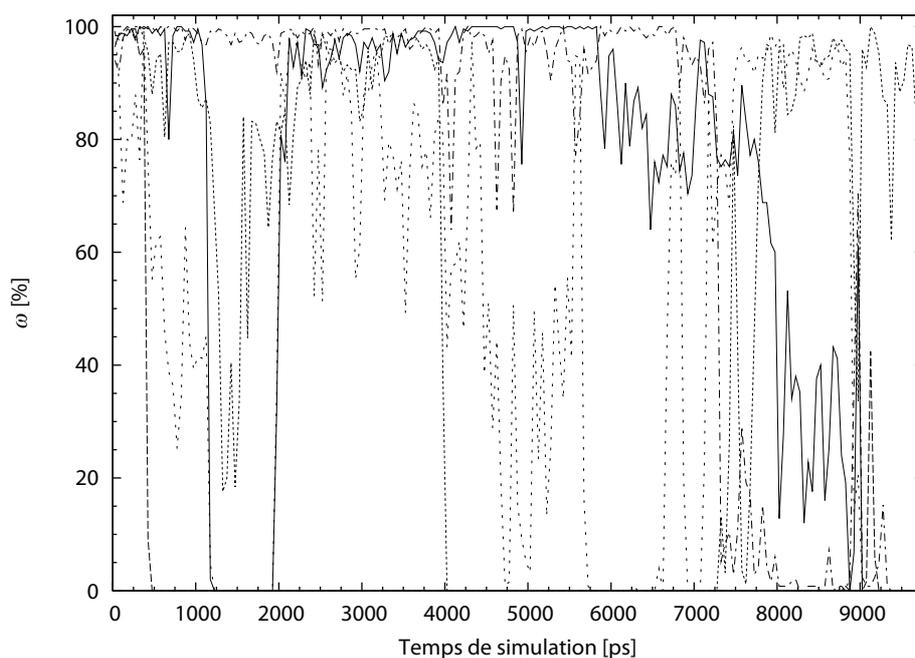


FIG. 7.9 – Evolutions des probabilités de formation (ω) des liaisons hydrogènes entre les brins β_1 et β_4 d'apoA1 au cours de S_3 . (—) Liaison hydrogène $O^{V8} \dots H - N^{K71}$. (.....) Liaison hydrogène $O^{N10} \dots H - N^{R68}$. (---) Liaison hydrogène $O^{E66} \dots H - N^{V12}$. (---) Liaison hydrogène $O^{S69} \dots H - N^{N10}$. (· · ·) Liaison hydrogène $O^{K71} \dots H - N^{Q8}$. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes calculées toutes les 50 ps.

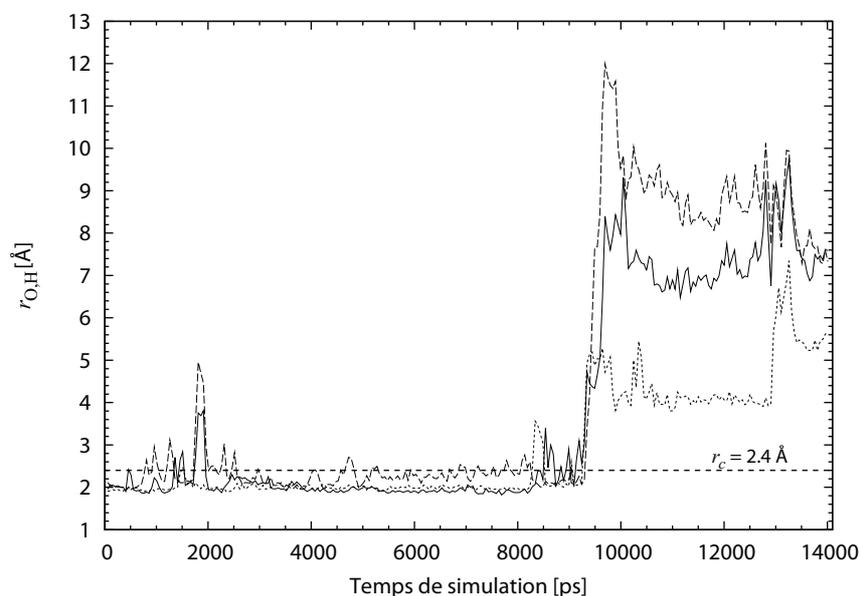


FIG. 7.10 – Evolution des distances entre les atomes O et H du squelette peptidique de certains résidus des brins β_1 et β_4 au cours de S_1 . (—) Distance entre O^{Q8} et H^{K71} . (.....) Distance entre O^{S69} et H^{N10} . (---) Distance entre O^{K71} et H^{Q8} . La distance $r_c = 2.4 \text{ \AA}$ est la distance maximale autorisée entre le proton et l'atome O selon la définition des liaisons hydrogène du §5.5.3 (p. 71). Les valeurs représentées correspondent aux moyennes calculées toutes les 50 ps.

feuille β . Les deux contraintes de type NOE sont appliquées aux paires d'atomes (O^{Q8}, H^{K71}) et (O^{K71}, H^{Q8}) par le biais de potentiels semi-harmoniques afin que la distance $r_{O,H}$ demeure inférieure à la distance maximale autorisée $r_{O,H}^{\max} = 3 \text{ \AA}$, associée à une constante de force $k^{\max} = 100 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$. Une constante de force aussi élevée permet de créer une forte force de rappel si un des deux atomes de chaque paire s'éloigne au-delà de 3 \AA de son partenaire.

Tout au long de \mathcal{S}_4 , le brin β_4 est correctement maintenu au reste du feuillet β et les contraintes de type NOE agissent très peu, respectivement 0.43% et 0.05% du temps pour les NOE (O^{Q8}, H^{K71}) et (O^{K71}, H^{Q8}). Cependant, la protéine perd très rapidement sa première hélice α (en 100 ps environ). Bien que 4 structures sur les 35 que comptent $1FES^{\text{exp}}$ ne possèdent pas d'hélice α_1 , il a été décidé d'arrêter cette simulation au bout de 1.4 ns de dynamique moléculaire plutôt que de la prolonger dans l'attente que l'hélice α_1 se rétablisse. Si la structuration en coude β ou en hélice 3_{10} avait persisté, le repliement d'apoAtx1 ne serait plus «canonique» comparé à celui de la famille des métallochaperones à laquelle appartient Atx1. En outre, statistiquement, seule une conformation sur les 35 de $1FES^{\text{exp}}$ présente un repliement $\beta\beta\beta\alpha\beta$. La simulation \mathcal{S}_4 aurait perdu alors en représentativité de la dynamique des atomes d'apoAtx1.

Simulation \mathcal{S}_5

ApoAtx1 semble désormais se caractériser par une certaine instabilité intrinsèque de son repliement. Les quatre simulations déjà effectuées sur cette protéine, ont montré que le brin β_4 et l'hélice α_1 sont particulièrement labiles, même sur des temps de simulation relativement courts. Sur la figure 7.8 (p. 98), on constate que la longueur de α_1 peut varier du simple au double.

Une nouvelle simulation d'apoAtx1 (\mathcal{S}_5) a été réalisée partir de la structure $1FES_8^{\text{exp}}$ dont l'hélice α_1 est assez longue (résidus 22-29). Les contraintes de type NOE entre les brins β_1 et β_4 sont maintenues avec les mêmes caractéristiques. L'ensemble des paramètres de simulation est identique à celui de \mathcal{S}_4 .

Cette simulation satisfait l'ensemble des critères de stabilité défini auparavant. Les énergies totale et potentielle d'apoAtx1 \mathcal{S}_5 se stabilisent après une relativement longue équilibration (environ 15 ns) comme le montre la figure 7.11. Les valeurs moyennes de a , E_{tot} , U_p et T au cours des 5 dernières nanosecondes (phase de production) sont indiqués dans les tableaux 7.1 et 7.2 (pages 92 et 93).

Le repliement de la protéine est conservé tout au long de \mathcal{S}_5 , sans que le brin β_4 ne change de taille (Fig. 7.12).

L'hélice α_1 s'avère être l'élément de structure secondaire le plus variable et explore presque toutes les conformations présentes dans $1FES^{\text{exp}}$. Les résidus de la boucle L_2 entre α_1 et β_2 paraissent plus ou moins structurés en hélice 3_{10} , même si cette dernière semble très labile. Le brin β_2 ne s'est stabilisé qu'après 12 ns environ de simulation. Enfin, l'hélice α_1 est parfois remplacée par une hélice π qui s'étend souvent du résidu 24 au résidu 28. Les éléments de structure secondaire trouvés sont répertoriés dans le tableau 7.4. L'accord avec la structure expérimentale $1FES_8^{\text{exp}}$ est excellent. Les résidus

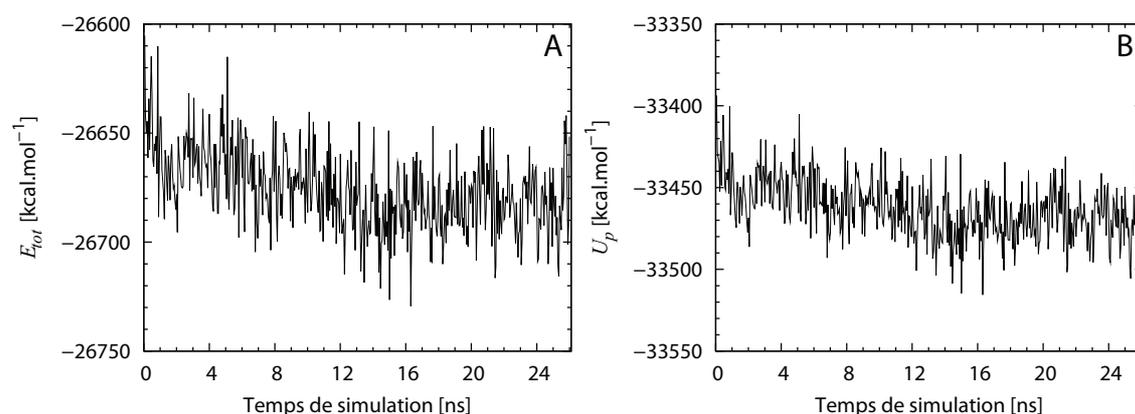


FIG. 7.11 – Evolution temporelle des énergies totales (A) et potentielles (B) d'apoAtx1 au cours de la simulation S_5 . Les valeurs représentées correspondent aux moyennes calculées toutes les 50 ps.

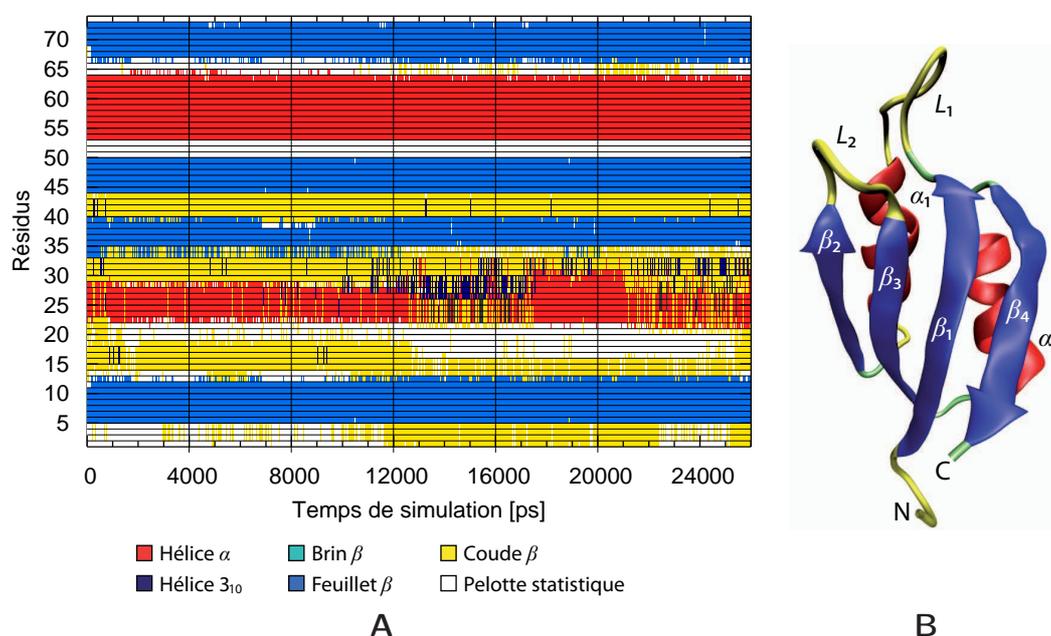


FIG. 7.12 – (A) Evolution temporelle des éléments de structure secondaire d'apoAtx1 au cours de S_5 . (B) Structure d'apoAtx1 à la fin de S_5 .

30-32 se replie environ 30% du temps en hélice 3_{10} . Cela est également fréquemment observée dans les structures expérimentales $1FES^{exp}$.

La variation des RMSD par rapport à la structure initiale ($1FES_8^{exp}$) reportée sur la figure 7.13, se révèle aussi satisfaisante. Le RMSD calculé sur la totalité des résidus augmente très vite à plus de 3.5 Å par rapport à la structure initiale $1FES_8^{exp}$. Il croît continuellement pendant les 14 premières nanosecondes, puis se stabilise à environ 3.7 Å. Le RMSD* par rapport à $1FES_8^{exp}$ prend quant à lui des valeurs près de deux fois inférieures au RMSD. Les résidus exclus pour son calcul sont les aminoacides 1-2, 14-27 et 30-32, ce qui correspond approximativement à tout le segment L_1 - α_1 - L_2 d'apoAtx1. Les variations du RMSD* sont moins importantes que celles du RMSD et se stabilisent aussi à $t \approx 14$ ns.

Eléments de structure secondaire	\mathcal{S}_5	$1\text{FES}_8^{\text{exp}}$
β_1	5-12	5-11
α_1	22-26	22-29
β_2	35-39	33-38
β_3	44-49	44-49
α_2	53-63	53-63
β_4	66-72	67-72

TAB. 7.4 – Eléments de structure secondaire d'apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_5 et de la structure $1\text{FES}_8^{\text{exp}}$.

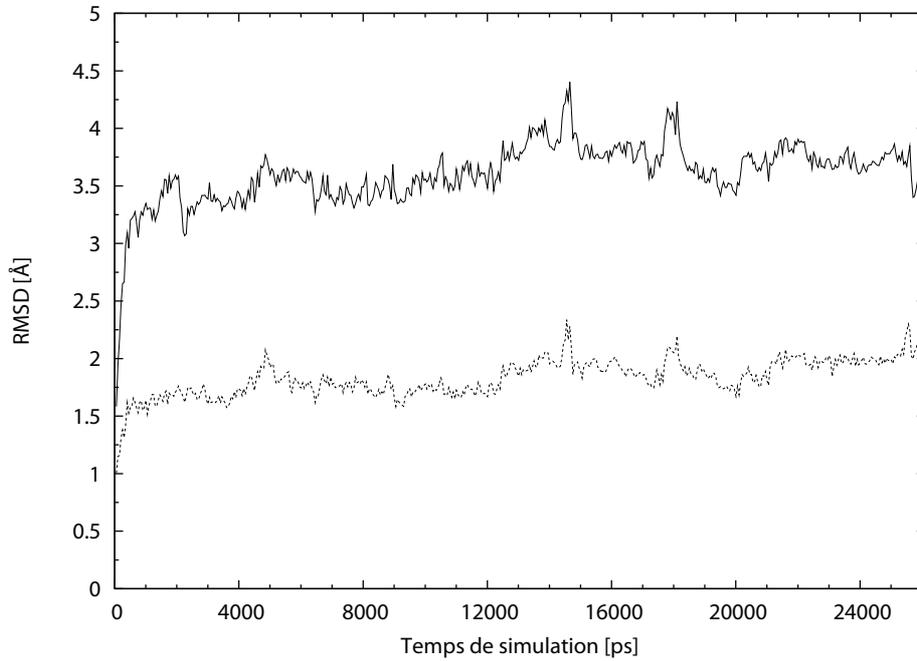


FIG. 7.13 – Evolution temporelle des RMSD par rapport à la structure initiale $1\text{FES}_8^{\text{exp}}$ des positions atomiques du squelette peptidique au cours de la simulation \mathcal{S}_5 d'apoAtx1. (—) RMSD calculé sur l'ensemble des résidus. (.....) RMSD* calculé en excluant les résidus 1-2, 14-27 et 30-32.

L'évolution des RMSD par rapport à la structure moyenne de la phase de production (dont l'énergie a été minimisée) est aussi largement dépendante des mouvements des résidus 1-2, 14-27 et 30-32 (Fig 7.14). L'emploi de cette structure moyenne comme référence pour le calcul des RMSD permet de vérifier que la protéine ne subit pas d'importants changements conformationnels une fois la simulation équilibrée, avec un RMSD moyen d'environ 0.7 Å lors de la simulation de production. En outre, les variations du RMSD* par rapport à la structure moyenne de la phase de production indiquent directement si les changements conformationnels qui interviennent concernent l'ensemble de la protéine ou non. Ainsi, le RMSD* se stabilise dès $t \approx 14$ ns de simulation (Fig. 7.14) tandis que le RMSD connaît d'importants sauts, même en fin de phase de production dûs aux mouvements de L_1 - α_1 - L_2 .

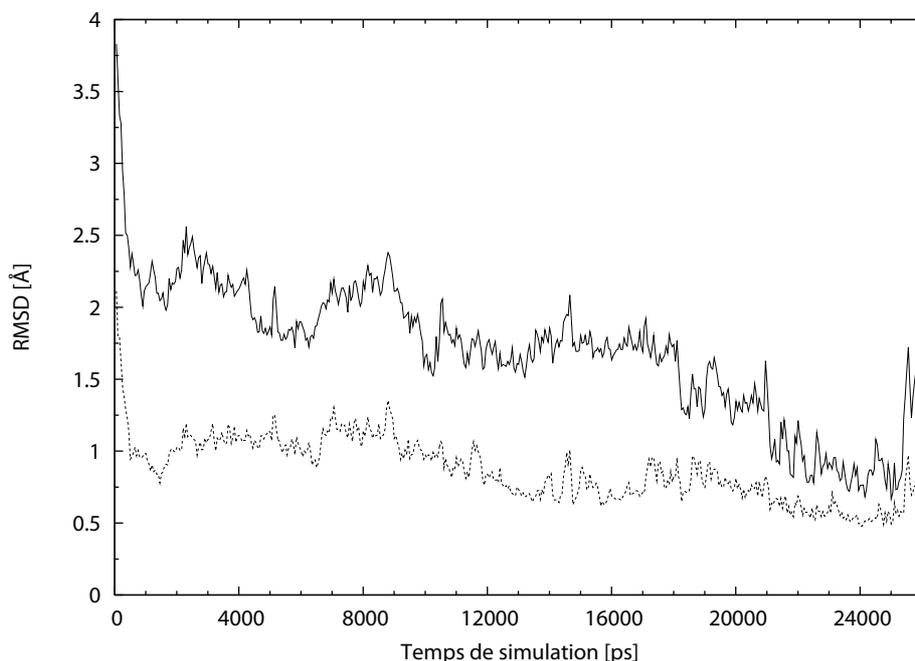


FIG. 7.14 – Evolution temporelle des RMSD par rapport à la structure moyenne de la phase de production des positions atomiques du squelette peptidique au cours de la simulation \mathcal{S}_5 d'apoAtx1. (—) RMSD calculé sur l'ensemble des résidus. (.....) RMSD* calculé en excluant les résidus 1-2, 14-27 et 30-32.

► Validation des contraintes de type NOE

Afin de vérifier un effet éventuel trop important des contraintes de type NOE sur la structure et la dynamique d'apoAtx1 au cours de \mathcal{S}_5 , qui biaiserait inévitablement les résultats, l'incidence des contraintes de type NOE au cours de \mathcal{S}_5 a été étudiée (Tab. 7.5). Les fréquences de violation des NOE s'avèrent extrêmement faibles aussi bien au cours de l'ensemble de la simulation \mathcal{S}_5 que durant la seule phase de production (\mathcal{S}_{5P}).

Contraintes NOE	Simulation \mathcal{S}_5			Simulation \mathcal{S}_{5P}		
	f_{NOE} [%]	$r_{\text{O,H}}$ [Å]	E_{NOE} [kcal.mol ⁻¹]	f_{NOE} [%]	$r_{\text{O,H}}$ [Å]	E_{NOE} [kcal.mol ⁻¹]
(O ^{Q8} ,H ^{K71})	0.08	1.91 ± 0.38	0.00 ± 0.04	0.14	1.95 ± 0.46	0.00 ± 0.06
(O ^{K71} ,H ^{Q8})	0.10	1.99 ± 0.49	0.01 ± 0.09	0.02	1.85 ± 0.55	0.01 ± 0.11

TAB. 7.5 – Effet des contraintes de type NOE sur les atomes (O^{Q8},H^{K71}) et (O^{K71},H^{Q8}) d'apoAtx1 au cours de la simulation \mathcal{S}_5 . \mathcal{S}_{5P} est la simulation de production de \mathcal{S}_5 correspondant aux 5 dernières nanosecondes de simulation. f_{NOE} est la fréquence de violation des NOE ; $r_{\text{O,H}}$ est la distance entre les atomes O et H de chaque paire d'atomes contraints ; E_{NOE} est l'énergie de violation des contraintes de type NOE. Les valeurs moyennes de $r_{\text{O,H}}$ et E_{NOE} sont accompagnées des dispersions des données autour de la moyenne (σ_d).

Cependant, la figure 7.15 montre que l'action des contraintes est plutôt réduite

dans le temps car les distances entre les atomes des paires (O^{Q8}, H^{K71}) et (O^{K71}, H^{Q8}) ne dépassent pas souvent 3 Å. Ainsi, la contrainte de type NOE entre O^{Q8} et H^{K71} agit essentiellement à $t = 11.2$ ns et $t = 23$ ns de simulation pour empêcher les deux atomes de se séparer. La liaison hydrogène entre ces deux atomes est d'ailleurs la première à s'effondrer au cours de \mathcal{S}_1 . La seconde contrainte entre O^{K71} et H^{Q8} a une action assez uniforme au cours de l'équilibration mais presque nulle durant la production. La période entre 11 et 12 ns semble cruciale car les deux contraintes ont une action assez forte et de concert. Sans leur présence, il semble fort probable que le brin β_4 aurait commencé à se déplier. L'équilibre entre les atomes O^{Q8} et H^{K71} demeure relativement instable puisqu'à $t = 23$ ns, la distance interatomique augmente à nouveau.

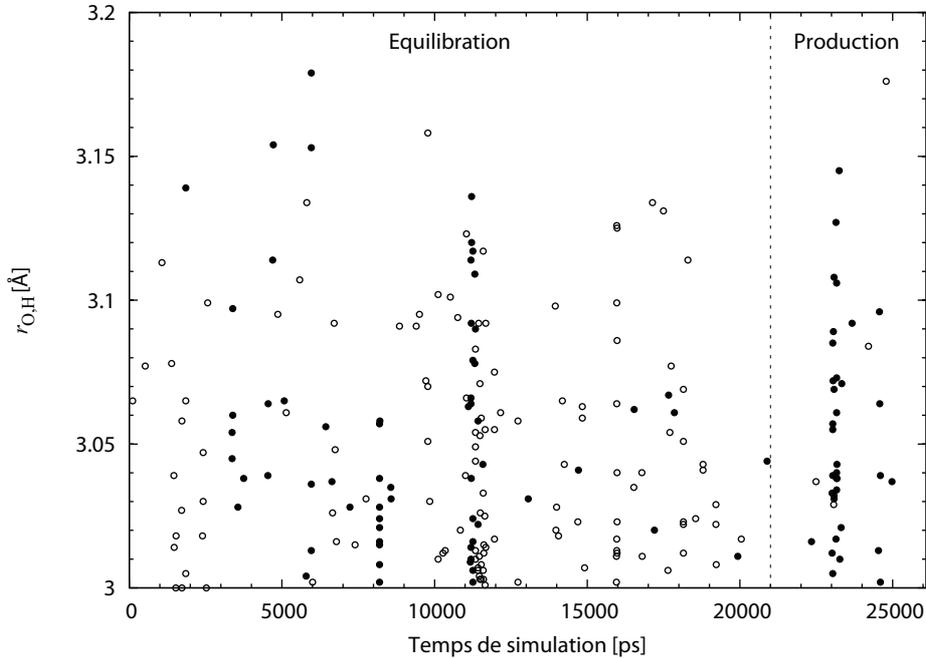


FIG. 7.15 – Action des contraintes de type NOE entre les atomes O^{Q8} et H^{K71} (\bullet), et O^{K71} et H^{Q8} (\circ) au cours de \mathcal{S}_5 quand la distance $r_{O,H}$ est supérieure à 3 Å.

En outre, la dynamique de la protéine ne semble pas affectée par les contraintes de type NOE comme le montre la figure 7.16. Les RMSF des atomes C_α calculés sur la phase de production de \mathcal{S}_5 se superposent très bien avec ceux évalués à partir des 35 structures expérimentales $1FES^{exp}$. C'est d'autant plus vrai pour les C_α des résidus des éléments de structure secondaire, indiquant une mobilité moindre comparée à celles des résidus des boucles, notamment ceux de la boucle L_1 où la flexibilité est remarquable. La dynamique du brin β_4 apparaît toutefois plus limitée au cours de \mathcal{S}_{5P} par rapport à celle trouvée pour les conformères expérimentaux (essentiellement pour les résidus 68 et 69), probablement en raison des contraintes de type NOE. Pourtant, la mobilité de Q8 n'est pas changée. Cela suppose que l'effet des deux contraintes de distance de type NOE est local, et principalement ressenti par le brin β_4 pour qu'il reste solidaire de β_1 .

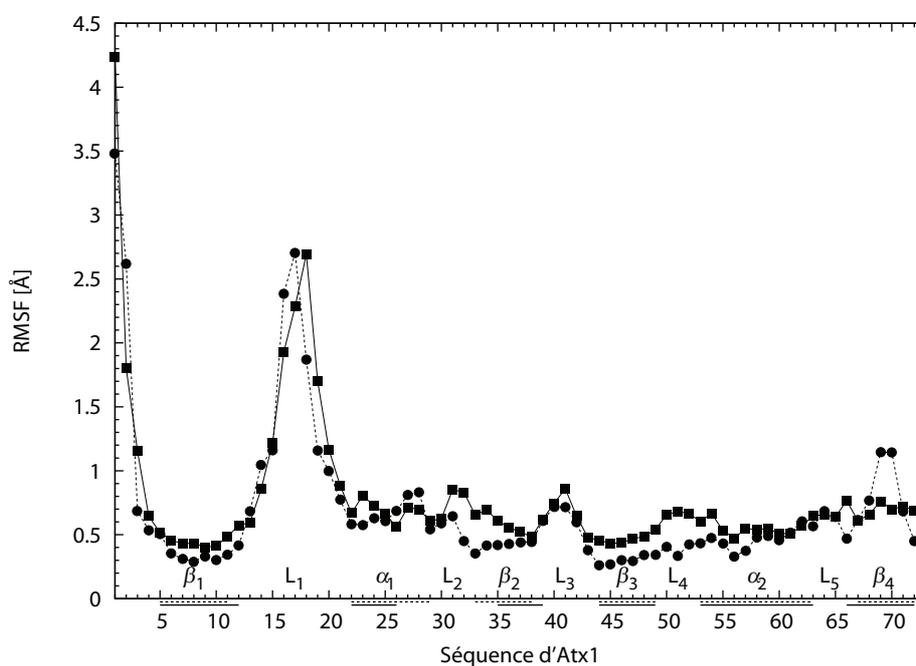


FIG. 7.16 – RMSF des atomes C_{α} des résidus d'apoAtx1 au cours de la phase de production de \mathcal{S}_5 (■) et pour les 35 structures expérimentales 1FES^{exp} (●). Les traits horizontaux sous le graphique indiquent les régions repliées en hélices α et en brins β , la nature des éléments de structure secondaire leur correspondant est précisée au-dessus. Les boucles (L_1 , L_2 , L_3 , L_4 et L_5) sont également identifiées.

Quelles conditions de simulation pour apoAtx1 ?

La simulation \mathcal{S}_5 d'apoAtx1 se révèle équilibrée et stationnaire, en satisfaisant l'ensemble des critères de stabilité. Cette simulation sera retenue par la suite pour l'étude dynamique et structurale d'apoAtx1. Par conséquent, tout commentaire au sujet d'apoAtx1 par la suite se référera implicitement et uniquement à la simulation \mathcal{S}_5 .

Bien que \mathcal{S}_5 soit une dynamique contrainte du fait de l'emploi de deux contraintes de type NOE, il s'avère que leur action n'a qu'un effet très limité et difficilement perceptible sur la structure et la dynamique d'apoAtx1 au cours de la simulation de production.

Le tableau 7.6 récapitule l'ensemble des simulations effectuées sur apoAtx1 en précisant si les critères de stabilité sont satisfaits ou non. La structure initiale 1FES^{exp} a permis d'obtenir une simulation stable avec un repliement caractéristique des métallochaperones ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) pour la protéine apoAtx1. Les contraintes de distance de type NOE entre les atomes O^{Q8} et H^{K71} ont garanti que le brin β_4 ne s'est pas déplié. ■

Simulations	Structures initiales	Contraintes	Critères de stabilité		
			RMSD _{exp}	RMSD* _{exp}	Repliement
\mathcal{S}_1	1FES	non	--	+	--
\mathcal{S}_2	1FES	non	--	+	--
\mathcal{S}_3	1FES ₁ ^{exp}	non	-	--	--
\mathcal{S}_4	1FES ₁ ^{exp}	oui	+	+	-
\mathcal{S}_5	1FES ₈ ^{exp}	oui	+	+	+

TAB. 7.6 – Résumé des résultats des analyses de stabilité des simulations d’apoAtx1. Les RMSD_{exp} sont calculés à partir des positions atomiques des atomes du squelette peptidique par rapport à la structure RMN initiale correspondante. En gras, la simulation \mathcal{S}_5 qui satisfait l’ensemble des critères de stabilité des simulations.

7.1.2.2 Simulation d’apoHah1

Vu les problèmes posés par l’équilibration d’apoAtx1, une attention particulière a été portée à l’analyse de l’équilibration des simulations des autres protéines. La méthode employée pour apoHah1 exposée ici est la même pour apoMerp, ainsi que pour les formes métallées d’Hah1 et de MerP.

Hormis le fait que la structure publiée et déposée à la PDB pour Atx1 (1FES) soit sujette à caution, car c’est une structure moyenne dont l’énergie a été minimisée sous contraintes non disponibles, il est apparu par la suite que, même pour les structures expérimentales 1FES^{exp}, certains problèmes subsistent de par la mobilité importante de certains résidus, notamment ceux de la boucle L_1 qui lie le métal. Par conséquent, la conservation du repliement des protéines au cours des simulations est apparue comme un critère à satisfaire impérativement.

La structure de référence pour le calcul des RMSD est la structure moyenne de la phase de production (dont l’énergie a été minimisée). En effet, les résidus des boucles dans ces protéines se sont souvent révélés mobiles, entraînant parfois d’importantes variations du RMSD si la structure expérimentale était prise comme référence pour ce calcul. L’emploi de la structure moyenne réduit l’impact des mouvements de ces aminoacides et permet de vérifier si d’importants changements conformationnels se produisent au cours de la simulation. Deux types de RMSD ont ainsi été utilisés pour juger de la stabilité des simulations de dynamique moléculaire, sachant que lorsque les variations du RMSD par rapport à la structure expérimentale sont importantes, le RMSD calculé avec la structure moyenne comme référence permet de décider si la simulation est stable ou non. Cette approche permet de conserver les mêmes critères de stabilité que pour apoAtx1.

• Variations des RMSD

La structure initiale utilisée pour la simulation d’apoHah1 est la première de l’ensemble des 30 conformations résolues par RMN du fichier PDB 1TL5 (notée 1TL5₁^{exp}) [Anastassopoulou *et al.*, 2004]. Aucun des problèmes rencontrés à propos d’apoAtx1 ne s’est posé pour Hah1 ou pour MerP.

Les variations temporelles des RMSD au cours de la simulation d'apoHah1 sont reportées sur la figure 7.17. Les RMSD moyens au cours de la simulation de production sont respectivement de 1.7 Å ($\sigma_\mu < 0.05$ Å, $\sigma_d = 0.1$ Å) et 0.9 Å ($\sigma_\mu < 0.05$ Å, $\sigma_d = 0.1$ Å) par rapport à 1TL5₁^{exp} et à la structure moyenne. On note une légère augmentation du RMSD par rapport à 1TL5₁^{exp} sur l'ensemble de la simulation mais elle demeure relativement faible (moins de 0.2 Å sur 7 ns). En outre, la dispersion des sous-moyennes reste extrêmement réduite, quelque soit la structure de référence. Les variations des RMSD* sont proches de celles des RMSD car peu de résidus sont exclus de leur calcul (G13 et G14 de la boucle L_1 et T58 qui est le dernier aminoacide de α_2 avant L_5). Cependant, les RMSF_{C α} de G13 et G14 sont particulièrement élevés (≈ 2.4 Å) comme dans plusieurs autres simulations où les résidus de la boucle L_1 sont assez mobiles.

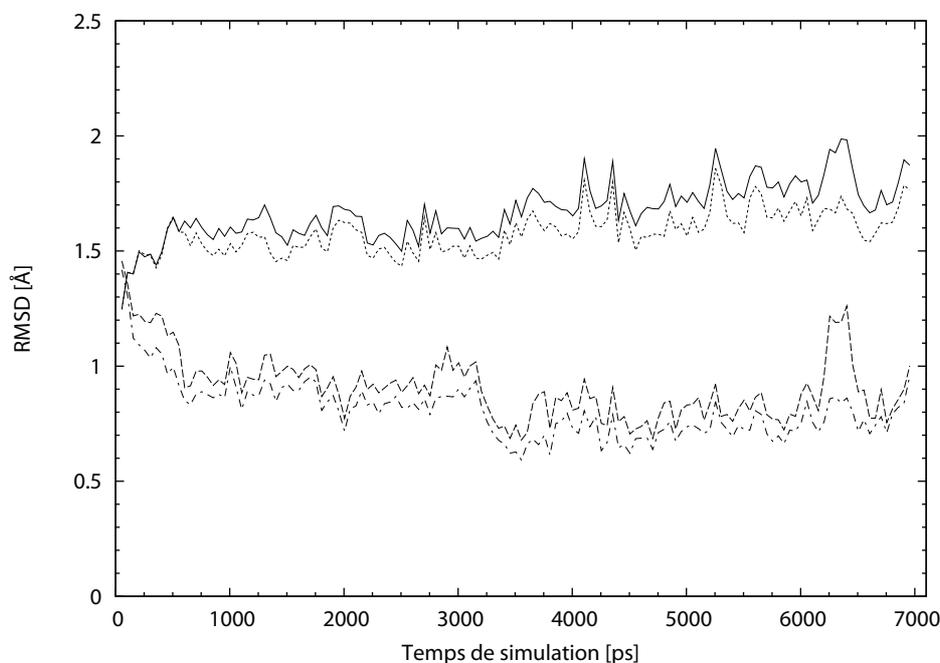


FIG. 7.17 – Evolutions temporelles des RMSD par rapport à la structure moyenne de la phase de production et par rapport à la structure RMN 1TL5₁^{exp}, des positions atomiques du squelette peptidique au cours de la simulation d'apoHah1. (—) RMSD calculé sur l'ensemble des résidus par rapport à la structure 1TL5₁^{exp}. (.....) RMSD* calculé par rapport à la structure 1TL5₁^{exp} en excluant les résidus 12, 13 et 58. (---) RMSD calculé sur l'ensemble des résidus par rapport à la structure moyenne. (-.-) RMSD* calculé par rapport à la structure moyenne en excluant les résidus 12, 13 et 58.

• Evolution du repliement

Comme pour apoAtx1, l'évolution des structures secondaires au cours de temps a été évaluée avec le programme STRIDE [Frishman et Argos, 1995], en surveillant particulièrement les extrémités N- et C-terminales de la protéine pour prévenir tout déplie- ment. Bien que d'une manière générale les éléments de structure secondaire puissent fluctuer en taille et en position, il est important que les protéines conservent leur

repliement caractéristique $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, d'autant plus que pour apoHah1 par exemple, il est très bien défini pour les 30 modèles résolus en RMN.

L'analyse de l'évolution des éléments de structure secondaire d'apoHah1 au cours de la simulation montre que le repliement reste constant (Fig. 7.18). Les extrémités des hélices α se sont stabilisées pendant la première nanoseconde de simulation et les brins β ne subissent pas de modification. Le repliement d'apoHah1 tout au long de la simulation de production est présenté au tableau 7.7. Il est conforme avec l'expérience [Anastassopoulou *et al.*, 2004]).

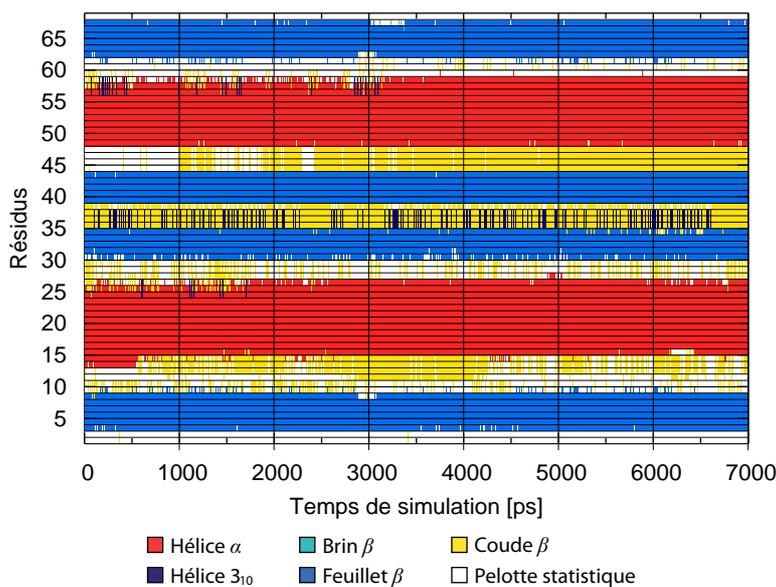


FIG. 7.18 – Evolution temporelle des éléments de structure secondaire au cours de la simulation d'apoHah1.

Eléments de structure secondaire	Simulation	1TL5
β_1	3-8	3-8
α_1	15-26	14-26
β_2	30-34	31-34
β_3	39-43	39-43
α_2	48-58	48-55
β_4	62-67	63-63

TAB. 7.7 – Eléments de structure secondaire d'apoHah1 simulée et publiée (1TL5).

Simulation d'apoHah1

La simulation d'apoHah1 à partir du premier conformère de jeu de structures résolues par RMN s'est déroulée sans problèmes. Elle est stable au cours des 5 dernières nanosecondes de simulation.

Elle est équilibrée et stationnaire sans avoir eu recours à des contraintes de distance de type NOE comme cela a été le cas pour apoAtx1. ■

7.1.2.3 Simulations des formes métallées d'Atx1

• Simulations de CuAtx1

La structure disponible de CuAtx1 est aussi une structure moyenne dont l'énergie a été minimisée en présence de contraintes (fichier PDB 1FD8) [Arnesano *et al.*, 2001a]. La première simulation de dynamique moléculaire (\mathcal{S}_1) réalisée à partir de cette structure a conduit aux mêmes problèmes que la simulation \mathcal{S}_1 d'apoAtx1. L'examen des structures secondaires au cours de la simulation montre que le brin β_4 tend très tôt à réduire en taille par son extrémité C-terminale.

En raison de l'apparente labilité du brin β_4 , cette simulation a été stoppée, pour en réaliser une nouvelle (\mathcal{S}_2), dans les mêmes conditions que \mathcal{S}_1 avec des contraintes de type NOE pour les paires d'atomes (O^{Q8}, H^{K71}) et (O^{K71}, H^{Q8}) comme dans le cas des simulations \mathcal{S}_4 et \mathcal{S}_5 d'apoAtx1 ($r_{O,H}^{\max} = 3 \text{ \AA}$, $k^{\max} = 100 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$). Cette simulation s'est avérée satisfaisante pour tous les critères précédemment exposés (énergies, repliement et RMSD). Le brin β_4 est stabilisé grâce aux contraintes de type NOE de telle sorte que le repliement de CuAtx1 paraît, cette fois-ci, remarquablement constant tout au long de la simulation, même pour le brin β_4 , en accord avec le repliement publié [Arnesano *et al.*, 2001a] (Tab. 7.8).

Eléments de structure secondaire	Simulation	1FD8
β_1	5-10	5-12
α_1	16-30	17-30
β_2	35-38	35-39
β_3	44-49	44-49
α_2	53-62	52-63
β_4	69-71	66-73

TAB. 7.8 – Eléments de structure secondaire de CuAtx1 simulée et publiée (structure PDB 1FD8) [Arnesano *et al.*, 2001a].

Les positions des résidus du squelette peptidique de la structure moyenne calculée à partir de la phase de production de la simulation \mathcal{S}_2 (notée \mathcal{S}_{2P}) ne se superposent pas très bien avec les structures d'holoAtx1 connues : CuAtx1 (structure 1FD8) et HgAtx1 (1CC8), avec des RMSD d'environ 2.6 Å pour chacune des deux superpositions, alors que le RMSD entre les structures 1FD8 et 1CC8 est de 1.23 Å, indiquant que les deux conformations sont relativement similaires. La différence majeure entre CuAtx1 simulée et ces deux structures de référence procède de la position de l'hélice α_1 qui se révèle décalée par rapport à α_2 . La superposition des résidus appartenant aux brins β et à l'hélice α_2 mène à des RMSD aux valeurs plus faibles : 1.45 Å entre la structure moyenne de la simulation et 1FD8 et 1.09 Å par rapport à 1CC8.

L'utilisation de la structure RMN moyenne 1FD8 ne paraît alors pas la raison principale de la déviation de la structure simulée. Les conditions expérimentales de la résolution de la structure de CuAtx1 en RMN sont les mêmes que celles décrites

par Pufahl *et al.*, *i.e.* en présence de DTT, soupçonné de complexer le Cu^(I) en plus des deux ligands cystéinyles d'Atx1 [Pufahl *et al.*, 1997]. Dès lors, les conditions des simulations de dynamique moléculaire de CuAtx1 ne sont pas les mêmes (il n'y a pas de DTT) et les contraintes *a priori* imposées par l'interaction du DTT avec le métal de CuAtx1 sont absentes. La protéine relaxe donc et explore un espace conformationnel distinct de celui observé par Arnesano *et al.* [Arnesano *et al.*, 2001a].

L'action des contraintes de type NOE demeure très faible tout au long de la simulation de production de \mathcal{S}_2 , notée \mathcal{S}_{2P} (Tab. 7.9). Cependant, à l'analyse de la figure 7.19, on constate que ces contraintes ont été actives sur l'ensemble de la simulation \mathcal{S}_2 , surtout la contrainte entre les atomes O^{Q8} et H^{K71} dont l'action est très forte aux périodes 2-5 ns et 6-10 ns de simulation. L'action de la contrainte de type NOE (O^{K71},H^{Q8} se localise essentiellement entre 15 ns et 17 ns de simulation. Cela montre que le brin β_4 tend «naturellement» à se déplier et que ces contraintes de type NOE s'avèrent utiles pour le maintenir. Ensuite, au cours de la phase de production, les contraintes de type NOE sont moins violées, signe d'une stabilisation du brin β_4 .

Contraintes NOE	Simulation \mathcal{S}_2			Simulation \mathcal{S}_{2P}		
	f_{NOE} [%]	$r_{\text{O,H}}$ [Å]	E_{NOE} [kcal.mol ⁻¹]	f_{NOE} [%]	$r_{\text{O,H}}$ [Å]	E_{NOE} [kcal.mol ⁻¹]
(O ^{Q8} ,H ^{K71})	4.04	2.21 ± 0.36	0.01 ± 0.12	0.52	2.09 ± 0.25	0.00 ± 0.03
(O ^{K71} ,H ^{Q8})	0.74	2.04 ± 0.26	0.0 ± 0.04	0.08	1.99 ± 0.21	0.00 ± 0.02

TAB. 7.9 – Effet des contraintes de type NOE sur les atomes (O^{Q8},H^{K71}) et (O^{K71},H^{Q8}) de CuAtx1 au cours de la simulation \mathcal{S}_2 . \mathcal{S}_{2P} est la simulation de production de \mathcal{S}_2 correspondant aux 5 dernières nanosecondes de simulation. f_{NOE} est la fréquence de violation des NOE; $r_{\text{O,H}}$ est la distance entre les atomes O et H de chaque paire d'atomes contraints; E_{NOE} est l'énergie de violation des contraintes de type NOE. Les valeurs moyennes de $r_{\text{O,H}}$ et E_{NOE} sont accompagnées des dispersions des données autour de la moyenne (σ_d).

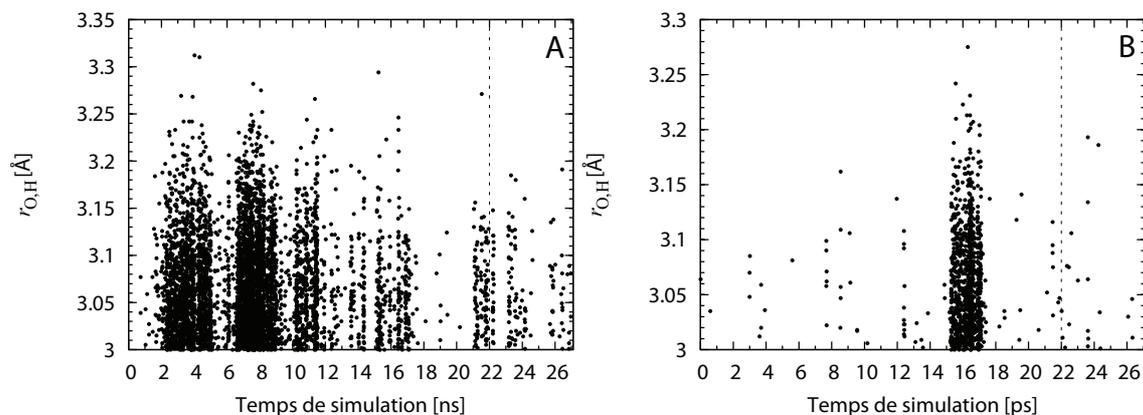


FIG. 7.19 – Action des contraintes de type NOE entre les atomes O^{Q8} et H^{K71} (A), et O^{K71} et H^{Q8} (B) au cours de la simulation \mathcal{S}_2 de CuAtx1 quand la distance $r_{\text{O,H}}$ est supérieure à 3 Å.

Compte-tenu du fait que la même labilité se retrouve pour le brin β_4 d'apoAtx1, cela suggère que l'extrémité C-terminale présente une certaine labilité et que ce brin

β est sans doute naturellement plus flexible que les autres brins du feuillet β .

• Simulations d'HgAtx1

De manière à pouvoir comparer les résultats avec les formes apo et liée au Cu^(I) d'Atx1, la simulation d'HgAtx1 a été réalisée avec les mêmes contraintes de type NOE que pour les simulations \mathcal{S}_5 d'apoAtx1 et \mathcal{S}_2 de CuAtx1. La structure initiale est le fichier PDB 1FD8. Cette simulation a nécessité 3 ns d'équilibration avant la phase de production.

Les contraintes de type NOE agissent très peu tout le long de la simulation (Tab. 7.10) : moins de 1% sur l'ensemble de la simulation et sur la phase de production. Cette simulation apparaît donc satisfaisante et la présence des contraintes de type NOE a un effet très réduit que l'on pourra négliger par la suite.

Contraintes NOE	Ensemble de la simulation			Production		
	f_{NOE} [%]	$r_{\text{O,H}}$ [Å]	E_{NOE} [kcal.mol ⁻¹]	f_{NOE} [%]	$r_{\text{O,H}}$ [Å]	E_{NOE} [kcal.mol ⁻¹]
(O ^{Q8} ,H ^{K71})	0.14	2.06 ± 0.20	0.00 ± 0.02	0.08	2.06 ± 0.20	0.00 ± 0.02
(O ^{K71} ,H ^{Q8})	0.07	2.06 ± 0.20	0.00 ± 0.01	0.07	2.07 ± 0.20	0.00 ± 0.01

TAB. 7.10 – Effet des contraintes de type NOE sur les atomes (O^{Q8},H^{K71}) et (O^{K71},H^{Q8}) d'HgAtx1. f_{NOE} est la fréquence de violation des NOE ; $r_{\text{O,H}}$ est la distance entre les atomes O et H de chaque paire d'atomes contraints ; E_{NOE} est l'énergie de violation des contraintes de type NOE. Les valeurs moyennes de $r_{\text{O,H}}$ et E_{NOE} sont accompagnées des dispersions des données autour de la moyenne (σ_d).

Le repliement d'HgAtx1 calculé tout au long de la simulation est comparé dans le tableau 7.11 à celui observé par Rosenzweig *et al.* pour la structure cristallographique d'HgAtx1 (entrée PDB 1CC8) [Rosenzweig *et al.*, 1999]. On en conclut un très bon accord entre les deux. Toutefois, la boucle L_1 est plus longue de deux résidus dans HgAtx1 simulée, au détriment de l'hélice α_1 .

Eléments de structure secondaire	Simulation	1CC8
β_1	5-12	5-11
α_1	18-28	16-29
β_2	33-39	33-39
β_3	44-49	44-49
α_2	53-63	52-63
β_4	67-72	66-73

TAB. 7.11 – Eléments de structure secondaire d'HgAtx1 simulée et publiée (structure PDB 1CC8) [Rosenzweig *et al.*, 1999].

Le RMSD de positions des atomes du squelette peptidique entre la structure

moyenne de la simulation et la structure 1CC8 est de 1.32 Å. Les structures se superposent bien. Le RMSD est de 0.78 Å si les résidus identifiés dans les hélices α ou le feuillet β dans HgAtx1 simulée, sont sélectionnés pour son calcul. Seule la conformation de L_1 et de L_5 diffère distinctement avec la structure 1CC8.

La dynamique des résidus est illustrée sur la figure 7.20. Les RMSF des positions des atomes C_α sont comparés au facteur de Debye-Waller B des mêmes atomes de la structure cristallographique d'HgAtx1 [Rosenzweig *et al.*, 1999] (selon la relation $B = \frac{8\pi^2}{3}\langle u^2 \rangle$ où $\langle u^2 \rangle = \text{RMSF}^2$). La protéine montre davantage de flexibilité au cours de la simulation que dans la structure X, surtout pour la boucle L_1 qui lie le métal.

Cependant, les différences parfois très nettes entre les facteurs B simulés et expérimentaux ne signifient pas pour autant que la simulation n'est pas de bonne qualité, vu la plus grande mobilité de ses atomes [Hünenberger *et al.*, 1995]. En effet, l'environnement de la protéine n'est pas le même dans le cristal où les forces d'empilement réduisent l'amplitude des mouvements. Dans les simulations de dynamique moléculaire, la protéine est dans un environnement en solution. On retrouve malgré tout les mêmes tendances dans les deux structures : les boucles sont plus flexibles que les régions repliées en hélice α ou en feuillet β . De plus, la structure X d'HgAtx1 a été résolue à basse température (95 K). Les mouvements des atomes sont donc de plus faible amplitude par rapport à ceux mesurés dans les simulations qui sont effectuées à 300 K.

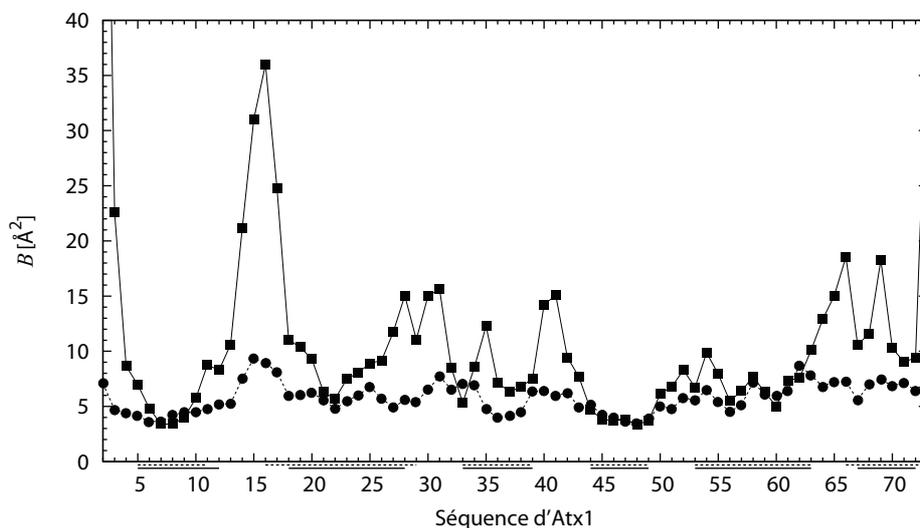


FIG. 7.20 – Facteurs B simulés à 300 K (■) et cristallographiques à 95 K (●) des atomes C_α des résidus d'HgAtx. Les facteurs B expérimentaux sont extraits du fichier PDB de la structure d'HgAtx1 1CC8 [Rosenzweig *et al.*, 1999]. Le résidu 1 n'est pas représenté car il est absent de la protéine dans la structure 1CC8. $B = 88.2 \text{ \AA}^2$ pour le résidu 2 d'HgAtx1 simulée. Les traits horizontaux sous le graphique indiquent les régions repliées en hélices α et en brins β .

7.2 Validation des paramètres du champ de forces du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ et du $\text{Hg}^{(\text{II})}$

Les potentiels d'interaction $\text{M}\cdot\text{Cys}_2$ développés par Fuchs *et al.* [Fuchs *et al.*, 2005] nécessitent d'être validés afin de vérifier qu'ils reproduisent correctement les sites de chélation du cuivre(I) et du mercure(II) dans des structures de protéines connues dans des simulations de dynamique moléculaire. Pour cela, on dispose de données à haute résolution (distance, angle) concernant l'environnement des ions $\text{Cu}^{(\text{I})}$ dans Hah1 et $\text{Hg}^{(\text{II})}$ dans Atx1 grâce aux expériences d'absorption de rayons X. D'autre part, les structures disponibles de CuHah1 [Anastassopoulou *et al.*, 2004] et d'HgAtx1 [Rosenzweig *et al.*, 1999] permettent de contrôler que ces potentiels métal-cystéinates ne modifient pas localement la conformation des protéines.

7.2.1 $\text{Cu}^{(\text{I})}$ dans CuHah1

Ralle *et al.* ont étudié la chélation du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ par Hah1 en solution, en l'absence de troisième ligand potentiel [Ralle *et al.*, 2003]. Grâce à l'EXAFS, il est possible de connaître très précisément l'environnement de l'ion quand il est bicoordonné par les seuls thiolates des cystéines 12 et 15. Le tableau 7.12 rappelle les distances $r_{\text{S,Cu}}$ et l'angle $\theta_{\text{S}_\gamma^{12}\text{CuS}_\gamma^{15}}$ déterminés expérimentalement et simulés (valeurs moyennes sur la phase de production).

L'angle formé par les deux atomes de soufre et l'ion $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ne peut pas être directement mesuré en absorption de rayons X. Ralle *et al.* ont déduit la géométrie linéaire du complexe par comparaison de la forme et de l'intensité du signal XANES avec les signatures XANES de composés modèles de géométrie connue [Kau *et al.*, 1987]. Le XANES du cuivre de HAH1 montre un pic intense au seuil d'absorption à environ 8983 eV, presque identique à celui du complexe de référence utilisé (le bis(2,3,5,6-tétraméthylbenzèthiolato)cuprate(I)). Ce dernier est linéaire avec $\theta_{\text{S}_\gamma^{12}\text{CuS}_\gamma^{15}} = 178.6^\circ$ [Koch *et al.*, 1984]. On en conclut que le cuivre dans Hah1, en l'absence de tout potentiel troisième ligand, est dans un environnement biscystéinate digonal.

Source	$r_{\text{S,Cu}^{(\text{I})}}$ [Å]	$\theta_{\text{S}_\gamma^{12}\text{Cu}^{(\text{I})}\text{S}_\gamma^{15}}$ [°]
EXAFS	2.16 ± 0.01	$\approx 180^\dagger$
Simulation	2.13 ± 0.05	168 ± 6

TAB. 7.12 – Géométrie simulée et déterminée par EXAFS du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ dans CuHah1 [Ralle *et al.*, 2003].[†] Il n'y a pas de mesure directe de l'angle $\theta_{\text{S}_\gamma^{12}\text{Cu}^{(\text{I})}\text{S}_\gamma^{15}}$ en EXAFS. On le déduit phénoménologiquement du XANES.

L'analyse de l'EXAFS permet de déterminer qu'en solution, en l'absence de troisième ligand, le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ dans Hah1 n'est complexé que par S_γ^{12} et S_γ^{15} . Les simulations de dynamique moléculaire reproduisent la même condition (le système se compose de la protéine, du solvant, et d'un contre-ion Na^+ car la charge nette totale de CuHah1 est de -1). D'autre part, le champ de forces du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ a été optimisé pour deux S

liés à un Cu (géométrie dite «CuS₂»). Néanmoins, dans la simulation de CuHah1, rien n'interdit à d'autres atomes (C, N, O ou S) de s'approcher du Cu^(I) grâce à des interactions électrostatiques et/ou de van der Waals favorables. La figure 7.21 montre l'intégrale sur le temps de simulation de la fonction de distribution de paires $g(r)$ des atomes C, N, S et O autour du cuivre(I).

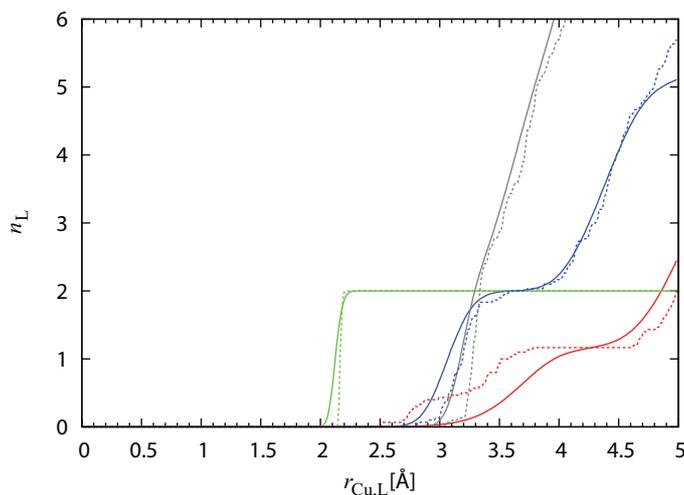


FIG. 7.21 – Nombres n_L d'atomes C (gris), N (bleu), O (rouge) et S (vert) environnant l'ion Cu^(I) dans la simulation de CuHah1 en fonction de la distance $r_{\text{Cu,L}}$ entre le Cu^(I) et l'atome L (L=C,N,O,S). (—) Données simulées dynamiques; (.....) Données expérimentales statiques, calculées à partir des 30 conformères RMN (PDB 1TL4) [Anastassopoulou *et al.*, 2004].

Seuls les deux sulfures S_γ des Cys 12 et 15 complexent le Cu^(I) car la variation de la courbe correspondante est importante entre 2.05 Å et 2.2 Å, tandis que la montée des courbes pour les atomes N et O s'étale sur au moins 1 Å à partir de distances supérieures à 2.9 Å environ, signe que les interactions avec l'ion métallique sont faibles, et à des distances trop éloignées du Cu^(I) pour donner des liaisons de coordination fortes. La reproduction fidèle de la position des sulfures par rapport à la structure expérimentale est normale car les potentiels d'interaction M•Cys₂ sont des potentiels liés, *i.e.* que l'interaction S–M est traitée par un terme lié qui offre le meilleur accord entre les données *ab initio* et l'ajustement pour CHARMM.

La comparaison de l'environnement du Cu^(I) en simulation avec celui observé expérimentalement en RMN [Anastassopoulou *et al.*, 2004] se montre également très bonne. La distribution radiale autour du Cu^(I) des atomes C, N et O permet d'étudier les interactions non liées. Les azotes et les oxygènes étant polaires, ils sont davantage soumis à une interaction électrostatique avec l'ion métallique, tandis que les carbones reflètent plutôt les interactions de van der Waals. Un très bon accord est trouvé pour les deux types d'interaction.

En outre, bien que la distribution radiale des oxygènes semble différente entre les deux situations, il faut souligner que les paramètres électrostatiques et de van der Waals du cuivre(I) utilisés dans le raffinement des conformères RMN sont empiriques et approximatifs, contrairement à ceux développés pour le mécanique moléculaire dans

notre cas qui ont été obtenus à partir de calculs *ab initio* de complexes dithiolatocuprate(I) [Fuchs *et al.*, 2005].

L'accessibilité relative au solvant du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ est nulle aussi bien dans CuHah1 1TL4 que dans la simulation. Cela indique que la simulation en milieu solvato n'a pas perturbé le potentiel d'interaction cystéinate–métal qui a été développé à partir de simulations *ab initio* en phase gazeuse. Ainsi, les paramètres électrostatiques et de van der Waals du complexe $\text{Cu}^{(\text{I})}\cdot\text{Cys}_2$ reproduisent parfaitement l'environnement réel de l'ion dans la protéine.

7.2.2 $\text{Hg}^{(\text{II})}$ dans HgAtx1

Des expériences de ^{199}Hg -RMN et d'EXAFS menées par Pufahl *et al.* [Pufahl *et al.*, 1997] ont montré que l'ion $\text{Hg}^{(\text{II})}$ est complexé aux cystéines 15 et 18 d'Atx1 dans une géométrie caractéristique des composés dithiolatomercurure(II). De surcroît, grâce à l'EXAFS, la distance $r_{\text{S,Hg}}$ est modélisée à 2.34 Å, comme dans la structure cristallographique d'Atx1 chélatant du $\text{Hg}^{(\text{II})}$ résolue par Rosenzweig *et al.* [Rosenzweig *et al.*, 1999]. La géométrie du métal est correctement reproduite par le champ de forces de mécanique moléculaire développé par Fuchs *et al.* [Fuchs *et al.*, 2005] (Tab. 7.13).

Source	$r_{\text{S,Hg}^{(\text{II})}}$ [Å]	$\theta_{\text{S}_\gamma^{15}\text{Hg}^{(\text{II})}\text{S}_\gamma^{18}}$ [°]
EXAFS	2.34	$\approx 180^\dagger$
Cristallographie	2.33 - 2.34	167
Simulation	2.32 ± 0.05	172 ± 4

TAB. 7.13 – Géométrie simulée et déterminée par EXAFS du $\text{Hg}^{(\text{II})}$ dans HgAtx1. † Il n'y a pas de mesure directe de l'angle en EXAFS. On le déduit phénoménologiquement du XANES.

L'environnement du mercure(II) dans Atx1 est correctement reproduit par la simulation si on le compare à celui de la structure cristallographique [Rosenzweig *et al.*, 1999] (Fig. 7.22). Pour cette dernière, l'atome O_γ de T14 s'approche à 3.07 Å de l'ion $\text{Hg}^{(\text{II})}$ et peut être ainsi attribué à la seconde sphère de coordination du métal. Le champ de forces du mercure(II) développé au laboratoire [Fuchs *et al.*, 2005] reproduit fidèlement cette interaction en positionnant $\text{O}_\gamma^{\text{T14}}$ à environ 3.1 Å de l'ion.

La surface relative accessible au solvant du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ est nulle dans la simulation, en accord avec celle du métal dans HgAtx1 1CC8. Cela confirme que les paramètres électrostatiques et de van der Waals développés pour CHARMM sont correctement ajustés sur les données *ab initio*.

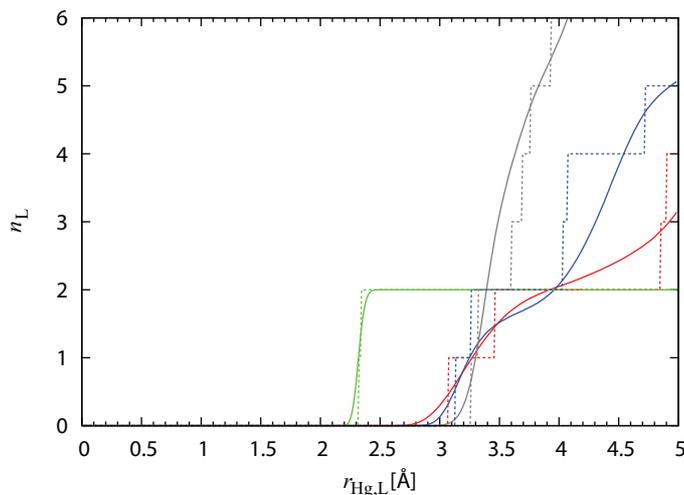


FIG. 7.22 – Nombres n_L d'atomes C (gris), N (bleu), O (rouge) et S (vert) environnant l'ion $\text{Hg}^{\text{(II)}}$ dans la simulation de HgAtx1 en fonction de la distance $r_{\text{Hg,L}}$ entre le $\text{Hg}^{\text{(II)}}$ et l'atome L (L=N,O,S). (—) Données simulées dynamiques; (.....) Données expérimentales statiques, calculées à partir de la structure X (PDB 1CC8 [Rosenzweig *et al.*, 1999]).

Le champ de forces du $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ et du $\text{Hg}^{\text{(II)}}$

Grâce aux données expérimentales très précises fournies par l'EXAFS, les simulations de CuHah1 et d'HgAtx1 permettent de valider les deux propriétés fondamentales qui caractérisent un champ de forces : sa transférabilité et son applicabilité.

Etant donné que les complexes $\text{Cu}(\text{SCH}_3)_2$ et $\text{Hg}(\text{SCH}_3)_2$ ont été choisis pour modéliser les complexes de deux cystéinates liés à un métal, il paraît évident que les paramètres développés doivent être transférables car la similitude chimique entre un méthylthiolate et un cystéinate est évidente. Néanmoins, l'environnement différent du site métallique entre les conditions *ab initio* (en phase gazeuse) et dans la protéine aurait pu limiter l'applicabilité des nouveaux potentiels. Ce n'est pas le cas. Les contraintes géométriques imposées par la protéine et la présence d'autres atomes (C, N et O) ne perturbent pas le site métallique qui conserve une géométrie (distances S-M et angle (S,M,S)) caractéristiques d'un composé bicoordiné linéaire.

En outre, la distribution des atomes C, N et O dans l'environnement n'est pas non plus changée par les potentiels d'interaction avec le métal si on compare les structures expérimentales aux structures simulées. Les atomes N et O présentent des charges partielles assez importantes qui les rendent donc sensibles aux effets d'attraction et de répulsion électrostatiques. Leur distribution est très bien reproduite par les potentiels de mécanique moléculaire.

D'autre part, la distribution des atomes C, moins polaire et plus sensible aux interactions de van der Waals, montre un accord parfait entre la simulation et les structures expérimentales. Par conséquent les termes non liés (électrostatiques et de van der Waals) dans les champs de forces du $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ et du $\text{Hg}^{\text{(II)}}$ ont été correctement dérivés des simulations *ab initio*.

La simulation de la protéine en milieu solvaté ne modifie pas non plus le comportement du métal qui reste enfoui dans les simulations, comme dans les structures expérimentales. Ces potentiels sont donc bien applicables au cas des protéines. ■

7.3 Effets globaux et locaux de la liaison des métaux aux métallochaperones

Les interactions métal–cystéinates dans les protéines sont étudiées pour trois métallochaperones : Hah1, Atx1 et MerP. Pour caractériser la sélectivité de la complexation du $\text{Cu}^{(I)}$ et du $\text{Hg}^{(II)}$ par ces protéines, il est intéressant de distinguer deux situations : les métallochaperones chélatent leur métal natif – en l’occurrence $\text{Cu}^{(I)}$ pour Hah1 et Atx1, et $\text{Hg}^{(II)}$ pour MerP –, et le cas où elles lient un métal non natif, $\text{Hg}^{(II)}$ pour Hah1 et Atx1 et $\text{Cu}^{(I)}$ pour MerP.

Les simulations de dynamique moléculaire permettent de comparer ces différents états de métallation. Dans une première étape, les propriétés dynamiques et structurales de chacune des holoprotéines natives sont comparées avec celles de l’apoprotéine correspondante, puis la comparaison s’étendra aux holoprotéines non natives, en tentant de répondre à trois questions : pour une protéine donnée, quel effet la présence d’un métal produit-il sur sa dynamique et sur sa structure ? Cet effet diffère-t-il d’un métal à l’autre ? Enfin, peut-on relever des caractéristiques communes à ces trois métallochaperones selon qu’elles sont dans leurs formes apo ou holo natives ou non natives ?

La comparaison entre les protéines est donc réalisée sous deux angles : un premier dynamique, avec l’étude de la mobilité des atomes C_α des résidus des protéines au cours des simulations et de la corrélation éventuelle des mouvements de ces atomes entre eux, et un second structural, où les conformations des protéines sont superposées pour tenter de mettre en lumière des différences entre chaque état de chacune des protéines. L’accessibilité au solvant des chaînes latérales des aminoacides s’est aussi montrée une propriété intéressante pour l’études des protéines car elle permet parfois de relier une variation de la structure d’une protéine à une modification de ses propriétés dynamiques.

7.3.1 Liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ sur les chaperones à cuivre, Hah1 et Atx1

7.3.1.1 Repliement des protéines

Les éléments de structure secondaire d’Hah1 et d’Atx1 sont répertoriés dans le tableau 7.14. La présence de $\text{Cu}^{(I)}$ ne change pas le repliement des protéines sauf pour l’hélice α_1 qui est plus étendue dans les formes holo. Pour Hah1, α_1 s’étend de 2 résidus du côté N-terminal quand le $\text{Cu}^{(I)}$ est chélaté. Pour Atx1, le changement est plus important : α_1 ne compte que 5 résidus dans apoAtx1, mais quand le cuivre est complexé, α_1 s’étend considérablement aussi bien en N- qu’en C-terminal pour finalement tripler de longueur. La boucle L_1 est plus réduite dans les deux holopro-

téines, son dernier résidu étant la première cystéine du site consensus MTCXXC (C12 pour Hah1 et C15 pour Atx1). Cette différence de comportement différent pour ces protéines lors de la chélation du $\text{Cu}^{(I)}$ avait déjà été mise en évidence par le groupe d'I. Bertini [Anastassopoulou *et al.*, 2004].

Eléments de structure secondaire	apoHah1	CuHah1	apoAtx1	CuAtx1
β_1	3-8	4-8	5-12	5-10
α_1	15-26	13-26	22-26	16-30
β_2	30-34	30-34	35-39	35-38
β_3	39-43	39-43	44-49	44-49
α_2	48-58	48-58	53-63	53-62
β_4	62-67	62-66	66-72	69-71

TAB. 7.14 – Eléments de structure secondaire d'Hah1 simulée dans les formes apo et liée au $\text{Cu}^{(I)}$. En gras, les changements majeurs de repliement dus à la liaison du $\text{Cu}^{(I)}$.

7.3.1.2 Effets dynamiques

• RMSF des positions des atomes C_α

La flexibilité des métallochaperones à cuivre Atx1 et Hah1 a été caractérisée par l'analyse des RMSF de leurs atomes C_α . Les variations des RMSF des C_α sont représentées sur la figure 7.23 pour les formes apo et métallées.

La présence de $\text{Cu}^{(I)}$ lié aux protéines a un impact très marqué sur la mobilité de leurs résidus. Ainsi, tandis que les RMSF des aminoacides des hélices α et du feuillet β demeurent presque inchangés entre les formes apo et holo d'Hah1 et d'Atx1, signe que leur mobilité n'est pas affectée par la présence du métal, de grandes différences sont observées au niveau des boucles, essentiellement pour la boucle L_1 comme cela avait déjà été observé en RMN pour les deux protéines [Arnesano *et al.*, 2001a, Anastassopoulou *et al.*, 2004].

Anastassopoulou *et al.* ont montré que la différence majeure entre les formes apo et $\text{Cu}^{(I)}$ d'Hah1 se trouve entre les résidus M10 et A18, *i.e.* dans la boucle L_1 où se situe C12, et dans la partie N-terminale de α_1 où se situe C15 [Anastassopoulou *et al.*, 2004]. Lorsque ces deux cystéines complexent un ion $\text{Cu}^{(I)}$, la protéine subit alors le plus grand changement conformationnel et la plus importante structuration.

Ces observations sont confirmées par la simulation. De plus, il est possible d'évaluer ici le pouvoir structurant de la liaison du cuivre(I) : la variation de RMSF entre la forme holo et la forme apo atteint en effet presque 2 Å pour C12 et G13. La chélation du $\text{Cu}^{(I)}$ rigidifie donc considérablement la boucle L_1 .

Atx1 présente des propriétés dynamiques similaires à Hah1. Les résidus de part et d'autre des cystéines C15 et C18 liant le métal (T14, S16, G17 et S19) connaissent la plus importante réduction de mobilité dans la forme holo, en accord avec les

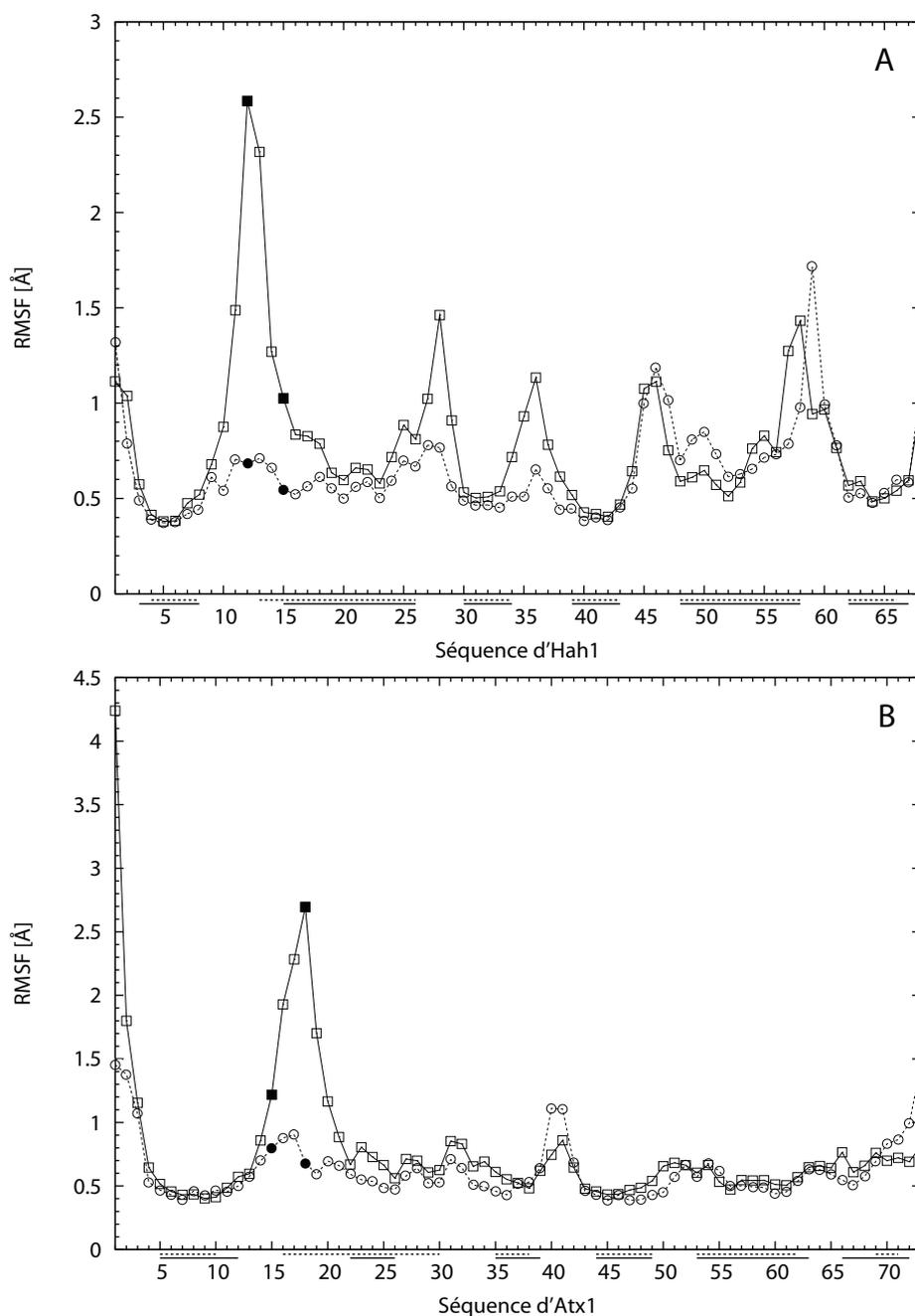


FIG. 7.23 – RMSF des atomes C_{α} des résidus des formes apo (—□) et liées au $Cu^{(I)}$ (-○-) d'Hah1 (A) et d'Atx1 (B). Les traits sous les graphiques indiquent les régions repliées en hélices α et en brins β . Les symboles pleins indiquent la position des cystéines liant le $Cu^{(I)}$: 12 et 15 chez Hah1, 15 et 18 chez Atx1.

observations d'Arnesano *et al.* [Arnesano *et al.*, 2001a]. L'effet de la complexation du $Cu^{(I)}$ s'avère relativement local quant aux variations de la flexibilité de la protéine. Seuls les résidus de la boucle L_1 sont affectés par la métallation. L'effet structurant du métal y est du même ordre de grandeur que pour Hah1 (diminution des RMSD d'environ 2 Å quand $Cu^{(I)}$ est chélaté).

Les simulations indiquent également une flexibilité accrue pour les boucles L_2 et L_3 dans apoHah1 par rapport à CuHah1 (essentiellement pour G28 et P36 dont les RMSF diminuent d'environ 0.5 Å en présence de Cu^(I)).

Les deux cystéines complexantes des deux métallochaperones ont des propriétés dynamiques distinctes, que l'on retrouve aussi bien en simulation qu'en RMN pour Hah1 [Anastassopoulou *et al.*, 2004] que pour Atx1 [Arnesano *et al.*, 2001a].

Dans apoHah1, la première cystéine (C12) se révèle la plus mobile et la plus perturbée par la liaison du Cu^(I). C15 est déjà comprise dans l'hélice α_1 dans apoHah1, sa flexibilité est donc réduite. La liaison du Cu^(I) affecte par conséquent majoritairement C12 qui appartient à L_1 dans apoHah1.

A l'inverse, dans apoAtx1, la deuxième cystéine (C18) est la plus mobile des deux cystéines complexant le cation. C'est elle qui subit la diminution de RMSF la plus importante quand Cu^(I) est présent. Cela s'explique par le fait que dans apoAtx1, C18 ne réside pas dans α_1 . Elle est au milieu de la boucle L_1 , au point le plus flexible de cette boucle de 9 résidus. Dès lors, la chélation du Cu^(I) change profondément la structure locale du site de complexation où près de la moitié C-terminale des résidus de L_1 (dont C18) se replie en hélice α . C18 devient alors beaucoup moins mobile dans CuAtx1 que dans apoAtx1.

• Cartes des corrélations croisées dynamiques

Dynamique des apométallochaperones

Les cartes de corrélations croisées dynamiques, ou DCCM (*Dynamical Cross-Correlation Map*), permettent de repérer les résidus dont les mouvements sont corrélés en phase ($C_{ij} = 1$) ou en opposition de phase ($C_{ij} = -1$).

Les corrélations les plus fortes visibles pour apoHah1 sur la figure 7.24 sont alignées sur la diagonale et correspondant aux résidus proches dans la séquence. Les corrélations s'étendent jusqu'aux aminoacides $i + 2$ et $i + 3$. Ensuite, on identifie des régions très corrélées (**A1**, **A2**, **B1**, **B2**, **B3** et **C**) caractéristiques des hélices α et des feuillets β antiparallèles [Swaminathan *et al.*, 1991, Harte *et al.*, 1992].

Les corrélations entre les brins du feuillet β forment des motifs aisément identifiables ; ce sont les régions **B1**, **B2** et **B3** de la DCCM correspondant respectivement aux corrélations entre les brins β_1 et β_3 , β_1 et β_4 et β_2 et β_3 . Le repliement en feuillet antiparallèle conduit ainsi à de fortes corrélations entre des résidus éloignés dans la séquence.

On identifie aussi les hélices du fait des fortes corrélations qu'elles induisent entre des résidus de proche en proche, jusqu'au résidu $i + 8$ (régions **A1** pour α_1 et **A2** pour α_2). Leur effet structurant se révèle très prononcé sur les mouvements des C_α , au-delà du simple effet des liaisons hydrogènes $i, i + 4$. Les mouvements des aminoacides de part et d'autre des hélices montrent également une assez forte corrélation avec ceux situés dans les hélices, sauf pour α_1 , où seule G14 (boucle L_1) qui précède α_1 présente une forte corrélation. Les autres aminoacides de L_1 ne montrent aucune corrélation avec α_1 (ils sont légèrement anti-corrélés, avec $C_{ij} \approx -0.2$) du fait de leur

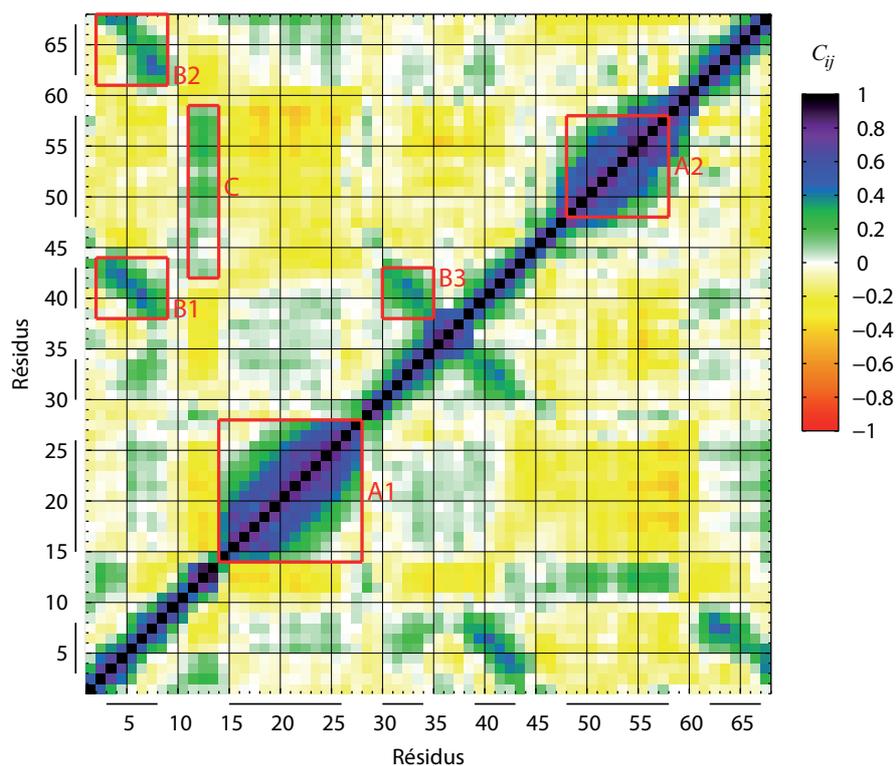


FIG. 7.24 – Carte des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α d'apoHah1. Les régions entourées **A1**, **A2**, **B1**, **B2**, **B3** et **C** correspondent aux zones de la protéine où les positions des C_α sont les plus corrélées. Les traits horizontaux et verticaux de part et d'autre du graphique symbolisent les éléments de structure secondaire β_1 , α_1 , β_2 , β_3 , α_2 et β_4 .

mobilité importante.

La dernière région montrant des corrélations notables est la zone **C** sur la DCCM. Elle se situe au niveau de la boucle L_1 et concerne ses résidus centraux T11, C12 et G13. Leurs positions sont corrélées avec α_2 et les C_{ij} augmentent au fur et à mesure que l'on approche de l'extrémité C-terminale. Les corrélations maximales demeurent toutefois limitées ($C_{ij} \approx 0.25$).

L'analyse des corrélations croisées d'apoAtx1 (Fig. 7.25) conduit aux mêmes observations qu'apoHah1. Cependant, les hélices montrent des corrélations moins prononcées. En effet, dans les hélices d'apoHah1, on identifie de fortes corrélations jusqu'au résidu $i + 4$ puis des corrélations moyennes jusqu'au résidu $i + 8$. Dans Atx1, seules les corrélations s'étendant jusqu'au résidu $i + 4$ perdurent. En d'autres termes, la structuration des résidus est plus faible, donc leurs positions sont moins interdépendantes. Les corrélations des positions des C_α de l'hélice α_1 s'avèrent en outre relativement faibles car même les $C_{i,j \leq i+4}$ ne dépassent pas 0.5. En revanche, les corrélations entre les brins du feuillet β sont semblables à celles identifiées pour apoHah1.

Enfin, la partie N-terminale de L_1 (V12, M13) apparaît corrélée avec quelques résidus des boucles L_3 (L40 et E43) et L_5 (notamment avec K65) et la région N-terminale de β_4 (E66 et V67).

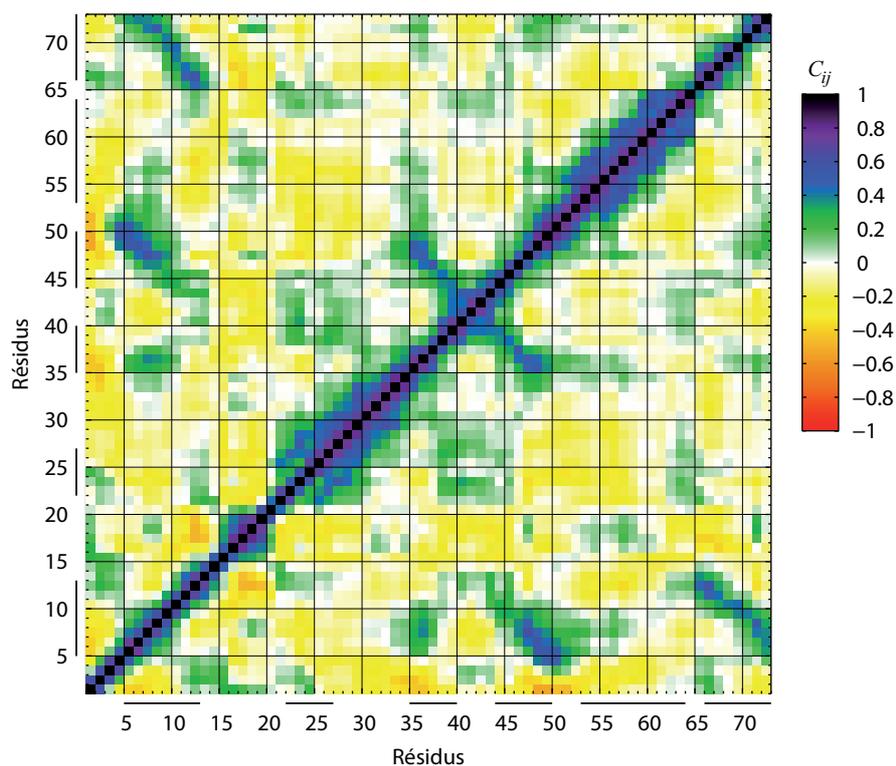


FIG. 7.25 – Carte des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α d'apoAtx1. Les traits horizontaux et verticaux de part et d'autre du graphique symbolisent les éléments de structure secondaire β_1 , α_1 , β_2 , β_3 , α_2 et β_4 .

Dynamique des holométallochaperones complexées au $\text{Cu}^{(I)}$

L'effet de la présence du $\text{Cu}^{(I)}$ est le même pour les deux protéines (Fig 7.26).

Les corrélations concernant les brins β et les hélices α ne changent pas. La modification la plus notable se situe au niveau de la boucle L_1 : la présence du métal induit une forte corrélation entre les aminoacides qui en sont proches. Ainsi, les positions des résidus de M10 à C15 pour Hah1, et de T13 à S19 pour Atx1, sont très corrélées ($C_{ij} > 0.5$). Cet effet est prévisible car le métal établit un pont entre les deux cystéines et rigidifie donc l'ensemble des résidus compris entre ces cystéines (seulement 2) et de part et d'autre. L'effet est le plus remarquable pour Atx1 où le gain de corrélation est d'autant plus grand que l'hélice α_1 a presque triplé en longueur, preuve d'une structuration étendue affectant considérablement la dynamique.

De plus, les résidus de la boucle L_1 sont maintenant corrélés avec certains de la boucle L_3 – surtout L35, P36 et K38 pour Hah1, et Q43 pour Atx1 –, et de la boucle L_5 – K60 et T61 pour Hah1, et E66, V67 et R68 pour Atx1. Concernant Atx1, les corrélations L_1 - L_5 existent déjà dans la forme apo.

La liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ affecte ainsi principalement la dynamique de la boucle L_1 , et celle des boucles situées de chaque côté de L_1 , à savoir L_3 et L_5 . L'apparition de corrélations inter-boucles révèle l'existence d'une unité dynamique $L_1 - L_3 - L_5$ dépendant de la présence du $\text{Cu}^{(I)}$. L'effet de la complexation du métal ne se limite alors pas seulement

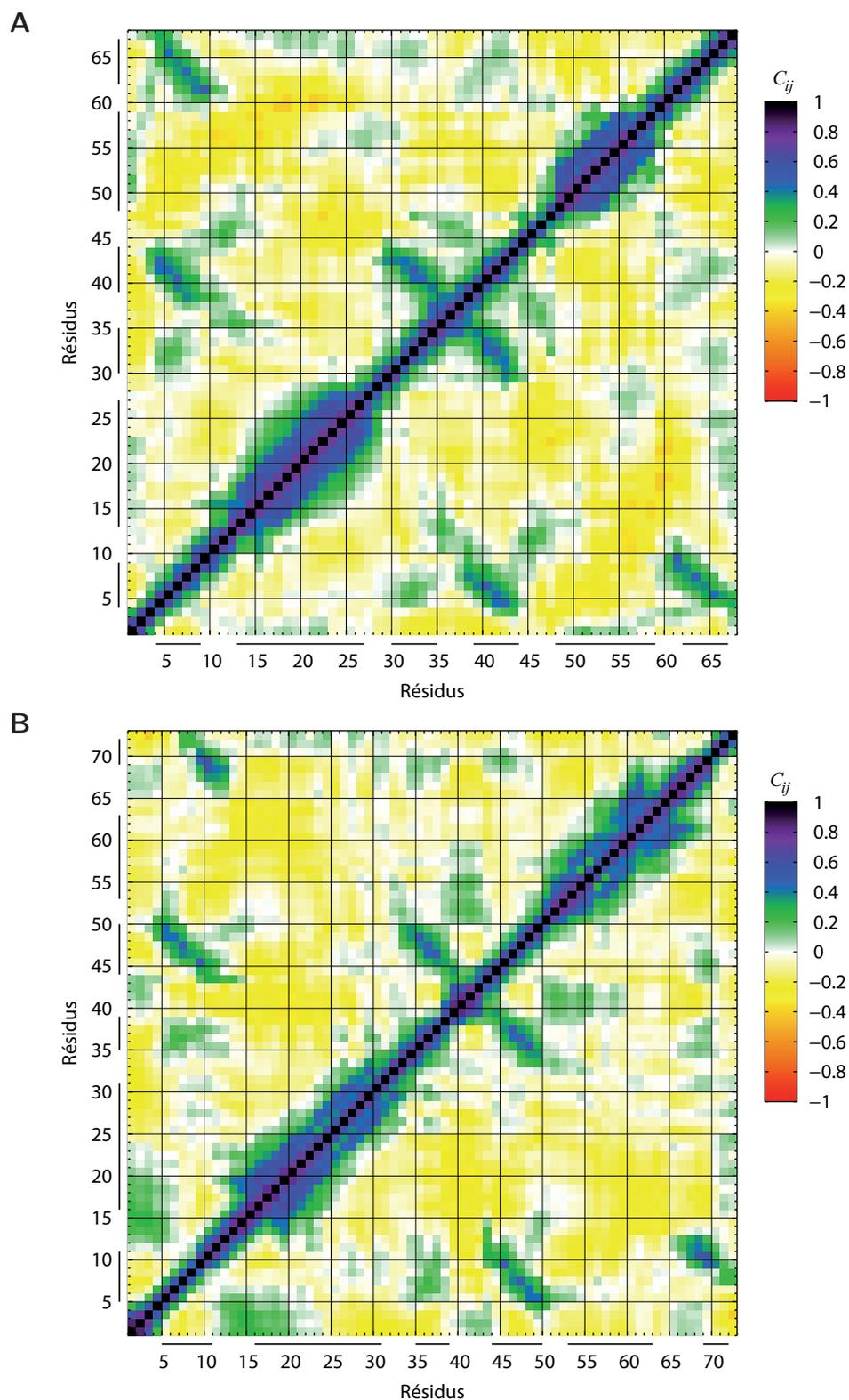


FIG. 7.26 – Cartes des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α de CuHah1 (**A**) et de CuAtx1 (**B**). Les traits horizontaux et verticaux, de part et d'autre du graphique, symbolisent les éléments de structure secondaire β_1 , α_1 , β_2 , β_3 , α_2 et β_4 .

aux résidus situés avant et après les cystéines du motif MXCXX dans la séquence des protéines.

7.3.1.3 Effets structuraux

Le calcul des RMSD portant sur les positions des atomes du squelette peptidique (N,C,O,C $_{\alpha}$) entre les formes apo et Cu^(I) des structures moyennes d'Hah1 et d'Atx1 (dont l'énergie a été minimisée) sont reportés sur le tableau 7.15.

Protéines	RMSD _{apo/Cu}		
	Tous les résidus [Å]	α/β^a [Å]	Sauf L_1^b [Å]
Hah1	1.14 (0.84)	0.45 (0.66)	0.97 (0.82)
Atx1	2.84 (1.80)	1.90 (1.12)	2.39 (1.50)

TAB. 7.15 – RMSD des positions des atomes du squelette peptidique (N,C,O,C $_{\alpha}$) entre les formes apo et Cu^(I) des structures moyennes simulées (dont l'énergie a été minimisée) d'Hah1 et d'Atx1. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la superposition des structures expérimentales moyennes pour le calcul des RMSD (pour Atx1, les structures 1FES et 1FD8 ont été directement utilisées). ^a Seuls les résidus des hélices α et du feuillet β des formes apo ont été pris en compte dans le calcul des RMSD. ^b Les résidus de la boucle L_1 des formes apo ont été exclus du calcul des RMSD.

La liaison du Cu^(I) à Hah1 n'induit pas de changements conformationnels importants étant donné le faible RMSD (1.14 Å) entre les structures apo et holo. Cela est d'autant plus vrai si on ne considère que les résidus appartenant aux régions repliées (0.45 Å). Vu la proximité des valeurs entre les RMSD des structures expérimentales et simulées d'Hah1, le comportement d'Hah1 simulée est très satisfaisant [Anastassopoulou *et al.*, 2004].

Pour Atx1, il existe une différence nette entre les conformations simulées avec et sans métal, étant donné la valeur élevée du RMSD sur l'ensemble des résidus (2.84 Å) et sur ceux compris dans les hélices et les brins (1.90 Å). On distingue clairement sur la figure 7.27 que les hélices α se superposent mal : leur orientation relative est d'une part différente (le RMSD chute à 1.08 Å si les résidus des hélices α sont exclus du calcul) et, d'autre part, la longueur de l'hélice α_1 varie beaucoup selon la présence ou non du Cu^(I). La superposition du squelette peptidique de tous les aminoacides des structures moyennes 1FES et 1FD8 produit un RMSD de seulement 1.80 Å. Ces deux structures présentent donc de plus faibles différences que les structures simulées, localisées principalement au niveau de l'hélice α_1 et de la boucle L_1 .

L'éloignement structural entre les conformations moyennes d'apoAtx1 et de CuAtx1 trouve certainement une partie de son origine dans la nature des structures initiales d'Atx1 utilisées pour les simulations. La forme apo montre une grande mobilité en simulation, notamment dans la région α_1 - L_1 , qui entraîne une divergence assez grande entre la structure 1FES^{exp} et la structure moyenne de la simulation (RMSD= 3.65 Å). En outre, la conformation initiale pour la simulation de CuAtx1

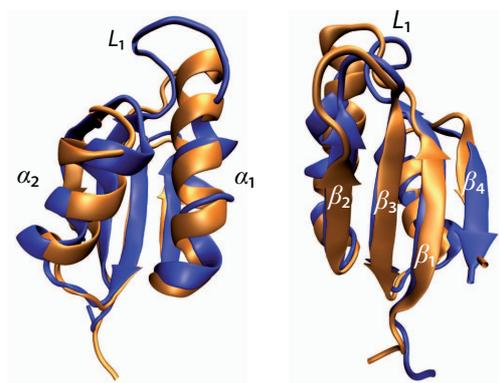


FIG. 7.27 – Superposition des structures moyennes d'apoAtx1 (bleu) et de CuAtx1 (orange) en ne tenant compte que des résidus des hélices α et du feuillet β d'apoAtx1.

est 1FD8, une structure moyenne. La simulation a permis à cette structure sans véritable réalité physique de relaxer. Il se pourrait que cela nuise à la simulation, dans le sens où la protéine soit piégée dans un puits de potentiel local, qui n'est pas celui de la protéine native (dont le puits de potentiel est au minimum énergétique global). La superposition de la structure 1FD8 et de la structure moyenne de la simulation conduit à un RMSD de 2.67 Å. Par ailleurs, comme cela a déjà été souligné, les conditions expérimentales dans lesquelles la structure de CuAtx1 a été résolue par RMN [Arnesano *et al.*, 2001a] sont identiques à celles de Pufahl *et al.* [Pufahl *et al.*, 1997] pour les expériences d'EXAFS du cuivre. Dans ces conditions, le DTT est lié au $\text{Cu}^{(I)}$, interagissant probablement avec la protéine. La relaxation locale de la structure de CuAtx1 en simulation pourrait être due à l'absence de DTT au niveau de la boucle L_1 .

L'orientation de la boucle L_1 a une incidence sur la superposition des structures apo et holo simulées car la valeur du RMSD diminue d'environ 15% pour les deux protéines (calcul réalisé en excluant les résidus des boucles L_1 d'apoAtx1 et d'apoHah1). Cela indique qu'un réarrangement structural s'opère au niveau de la boucle L_1 quand les protéines sont en présence de $\text{Cu}^{(I)}$. La complexation du $\text{Cu}^{(I)}$ implique un remodelage local (au niveau de la boucle L_1) mais aussi global des protéines (avec par exemple l'extension de l'hélice α_1 à ses deux extrémités pour CuAtx1). Pour Hah1, la superposition des éléments α/β diminue le RMSD de 60% environ, à 0.45 Å. Cela signifie que les changements structuraux entre apo- et CuHah1 et liés à la présence de $\text{Cu}^{(I)}$ se situent majoritairement dans les boucles. Pour Atx1, le RMSD ne décroît que de 35% environ : l'effet de $\text{Cu}^{(I)}$ est alors plus «diffus» et concerne l'ensemble de la protéine.

7.3.1.4 Accessibilité au solvant

L'analyse sera focalisée sur la région qui lie l'ion $\text{Cu}^{(I)}$, plus particulièrement sur la séquence consensus des métallochaperones à cuivre (MXCXXC). Les surfaces relatives accessibles au solvant (SRA) des chaînes latérales des résidus d'apoHah1 et d'apoAtx1 sont reportées sur la figure 7.28.

L'exposition au solvant de la région comportant le motif MXCXXC d'apoHah1

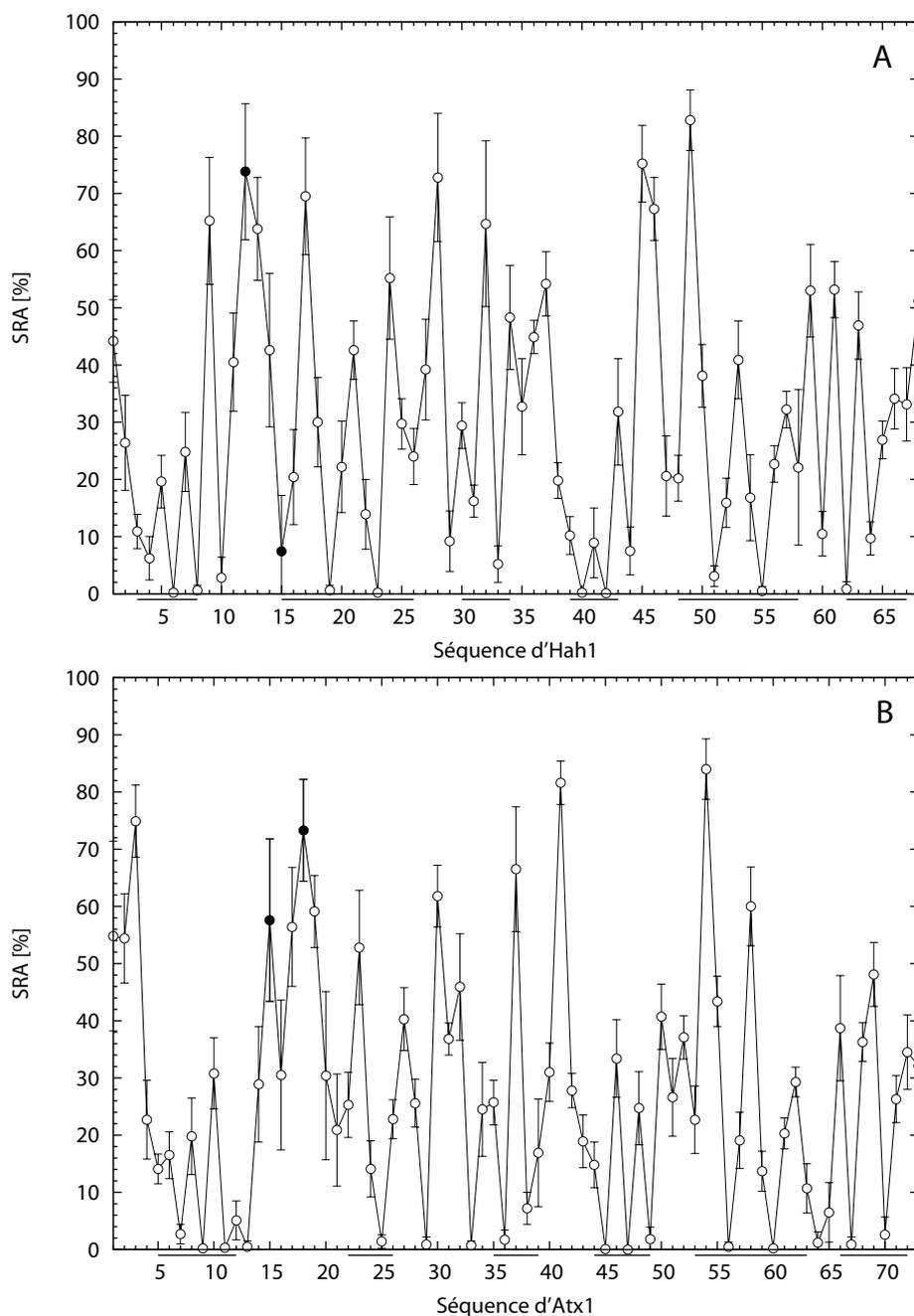


FIG. 7.28 – Surfaces relatives accessibles au solvant (SRA) des chaînes latérales des résidus d’apo-Hah1 (**A**) et d’apoAtx1 (**B**). Les traits horizontaux sous les graphiques indiquent les régions repliées en hélices α et en feuillet β . Les ronds pleins (●) indiquent la position des cystéines liant le $\text{Cu}^{(I)}$.

($\text{M}^{10}\text{TC}^{12}\text{GGC}^{15}$) et d’apoAtx1 ($\text{M}^{13}\text{TC}^{15}\text{SGC}^{18}$) est en accord avec les données expérimentales [Anastassopoulou *et al.*, 2004, Arnesano *et al.*, 2001a]. Les méthionines sont assez enfouies dans les deux apoprotéines (moins de 3%). Dans Atx1, les deux cystéines ont des expositions au solvant élevées et proches (C15 : $57.6\% \pm 14.2\%$, C18 : $73.3\% \pm 8.9\%$) comme parmi la famille de 35 conformères expérimentaux 1FES^{exp} (C15 : $61.4\% \pm 9.4\%$, C18 : $53.8\% \pm 19.4\%$). A l’inverse, seule la première cystéine (C12) est exposée dans apoHah1 ($73.8\% \pm 11.9\%$ en simulation, $90.3\% \pm$

6.7% pour les 30 structures expérimentales), la seconde étant très enfouie ($7.4\% \pm 9.8\%$ en simulation, $14.5\% \pm 6.4\%$ pour les 30 structures expérimentales).

L'effet de la liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ est local pour Hah1 et se restreint à la boucle L_1 et à la boucle L_5 où G59 devient plus enfouie (Fig. 7.29). Pour Atx1, les variations les plus importantes concernent aussi les résidus de L_1 de la forme apo. En effet, la moitié C-terminale de L_1 d'apoAtx1 est dans l'hélice α_1 de CuAtx1. La mobilité de ces résidus ainsi que leur exposition au solvant subissent donc de grands changements. En outre, L40 (L_3) et T63 (L_5) deviennent plus exposées au solvant. Bien que les variations soient opposées entre Hah1 et Atx1, il semblerait que la présence de l'ion métallique ait un impact sur la boucle L_5 . Il existe donc une interaction entre L_1 et L_5 , due à la présence du métal, qui entraîne des orientations différentes des chaînes latérales de L_5 par rapport aux molécules d'eau environnantes.

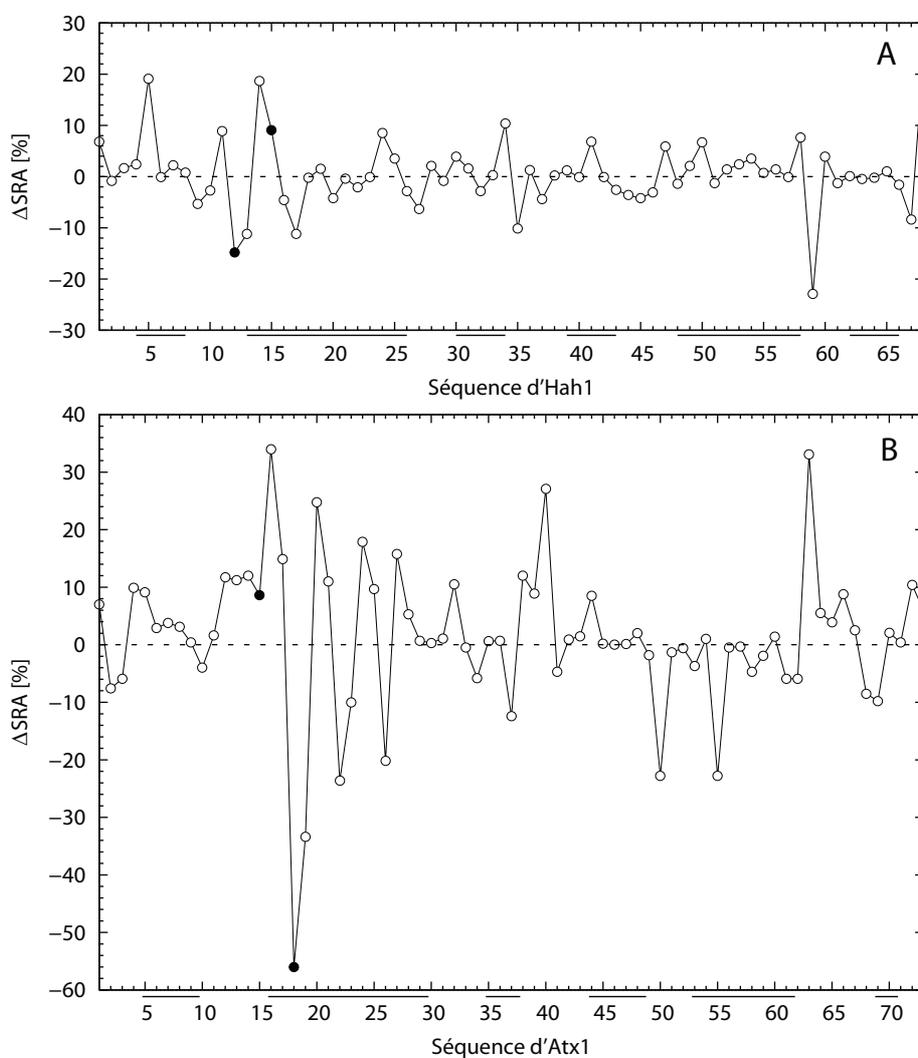


FIG. 7.29 – Variations de la surface relative accessible au solvant (ΔSRA) des chaînes latérales des résidus d'Hah1 (**A**) et d'Atx1 (**B**) lorsque le $\text{Cu}^{(I)}$ est lié. $\Delta\text{SRA} = \text{SRA}_{\text{Cu}} - \text{SRA}_{\text{apo}}$. Les traits horizontaux sous les graphiques indiquent les régions repliées en hélices α et en feuillet β dans les formes holo. Les ronds pleins (\bullet) indiquent la position des cystéines liant le $\text{Cu}^{(I)}$.

Quand le $\text{Cu}^{(I)}$ est lié aux protéines, les variations des SRA des cystéines suivent la même tendance pour les deux chaperones : la première devient plus exposée alors que la seconde devient plus enfouie. Le changement le plus spectaculaire se produit pour Atx1 où $\Delta\text{RSA}_{\text{C18}} = -56\%$. *In fine*, chacune des deux cystéines a une accessibilité similaire dans les deux protéines : la première cystéine est exposée à environ 60% et la seconde à 16%.

La SRA de M10 n'est pas affectée par la présence du métal dans CuHah1 ($\Delta\text{SRA} = -2.7\%$), elle reste enfouie. Pour Atx1, $\Delta\text{SRA}_{\text{M13}} = 11.2\%$, soit $\text{SRA}_{\text{M13}} = 11.7 \pm 3.5\%$ dans CuAtx1 : c'est davantage que dans la structure RMN 1FD8 où l'accessibilité de M13 est inférieure à 5%. Néanmoins, l'écart reste modéré et M13 est plutôt enfouie. Dans les formes apo et holo d'Hah1 et d'Atx1, la méthionine du motif MXCXXC est un résidu peu ou pas accessible au solvant.

Globalement, les propriétés d'accessibilité au solvant extraites des simulations et des structures résolues expérimentalement concordent.

Complexation du $\text{Cu}^{(I)}$ par Hah1 et Atx1

La liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ à Hah1 et à Atx1 affecte principalement les résidus de la boucle L_1 . Leur mobilité est fortement réduite et leurs mouvements sont davantage corrélés en présence de métal par rapport aux formes apo correspondantes. La chélation du $\text{Cu}^{(I)}$ structure ainsi la boucle L_1 .

Hah1 subit peu de réarrangements conformationnels entre les formes apo et liée au $\text{Cu}^{(I)}$. Ils se localisent essentiellement dans les boucles. En revanche, Atx1 fait l'objet d'un changement de structure plus important réparti sur l'ensemble de la protéine, avec notamment un triplement de la longueur de l'hélice α_1 aux dépens des boucles L_1 et L_2 aux extrémités N- et C-terminales.

Dans le motif de liaison du métal MXCXCC, la méthionine se révèle relativement enfouie pour les deux protéines, indépendamment de la présence ou de l'absence de cuivre. Les deux cystéines ont des accessibilités au solvant variables dans les formes apo (les deux sont très exposées dans apoAtx1 alors que seule la première l'est dans apoHah1), mais similaires dans les formes holo : la première cystéine est relativement exposée, tandis que la seconde est plutôt enfouie.

La liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ révèle des interactions de la boucle L_1 avec les boucles L_3 et L_5 . La présence de cuivre fait apparaître ou renforce les corrélations des mouvements de L_1 avec L_3 et L_5 . L'accessibilité au solvant de ces dernières est significativement affectée par la complexation du $\text{Cu}^{(I)}$ car, par rapport aux apoprotéines correspondantes, L_5 devient plus exposée dans CuAtx1 mais moins dans CuHah1. ■

7.3.2 Liaison du Hg^(II) sur une chaperone à mercure, MerP

7.3.2.1 Repliement de MerP

Le repliement de MerP détaillé sur le tableau 7.16, est en accord avec celui décrit par Steele et Opella [Steele et Opella, 1997]. L'hélice α_1 est toutefois de trois résidus plus longue dans HgMerP simulée (elle ne commence qu'au résidu 19 dans le repliement déduit de la famille de conformères RMN). Les éléments de structure secondaire ne sont pas affectés par la présence du métal, contrairement à Atx1 et Hah1 où l'hélice α_1 est plus étendue dans les formes métallées. Les cystéines qui complexent l'ion Hg^(II) sont aux positions 14 et 17. Leur comportement est le même que pour Hah1 : C14 reste dans la boucle L_1 et C17 appartient à α_1 .

Eléments de structure secondaire	apoMerP	HgMerP
β_1	2-8	2-8
α_1	16-27	16-28
β_2	31-37	33-35
β_3	42-48	42-48
α_2	54-64	54-64
β_4	70	69-70

TAB. 7.16 – Eléments de structure secondaire de MerP simulée sous les formes apo et liée au Hg^(II).

7.3.2.2 Effets dynamiques

• RMSF des positions des atomes C_α

Les mobilités des atomes C_α des résidus d'apoMerP et d'HgMerP sont différentes (Fig.7.30). Alors que la liaison du Cu^(I) rigidifie la boucle L_1 d'Atx1 et d'Hah1, l'effet du mercure est moins net. La flexibilité de la boucle L_1 ne change pas, et le RMSF de C14 reste de 0.8 Å environ. C17 est un peu plus mobile dans HgMerP (RMSF=0.7 Å) que dans apoMerP (RMSF \approx 0.5 Å), contrairement à CuAtx1 et CuHah1 où C18 et C15 respectivement sont moins mobiles par rapport à la forme apo. En outre, la flexibilité des aminoacides de la boucle L_3 s'est accrue d'au moins 0.6 Å, le maximum étant pour F38 (RMSF_{apo} \approx 0.5 Å, RMSF_{Hg} \approx 1.5 Å).

Ces observations sont en partiel accord avec Steele et Opella [Steele et Opella, 1997] qui ont montré que les différences entre les deux formes de MerP sont localisées au niveau de la séquence M¹²TC¹⁴AAC¹⁷, mais aussi au niveau des résidus 38-41 de la boucle L_3 et 64-66 de L_5 . Les simulations d'apoMerP et d'HgMerP révèlent un changement majeur de la mobilité de la boucle L_3 . La flexibilité des boucles L_1 et L_5 est quant à elle peu affectée par la présence du mercure(II). La modification la plus importante mise en évidence par ces mêmes auteurs concerne F38 (L_3) dont l'environnement varie selon la présence ou l'absence de mercure(II) lié à la protéine.

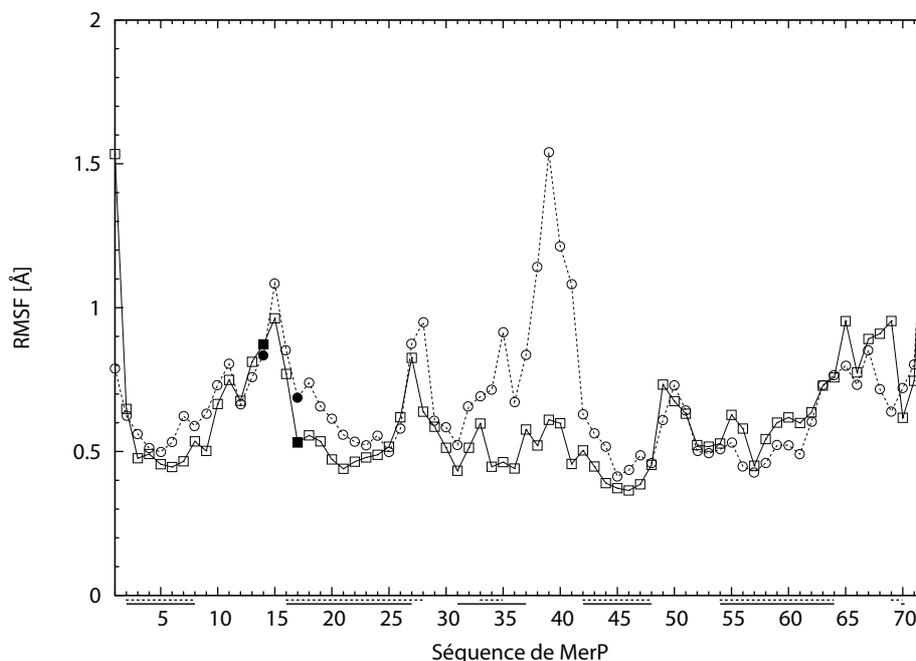


FIG. 7.30 – RMSF des atomes C_{α} des résidus des formes apo (\square) et liée au $Hg^{(II)}$ (\circ) de MerP. Les traits indiquent les régions repliées en hélices α et en feuillet β . Les carrés pleins indiquent la position des cystéines 14 et 17 qui lient le $Hg^{(II)}$.

La modification significative de la mobilité des résidus de L_3 , notamment de F38, se révèle analogue à celle précédemment constatée pour Hah1 et Atx1, où la présence de $Cu^{(I)}$ lié à L_1 change la dynamique de L35 et de L40 d'Hah1 et Atx1, respectivement. Ces trois acides aminés occupent des positions homologues dans les trois protéines et correspondent au résidu 42 de l'alignement de la page 17. Par conséquent, une caractéristique commune aux métallochaperones à $Cu^{(I)}$ et à $Hg^{(II)}$ apparaît ici : la liaison d'un métal a un effet sur les interactions que L_1 peut contracter avec L_3 . Toutefois, la flexibilité de L_3 est diversement affectée : alors que la mobilité de L40 de CuAtx1 et de F38 d'HgMerP est accrue par rapport aux formes apo ($\Delta RMSF \approx 0.3 \text{ \AA}$ et $\Delta RMSF \approx 1 \text{ \AA}$, respectivement), la chélation du cuivre dans CuHah1 rigidifie L_3 ($\Delta RMSF \approx -1 \text{ \AA}$ pour L35 entre CuHah1 et apoHah1).

• Cartes des corrélations croisées dynamiques

L'analyse des corrélations croisées dynamiques des formes apo et $Hg^{(II)}$ de MerP conduit aux mêmes conclusions que pour Atx1 et Hah1 (Fig. 7.31). Les mouvements des résidus des hélices α sont très corrélés jusqu'aux résidus $i + 4$. Le feuillet β induit des corrélations $\beta_1-\beta_3$, $\beta_1-\beta_4$ et $\beta_2-\beta_3$. Les mouvements de certains résidus de la boucle L_1 apparaissent fortement corrélés avec ceux des boucles L_3 dans apoMerP (corrélations entre les segments G11-C14 et F38-R41) et L_5 dans HgMerP (entre les segments V9-P10 et Y66-P68). Là encore, de façon similaire à CuHah1 et CuAtx1, les positions des aminoacides de la boucle L_1 sont plus corrélées quand $Hg^{(II)}$ est chélaté par MerP que lorsque la protéine est sous la forme apo. Cela est dû à la présence du

métal qui structure son environnement, *i.e.* les résidus de la boucle L_1 .

7.3.2.3 Effets structuraux

La superposition des structures moyennes d'apoMerP et d'HgMerP révèle une grande différence entre les deux protéines, essentiellement due à une orientation différente de la boucle L_1 et de l'hélice α_1 . En effet, le RMSD entre les deux formes dépasse 2 Å si on superpose les atomes du squelette peptidique de tous les résidus ou des éléments α/β (Tab. 7.17). En revanche, en ne conservant que les positions des acides aminés de l'hélice α_2 et du feuillet β , le RMSD chute à 0.97 Å.

Protéines	RMSD _{apo/Hg}			
	Tous les résidus [Å]	α/β^a [Å]	Sauf L_1^b [Å]	α_2/β^c [Å]
MerP simulée	2.77	2.27	2.50	0.96
MerP expérimentale	1.41	0.77	1.20	0.64

TAB. 7.17 – RMSD des positions des atomes du squelette peptidique (N,C,O,C α) entre les formes apo et Hg^(II) des structures moyennes (dont l'énergie a été minimisée) de MerP simulée et expérimentale [Steele et Opella, 1997]. ^a Seuls les résidus des hélices α et du feuillet β des formes apo sont pris en compte dans le calcul des RMSD. ^b Les résidus de la boucle L_1 des formes apo sont exclus du calcul des RMSD. ^c Seuls les résidus de l'hélice α_2 et du feuillet β des formes apo sont pris en compte dans le calcul des RMSD.

L'orientation de l'hélice α_1 dans HgMerP a changé au cours de la simulation par rapport aux conformères RMN (Fig. 7.32). Le RMSD des positions du squelette peptidique de tous les résidus entre les structures moyennes simulées et expérimentales est de 1.81 Å pour apoMerP et de 2.96 Å pour HgMerP, et de 1.00 Å et 2.40 Å respectivement si on ne tient compte que des résidus compris dans les éléments α et β . Les structures d'apoMerP sont très proches. En revanche, HgMerP montre une importante déviation par rapport à la structure moyenne issue des conformères RMN. Si les positions des aminoacides de l'hélice α_1 sont exclus du calcul du RMSD, alors sa valeur chute à 1.21 Å pour HgMerP.

Bien que l'effet soit ici moins marqué qu'entre apoAtx1 et CuAtx1, l'arrangement différent de l'hélice α_1 et de L_1 entre les formes apo et métallée de MerP s'avère être un trait commun aux métallochaperones à cuivre et à mercure. Si on compare les valeurs des RMSD calculés en incluant ou non les positions des résidus de L_1 , la superposition des apo- et des holoprotéines est améliorée de 10 à 15% en l'absence de L_1 , que ce soit pour MerP, Atx1 et Hah1. La liaison du métal structure ainsi la boucle L_1 .

7.3.2.4 Accessibilité au solvant

Le profil d'accessibilité au solvant des chaînes latérales d'apoMerP ressemble à celui d'apoHah1 : les résidus au centre de la boucle L_1 sont relativement exposés au solvant tandis que les N- et C-terminaux sont plus enfouis (SRA \approx

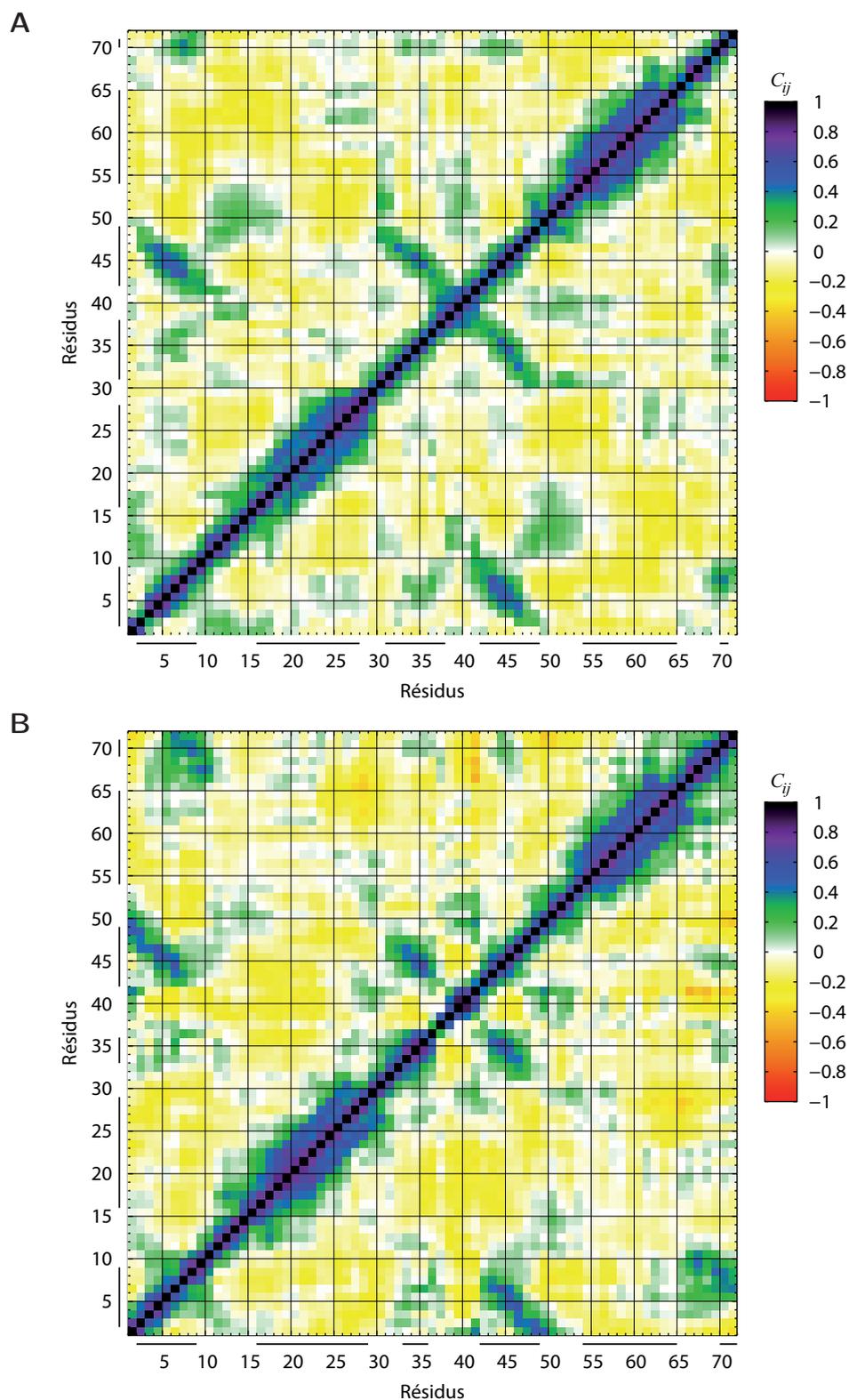


FIG. 7.31 – Cartes des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α d'apoMerP (**A**) et d'HgMerP (**B**). Les traits horizontaux sous le graphique symbolisent les éléments de structure secondaire β_1 , α_1 , β_2 , β_3 , α_2 et β_4 .

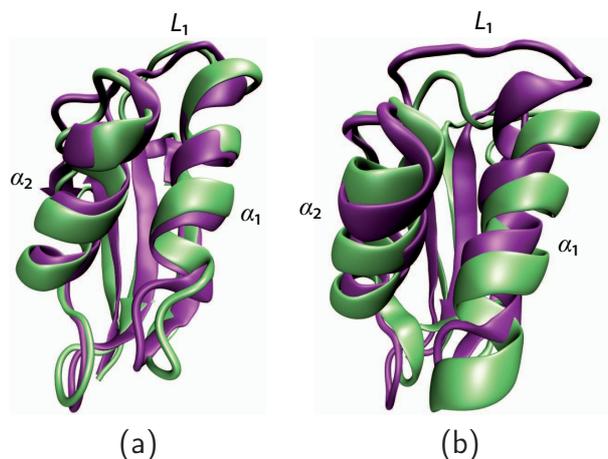


FIG. 7.32 – Superposition des structures moyennes simulées (vert) et expérimentales (violet) d'apo-MerP (a) et d'HgMerP (b). Les atomes N, C, O et C_{α} du squelette peptidique de tous les résidus sont utilisés pour les superpositions.

10% voire moins). Les deux cystéines C14 et C17 ont des expositions opposées, comparables à celle des conformères RMN, que l'on retrouve dans les formes apo d'Hah1 [Anastassopoulou *et al.*, 2004] et de CopZ, chez *Enterococcus hirae* [Wimmer *et al.*, 1999] et chez *Bacillus subtilis* [Banci *et al.*, 2003a]; à savoir la première cystéine exposée au solvant ($SRA_{C14} = 56\%$) et la seconde enfouie ($SRA_{C17} = 0$). En revanche, contrairement à Atx1 et à Hah1, l'exposition de la méthionine 12 est particulière car elle est relativement exposée, aussi bien au cours de la simulation (42%) que dans les conformères RMN résolus par Steele *et al.* [Steele et Opella, 1997] (49%). Le résidu E39 de la boucle L_3 est également très exposé ($SRA=82\%$).

Quand le mercure(II) est chélaté (Fig. 7.33), les changements majeurs ont lieu dans les boucles L_1 , L_2 et L_3 , de façon similaire à ce qui est observé dans les structures RMN. C17 devient plus accessible au solvant ($\Delta SRA = 25\%$) comme dans CuAtx1 et CuHah1, tandis M12 perd toute exposition au solvant ($\Delta SRA = -42\%$), entraînant un basculement de G11 vers le solvant ($SRA=61\%$) (comme dans la structure RMN d'HgMerP). Contrairement à CuHah1 et CuAtx1, la première cystéine (C14) ne subit qu'une faible variation de son accessibilité relative ($\Delta SRA = 5\%$). Néanmoins on retrouve dans les holoprotéines des SRA du même ordre de grandeur pour les cystéines : environ 60% pour la première, et 20% pour la seconde (dans HgMerP elle est plus exposée (25%) que dans CuHah1 et CuAtx1 (16%)).

Quant à la boucle L_3 , F38 s'expose davantage au solvant ($SRA_{apo} = 7\%$, $SRA_{Hg} = 54\%$) alors que G37 s'enfouit ($SRA_{apo} = 44\%$, $SRA_{Hg} = 14\%$). L'interaction $L_1 - L_3$ est ici à nouveau mise en lumière dans HgMerP.

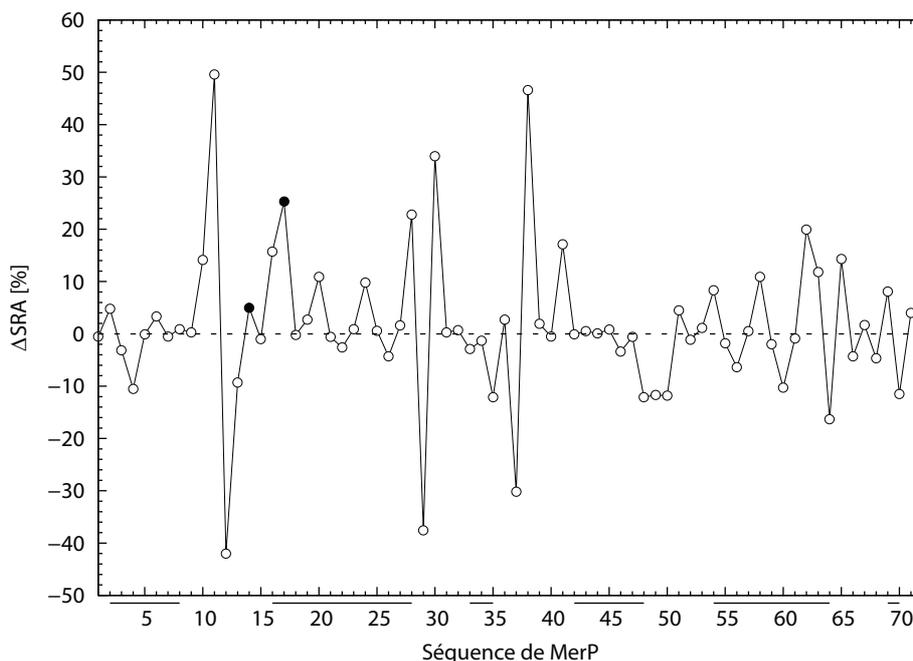


FIG. 7.33 – Variations de la surface relative accessible au solvant (ΔSRA) des chaînes latérales des résidus de MerP lorsque le $Hg^{(II)}$ est lié. $\Delta SRA = SRA_{Hg} - SRA_{apo}$. Les traits horizontaux sous le graphique indique les régions repliées en hélices α et en feuillet β dans $HgMerP$. Les ronds pleins (●) indiquent la position des cystéines liant le $Hg^{(II)}$.

Complexation du $Hg^{(II)}$ par MerP

La liaison du $Hg^{(II)}$ à MerP ne diminue pas la flexibilité de la boucle L_1 , à la différence du $Cu^{(I)}$ pour Hah1 et Atx1. Seule la dynamique de la boucle L_3 est affectée, notamment pour F38 qui est plus mobile dans $HgMerP$ que dans apoMerP.

De façon similaire à Hah1 et à Atx1, des interactions de L_1 sont également mises en évidence avec L_3 et L_5 . Les mouvements des acides aminés de L_1 sont corrélés avec ceux de ces deux boucles, aussi bien dans apoMerP que dans $HgMerP$. En outre, l'exposition au solvant de F38 (L_3) est significativement augmentée en présence de mercure.

Le résidu de L_3 qui apparaît le plus sensible à la présence d'un métal dans Hah1, Atx1 et MerP, occupe une position homologue dans ces trois protéines : L35 dans Hah1, L40 dans Atx1 et F38 dans MerP.

Comme entre apoAtx1 et CuAtx1, la liaison du $Hg^{(II)}$ dans MerP crée une orientation de L_1 et de l'hélice α_1 différente de celle dans apoMerP. C'est la différence structurale majeure entre les deux formes de MerP.

Les cystéines du motif MXC^1XXC^2 d'Hah1, d'Atx1 et de MerP ont des accessibilités au solvant analogues dans CuHah1, CuAtx1 et $HgMerP$: C^1 est très exposée ($SRA \approx 60\%$) alors que C^2 est davantage enfouie ($SRA \approx 20\%$). La méthionine est toujours enfouie, quel que soit l'état de métallation, sauf pour apoMerP où elle est accessible. ■

7.3.3 Effet de la nature du métal

Des simulations de dynamique moléculaire des protéines Hah1, Atx1 et MerP ont été réalisées en présence d'un métal non natif pour chacune d'elles : Hg^(II) pour Hah1 et Atx1, Cu^(I) pour MerP. L'analyse croisée du comportement des holoprotéines natives et non natives devrait permettre de mettre en évidence des éléments déterminant la sélectivité (ou son absence) au métal natif pour chacune des protéines, à travers des comportements locaux ou globaux distincts entre Hah1 et Atx1 d'une part, et MerP d'autre part. En effet, localement, l'arrangement des atomes de la boucle L_1 , et du motif MXCXXC en particulier, peuvent déterminer la taille du site de complexation ou une seconde sphère de coordination différente entre Cu^(I) et Hg^(II). Plus globalement, les mouvements des boucles L_1 , L_3 et L_5 et leur accessibilité au solvant, ainsi que la structure des protéines, seraient également susceptibles d'influer sur la sélectivité en offrant une meilleure stabilisation de la protéine complexée au métal natif.

7.3.3.1 Repliement des protéines

Le repliement global des protéines n'est pas modifié quand un ion métallique, Cu^(I) ou Hg^(II), est complexé par les deux cystéines de la séquence MXCXXC. Le tableau 7.18 répertorie les éléments de structure secondaire des chaperones simulées en présence de leur métal non natif (par comparaison, les tableaux 7.14 (p.118) et 7.16 (p.129) les listent pour Hah1, Atx1 et MerP, dans les formes apo et métallée par l'ion natif).

Eléments de structure secondaire	HgHah1	HgAtx1	CuMerP
β_1	3-9	5-12	2-7
α_1	15-26	18-28	16-26
β_2	30-34	33-39	33-35
β_3	39-43	44-49	42-48
α_2	48-58	53-63	54-64
β_4	61-67	66-72	70-71

TAB. 7.18 – Eléments de structure secondaire d'HgHah1, d'HgAtx1 et de CuMerP. En gras, les changements majeurs de repliement dus à la liaison du métal.

La chélation d'un métal n'a d'effet que sur la boucle L_1 (et donc sur l'hélice α_1). Elle est plus étendue dans les formes Hg^(II) que dans les formes Cu^(I). Seule la seconde cystéine (C15 chez Hah1, C18 chez Atx1) est repliée en hélice α : c'est le premier résidu de α_1 . Quant à MerP, aucune modification n'est constatée, que la protéine soit sous la forme apo ou holo (Hg^(II) ou Cu^(I)).

7.3.3.2 Effets dynamiques

• RMSF des positions des atomes C_α

Les variations de la mobilité des C_α entre les états métallés et apo des trois métallochaperones sont représentées sur la figure 7.34.

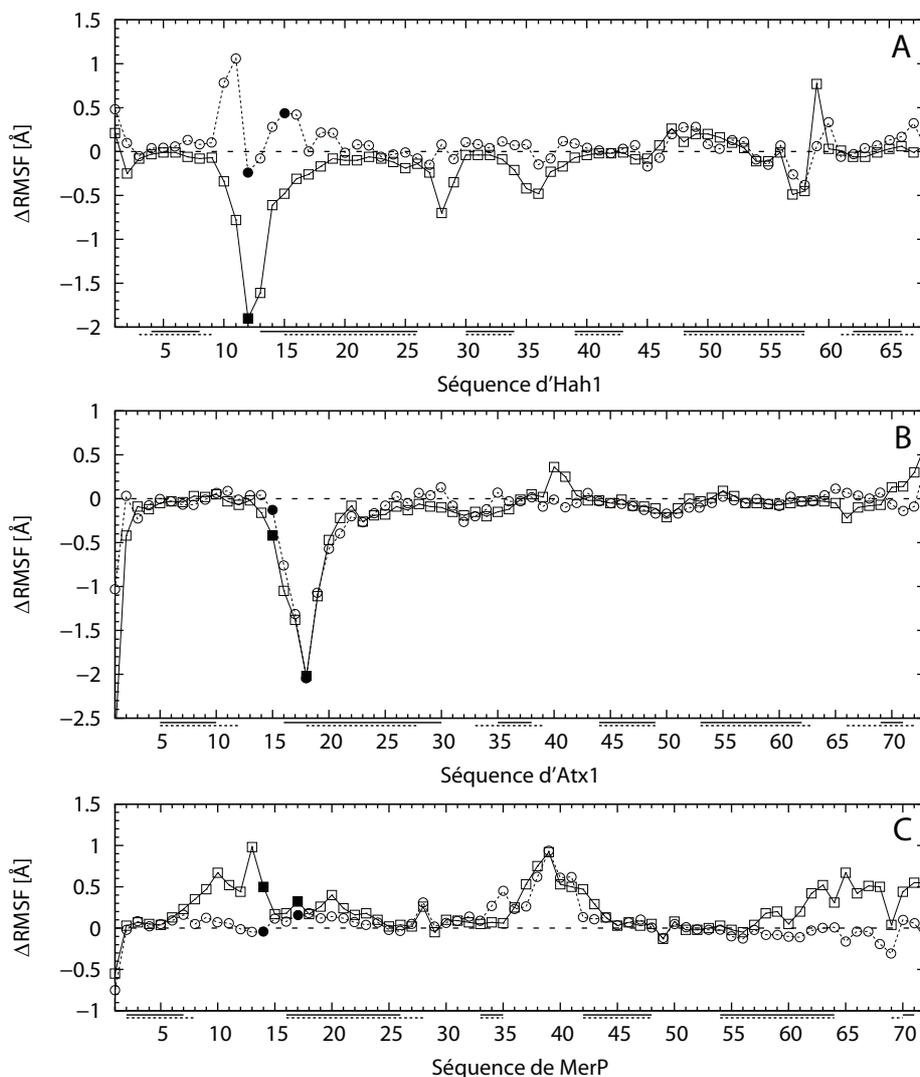


FIG. 7.34 – Variations des RMSF des atomes C_α entre les formes holo (Cu^{I} , Hg^{II}) et apo d'Hah1 (A), d'Atx1 (B) et de MerP (C). (\ominus) $\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_{\text{Cu}} - \text{RMSF}_{\text{apo}}$; (\circ) $\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_{\text{Hg}} - \text{RMSF}_{\text{apo}}$. Les traits horizontaux sous les graphiques indiquent les régions repliées en hélices α et en feuillet β dans les formes liées au Cu^{I} (—) ou au Hg^{II} (.....). Les symboles pleins indiquent la position des cystéines complexant les métaux.

Pour toutes les métallochaperones, la liaison d'un ion métallique modifie essentiellement la flexibilité de la boucle L_1 et la région N-terminale de l'hélice α_1 (en bordure de L_1).

Pour les chaperones à cuivre, la liaison de Hg^{II} ne produit pas les mêmes effets

que Cu^(I). La mobilité des résidus de la boucle L_1 d'HgAtx1 et de CuAtx1 est fortement réduite comparée à celle d'apoAtx1, mais d'amplitude égale (Fig. 7.34B). En revanche, la flexibilité de cette boucle dépend de la nature du métal chez Hah1 (Fig. 7.34A). Alors que Cu^(I) rigidifie L_1 , Hg^(II) ne change pas voire accroît la mobilité des acides aminés de L_1 et d' α_1 en N-terminal. M10 et T11 sont davantage mobiles ($\Delta\text{RMSF} \approx 1 \text{ \AA}$), C15 également mais dans une moindre mesure ($\Delta\text{RMSF} = 0.4 \text{ \AA}$). Quant à L35 et P36 (L_3), ainsi que G59 (L_5) qui ont leur mobilité respectivement restreinte et accrue dans CuHah1, on n'observe aucune de différence entre les formes apo et Hg^(II).

Le comportement de MerP semble analogue à celui d'Hah1 (Fig. 7.34C). La complexation du métal non natif (Cu^(I) pour MerP) augmente la flexibilité de la boucle L_1 , l'effet étant là encore le plus important pour la thréonine 13 précédant la première cystéine liant le métal ($\Delta\text{RMSF} \approx 1 \text{ \AA}$), tandis que C14 et C17 ne subissent guère de changement. La boucle L_3 est aussi mobile dans CuMerP que dans HgMerP.

L'autre différence notable concerne les résidus 65-68 de L_5 . Par rapport à apoMerP, leur mobilité augmente dans CuMerP alors qu'elle est inchangée dans HgMerP.

• Cartes des corrélations croisées dynamiques

Dans CuHah1 et CuAtx1, la liaison du Cu^(I) a trois effets majeurs par rapport aux formes démétallées : (i) corrélation renforcée entre les positions des C_α des résidus de la boucle L_1 ; (ii) apparition ou renforcement des corrélations entre L_1 et L_3 ; (iii) apparition ou augmentation d'une corrélation assez forte ($C_{ij} \approx 0.6$) entre la partie N-terminale de L_1 (approximativement au niveau de la méthionine du motif MTCXXC) avec L_5 . Le constat diffère pour CuMerP (Fig. 7.35) qui voit les corrélations entre les segments G11-C14 (L_1) et F38-R41 (L_3) diminuées par rapport à apoMerP et où aucune corrélation L_1 - L_5 ne se distingue (on note même une faible anticorrélation, $C_{ij} \approx -0.5$).

Dans HgMerP, seule la corrélation L_1 (V9, P10)– L_5 (Y66-P68) est notable (très faible corrélation $L_1 - L_3$). Les états liés à Hg^(II) d'Atx1 et d'Hah1 ne montrent pas de corrélations entre les résidus de la boucle L_1 et ceux de L_3 ni de L_5 . Pour Atx1, les corrélations de N10-V12 (L_1) avec Q43 (L_3) et E66-R68 (L_5) observées dans la forme Cu^(I) subsistent dans HgAtx1, mais le segment N10-V12 est structuré dans le brin β_1 quand Hg^(II) est chélaté (Fig. 7.36).

Par ailleurs, la structuration locale autour du métal varie. La complexation du Cu^(I) étend les corrélations entre les positions des C_α jusqu'à 2-3 résidus avant et après les deux cystéines qui le lient. A l'inverse, la liaison de Hg^(II) n'induit pas de corrélation accentuée autour du site CXXC. Les corrélations au niveau de ce motif sont similaires à celles observées pour tous les résidus quel que soit le repliement.

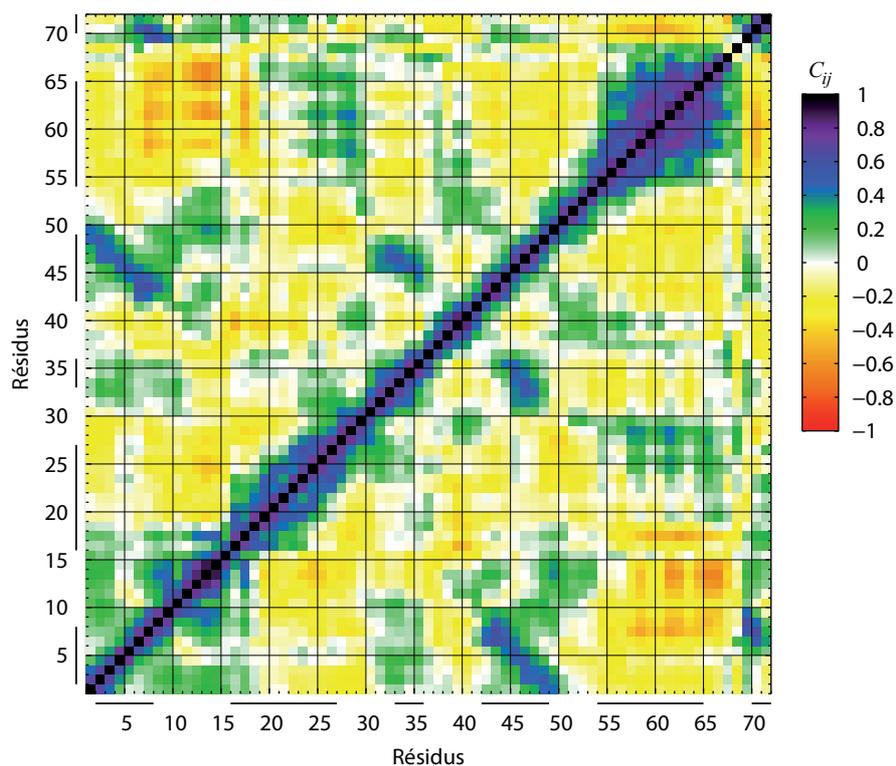


FIG. 7.35 – Carte des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α de CuMerP. Les traits horizontaux et verticaux, de part et d'autre du graphique, symbolisent les éléments de structure secondaire β_1 , α_1 , β_2 , β_3 , α_2 et β_4 .

7.3.3.3 Effets structuraux

Les structures des protéines sous leur forme apo et holo (complexées au $\text{Cu}^{(I)}$ ou au $\text{Hg}^{(II)}$) sont comparées pour tenter de mettre en évidence une différence entre les formes holo natives (CuHah1, CuAtx1 et HgMerP) et non natives (HgHah1, HgAtx1 et CuMerP). Deux niveaux d'analyse sont étudiés : un premier global, où l'ensemble des structures sont superposées, et un second local, centré sur le motif MXCXXC de la boucle L_1 . Ce motif constitue la seconde sphère de coordination des métaux.

• Comparaison des structures des protéines

Comparaison des protéines non natives en métal

Les RMSD calculés entre les positions des atomes du squelette peptidique des structures moyennes d'Atx1 et d'Hah1 sous leurs formes apo et liée au mercure(II), sont reportés sur le tableau 7.19. Comme pour les formes complexées au $\text{Cu}^{(I)}$, Hah1 ne subit pas de modifications importantes de structure et les RMSD entre apoHah1 et HgHah1 sont faibles (1.45 Å en superposant tous les atomes du squelette peptidique de tous les aminoacides). Quant à Atx1, l'orientation des hélices α est différente dans la forme complexée au $\text{Hg}^{(II)}$ par rapport à l'apoprotéine, de façon similaire à CuAtx1. Ainsi le RMSD entre apoAtx1 et HgAtx1 est assez élevé (2.22 Å en ne gardant que les éléments α et β). Il diminue à 1.12 Å en excluant les résidus des hélices α du calcul

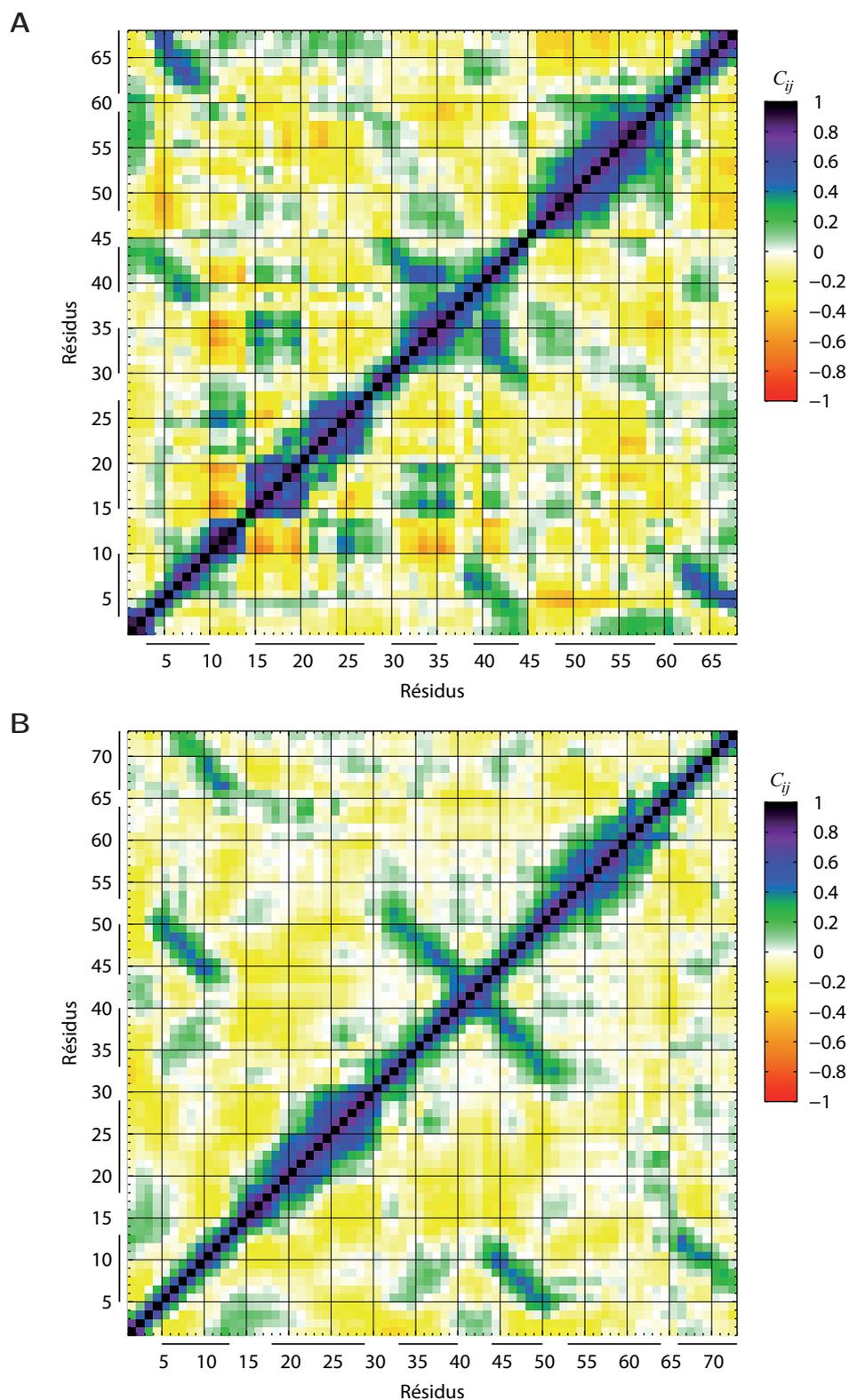


FIG. 7.36 – Cartes des corrélations croisées dynamiques des positions des atomes C_α de HgHah1 (**A**) et de HgAtx1 (**B**). Les traits horizontaux et verticaux, de part et d'autre du graphique, symbolisent les éléments de structure secondaire β_1 , α_1 , β_2 , β_3 , α_2 et β_4 .

du RMSD.

Protéines	RMSD _{apo/Hg}			
	Tous les résidus [Å]	α/β^a [Å]	Sauf L_1^b [Å]	α_2/β^c [Å]
Hah1	1.45	0.91	1.31	0.85
Atx1	3.43	2.22	2.99	0.72

TAB. 7.19 – RMSD des positions des atomes du squelette peptidique (N,C,O,C $_{\alpha}$) entre les formes apo et Hg^(II) des structures moyennes (dont l'énergie a été minimisée) d'Atx1 et d'Hah1. ^a Seuls les résidus des hélices α et du feuillet β des formes apo sont pris en compte dans le calcul des RMSD. ^b Les résidus de la boucle L_1 des formes apo sont exclus du calcul des RMSD. ^c Seuls les résidus de l'hélice α_1 et du feuillet β des formes apo sont pris en compte dans le calcul des RMSD.

Quant à CuMerP (Tab. 7.20), comme dans le cas d'HgMerP, l'orientation de l'hélice α_1 par rapport à α_2 a changé, d'où les valeurs importantes des RMSD (2.36 Å sur l'ensemble des résidus, 1.71 Å pour les éléments α/β). De plus, la structure moyenne de CuMerP se superpose d'autant moins bien à celle d'apoMerP que la position du brin β_2 s'est aussi un peu modifiée (RMSD = 1.50 Å en superposant les résidus du feuillet β et de α_2 , contre 0.96 Å entre apoMerP et HgMerP).

Protéines	RMSD _{apo/Cu}			
	Tous les résidus [Å]	α/β^a [Å]	Sauf L_1^b [Å]	α_2/β^c [Å]
MerP	2.36	1.71	2.24	1.50

TAB. 7.20 – RMSD des positions des atomes du squelette peptidique (N,C,O,C $_{\alpha}$) entre les formes apo et Cu^(I) des structures moyennes (dont l'énergie a été minimisée) de MerP. ^a Seuls les résidus des hélices α et du feuillet β des formes apo sont pris en compte dans le calcul des RMSD. ^b Les résidus de la boucle L_1 des formes apo sont exclus du calcul des RMSD. ^c Seuls les résidus de l'hélice α_2 et du feuillet β des formes apo sont pris en compte dans le calcul des RMSD.

Comparaison des holoprotéines

Les structures Cu^(I) et Hg^(II) se révèlent assez différentes pour une même protéine (essentiellement pour Atx1 et MerP) si on se réfère aux RMSD calculés sur l'ensemble des acides aminés du tableau 7.21 (RMSD > 1.7 Å). Cette disparité ne s'explique pas seulement par un changement de l'environnement de l'ion métallique (L_1), puisque les valeurs des RMSD demeurent importantes même quand les aminoacides de L_1 sont exclus pour évaluer les RMSD (RMSD > 1.5 Å).

Dans le cas de MerP, encore une fois, l'orientation de l'hélice α_1 est la raison majeure de cette différence. Le RMSD est de 0.97 Å si l'on ne superpose que les brins β et α_2 . L'orientation d' α_1 varie ainsi selon l'absence ou la présence de métal, et selon la nature de celui-ci.

Pour Hah1, la différence majeure réside aussi dans la position de α_1 qui est décalée selon l'axe de l'hélice, entre CuHah1 et HgHah1. Toutefois, les deux structures se

Protéines	RMSD _{Cu/Hg}			
	Tous les résidus [Å]	α/β^a [Å]	Sauf L_1^b [Å]	α_2/β^c [Å]
Hah1	1.73	0.98	1.53	0.88
Atx1	2.59	2.14	2.57	1.61
MerP	2.24	1.91	1.92	0.97

TAB. 7.21 – RMSD des positions des atomes du squelette peptidique (N,C,O,C α) entre les formes Cu^(I) et Hg^(II) des structures moyennes (dont l'énergie a été minimisée) d'Hah1, d'Atx1 et de MerP. ^a Seuls les résidus des hélices α et du feuillet β des formes apo sont pris en compte dans le calcul des RMSD. ^b Les résidus de la boucle L_1 des formes apo sont exclus du calcul des RMSD. ^c Seuls les résidus de l'hélice α_2 et du feuillet β des formes apo sont pris en compte dans le calcul des RMSD.

superposent très bien si on considère tous les éléments α/β (RMSD = 0.98 Å). L'effet de la position de α_1 demeure minime.

Concernant Atx1, il y a davantage de disparités entre les formes Cu^(I) et Hg^(II) (RMSD = 2.59 Å sur tous les résidus). Les positions des boucles et de α_1 sont relativement différentes, car, en les excluant du calcul, la superposition des deux structures, le RMSD diminue de près de 1 Å (à 1.61 Å). Néanmoins, il reste important. C'est la position des deux hélices α qui change dans Atx1. En revanche, les positions moyennes des brins du feuillet β se superposent parfaitement. Le réarrangement conformationnel dû au métal non natif dans Atx1 est donc plus important que dans MerP et Hah1, et implique les boucles et les hélices α .

En conclusion, la chélation du mercure par Atx1 et Hah1, et du cuivre par MerP, n'entraîne pas de changements structuraux plus importants que la complexation dans le cas d'une complexation du métal natif. Hah1 subit peu de réarrangements conformationnels dû à la présence d'un métal, que ce soit Cu^(I) ou Hg^(II). Ce n'est pas le cas pour Atx1 et MerP où la position des deux hélices α , en plus de celles des boucles, varie en fonction de l'état de métallation.

• Comparaison des structures des motifs MXCXXC

Comparaison des formes apo et métallées

La conformation du motif MXCXXC varie en fonction de son état de métallation (Tab. 7.22). Elle change peu dans Hah1 car les RMSD des positions atomiques du squelette peptidique sont faibles entre les formes apo et holo : RMSD_{apo/Cu} = 1.25 Å et RMSD_{apo/Hg} = 1.17 Å. Les formes apo et métallées de MerP montrent davantage de différence avec des RMSD de 1.44 Å et de 1.80 Å entre l'état apo et les états liés respectivement au Hg^(II) et au Cu^(I). En revanche, les conformations du motif MXCXXC dans HgAtx1 et CuAtx1 diffèrent sensiblement de celle dans apoAtx1 avec des RMSD_{apo/holo} supérieurs à 2 Å.

Néanmoins, la superposition des conformations de chacune des formes holo d'une même métallochaperone montre que la structure locale autour des ions Cu^(I) et Hg^(II)

est assez proche du fait des faibles $\text{RMSD}_{\text{Hg}/\text{Cu}}$ sur les positions atomiques du squelette peptidique observés pour Hah1 (0.69 Å), Atx1 (1.29 Å) et MerP (1.20 Å).

De plus, la superposition de tous les atomes lourds du motif conduit à des RMSD très faibles, l'effet le plus saisissant étant pour Hah1 ($\text{RMSD}_{\text{Hg}/\text{Cu}} \approx 1$ Å). Par conséquent, les chaînes latérales adoptent des conformations voisines ou identiques au voisinage du métal chélaté, indépendamment de sa nature.

Protéines	$\text{RMSD}_{\text{apo}/\text{Cu}}$		$\text{RMSD}_{\text{apo}/\text{Hg}}$		$\text{RMSD}_{\text{Hg}/\text{Cu}}$	
	N,C,O,C $_{\alpha}$ ^a [Å]	non H ^b [Å]	N,C,O,C $_{\alpha}$ ^a [Å]	non H ^b [Å]	N,C,O,C $_{\alpha}$ ^a [Å]	non H ^b [Å]
Hah1	1.25	1.88	1.17	1.81	0.69	1.04
Atx1	2.50	4.46	2.19	3.87	1.29	1.64
MerP	1.80	2.78	1.44	2.79	1.20	1.66

TAB. 7.22 – RMSD des positions des atomes du motif MXCXXC entre les formes apo et Cu^(I), apo et Hg^(II), et Cu^(I) et Hg^(II) des structures moyennes (dont l'énergie a été minimisée) d'Hah1, d'Atx1 et de MerP. ^a Seuls les atomes des squelettes peptidiques sont inclus dans le calcul des RMSD. ^b Tous les atomes lourds (*i.e.* sauf les hydrogènes), sauf les ions Cu^(I) et Hg^(II), sont comptés pour le calcul des RMSD.

Comparaison par rapport à Hah1

Afin de pouvoir comparer la structure du motif MXCXXC dans les différentes protéines, la conformation du motif MXCXXC d'Hah1 à l'état apo, Cu^(I) ou Hg^(II) est prise comme référence dans les superpositions avec les structures correspondantes d'Atx1 et de MerP.

La comparaison de la structure moyenne du motif MXCXXC d'apoAtx1 ou d'apoMerP avec apoHah1 fait apparaître des conformations différentes, avec des $\text{RMSD}_{\text{apo}/\text{apoHah1}}$ supérieurs à 1.5 Å pour les positions des atomes de la chaîne peptidique (Tab. 7.23). En présence d'un métal, les structures moyennes des motifs sont beaucoup plus proches entre les divers protéines, particulièrement en présence de cuivre.

Protéines	$\text{RMSD}_{\text{apo}/\text{apoHah1}}$		$\text{RMSD}_{\text{Cu}/\text{CuHah1}}$		$\text{RMSD}_{\text{Hg}/\text{HgHah1}}$	
	Squelette peptidique [Å]	Atomes communs ^a [Å]	Squelette peptidique [Å]	Atomes communs ^a [Å]	Squelette peptidique [Å]	Atomes communs ^a [Å]
Atx1	2.20	3.98	0.48	0.70	1.17	1.29
MerP	1.56	2.12	0.35	0.93	1.32	1.57

TAB. 7.23 – RMSD des positions des atomes du motif MXCXXC entre les structures moyennes d'Hah1, d'Atx1 et de MerP, pour les formes apo, Cu^(I) et Hg^(II). Pour chacun des trois types de RMSD, la structure de référence est la conformation moyenne du motif dans Hah1. ^a Seuls les atomes lourds, sauf les ions Cu^(I) et Hg^(II), communs entre les 3 motifs M¹T²C³X⁴X⁵C⁶ sont superposés (*i.e.* tous les atomes de M¹, T², C³ et C⁶, et seuls les atomes N,C,O,C $_{\alpha}$ de X⁴ et X⁵).

La superposition de tous les atomes du motif et communs aux trois protéines,

suit la même tendance et révèle que les formes apo ont une orientation des résidus qui varie beaucoup d'une protéine à l'autre (Fig. 7.37a), alors que la chélation d'un ion métallique structure fortement le motif, davantage en présence du Cu^{I} ($\text{RMSD}_{\text{Cu}/\text{CuHah1}} < 1 \text{ \AA}$) (Fig. 7.37b) que du Hg^{II} ($\text{RMSD}_{\text{Hg}/\text{HgHah1}} \approx 1.3\text{-}1.6 \text{ \AA}$) (Fig. 7.37c).

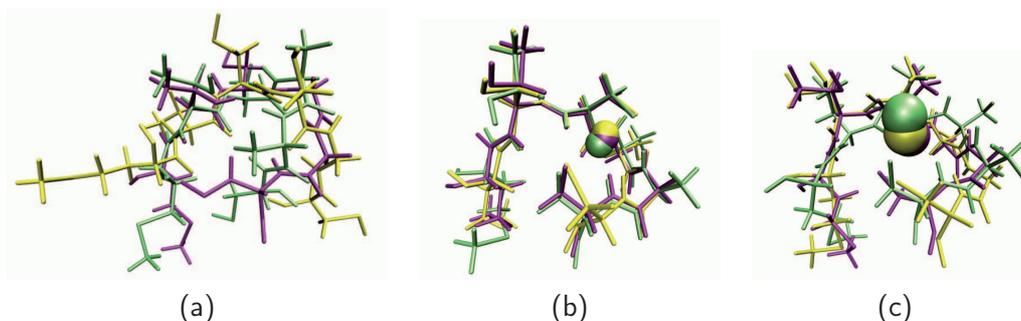


FIG. 7.37 – Superposition des structures moyennes du motif MTCXXC pour chacun des états de métallation d'Hah1 (violet), d'Atx1 (jaune) et de MerP (vert). (a) Superposition des formes apo; (b) Superposition des formes liées au Cu^{I} ; (c) Superposition des formes liées au Hg^{II} .

En conclusion, pour une même protéine, la structure locale du motif MXCXXC est différente entre la forme apo et les formes holo, mais les structures liées au Cu^{I} et au Hg^{II} sont très semblables. De surcroît, d'une protéine à l'autre, on retrouve des structures également très proches, davantage entre les formes complexées au Cu^{I} qu'entre celles chélatant le Hg^{II} . L'effet est tel que les conformations liées au Cu^{I} se superposent très bien, même les chaînes latérales des résidus communs à Hah1, Atx1 et MerP ont la même orientation.

7.3.3.4 Accessibilité au solvant

Les variations de l'accessibilité relative au solvant (ΔSRA) des chaînes latérales entre les formes holo et apo des trois métallochaperones sont reportées sur la figure 7.38. Quelle que soit la nature du métal chélaté, la tendance est la même pour les protéines Hah1, Atx1 et MerP. La nature du métal a peu d'effet sur les accessibilités au solvant. Les changements majeurs se situent au niveau des boucles.

Pour une même protéine, les variations de SRA des résidus de la boucle L_1 , calculées entre les formes apo et Cu^{I} ou Hg^{II} sont comparables et suivent les mêmes tendances quand un métal est lié, sans une quelconque influence de la nature du métal.

Ainsi, par rapport à apoHah1, dans CuHah1 et HgHah1, C12 s'enfouit un peu ($\Delta\text{SRA} \approx -20\%$) tandis que C15 s'expose davantage ($\Delta\text{SRA} \approx 10\%$).

Dans Atx1, l'accessibilité de la première cystéine (C15) reste presque inchangée comparée à la forme apo ($\text{SRA} \approx 60\%$). L'effet de la métallation est plus marquée pour C18, mais apparaît similaire entre CuAtx1 et HgAtx1. C18 est très accessible au solvant dans apoAtx1. La complexation d'un ion change profondément la conformation de C18 et l'enfouit (ΔSRA d'environ 60%).

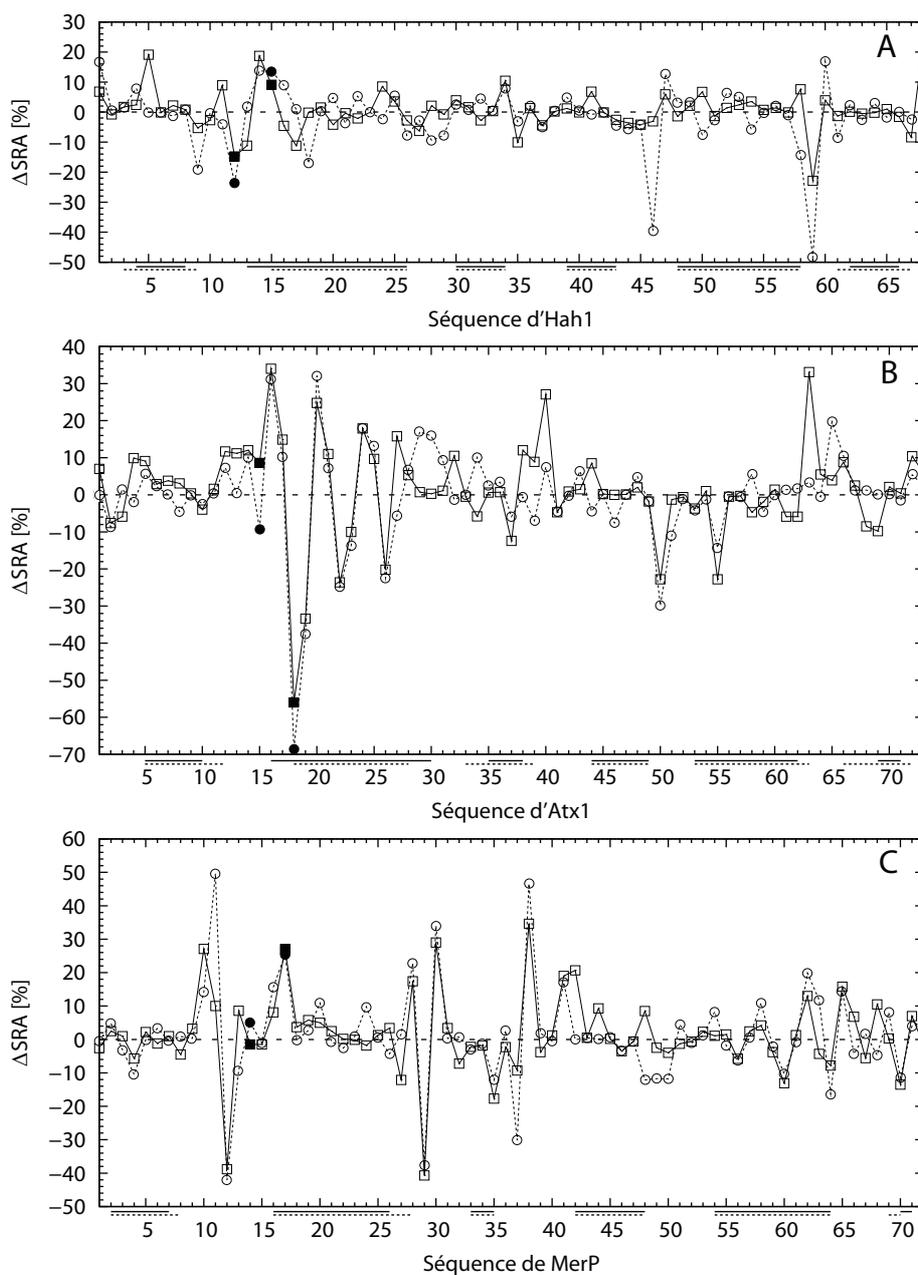


FIG. 7.38 – Variations de la surface relative accessible (Δ SRA) des chaînes latérales des résidus entre les formes holo (Cu^{I} , Hg^{II}) et apo d'Hah1 (**A**), d'Atx1 (**B**) et de MerP (**C**). (\square) Δ SRA = $\text{SRA}_{\text{Cu}} - \text{SRA}_{\text{apo}}$; (\circ) Δ SRA = $\text{SRA}_{\text{Hg}} - \text{SRA}_{\text{apo}}$. Les traits indiquent les régions repliées en hélices α et en feuillet β dans les formes liées au Cu^{I} (—) ou au Hg^{II} (-----). Les symboles pleins indiquent la position des cystéines complexant les métaux.

La tendance pour MerP s'avère la même que pour Atx1 : alors que la première cystéine (C14) ne subit pas de modification sensible de son accessibilité au solvant (Δ SRA < 5%), celle de la seconde (C18) est relativement affectée par la présence d'un métal (Δ SRA \approx 26%).

In fine, on retrouve des accessibilités relatives de même ordre de grandeur pour chacune des cystéines selon la nature du métal lié (Tab. 7.24).

Formes	$\langle \text{SRA}_{C^1} \rangle$			$\langle \text{SRA}_{C^2} \rangle$		
	Hah1 [%]	Atx1 [%]	MerP [%]	Hah1 [%]	Atx1 [%]	MerP [%]
apo	74 ± 12	58 ± 14	58 ± 8	7 ± 10	74 ± 9	0
Cu ^(I)	59 ± 3	66 ± 4	55 ± 4	17 ± 7	17 ± 5	27 ± 9
Hg ^(II)	50 ± 17	49 ± 11	63 ± 6	21 ± 13	5 ± 3	23 ± 7

TAB. 7.24 – Surfaces relatives accessibles (SRA) moyennes des chaînes latérales des cystéines du motif MTCXXC d’Hah1, d’Atx1 et de MerP simulées sous les formes apo et holo.

La méthionine du motif MXCXXC (M10 dans Hah1, M13 dans Atx1 et M12 dans MerP), reste toujours enfouie pour toutes les protéines quel que soit l’état de métallation, sauf pour apoMerP où elle est exposée à 42%. Elle est enfouie dans les deux états holo (SRA < 4%).

Les autres boucles subissent également des changements d’accessibilité. Dans HgHah1, H46 (L_4) est plus enfouie que dans apoHah1 ($\Delta\text{SRA} = -39\%$). La modification de la SRA de G59 (L_5) dans HgHah1 ($\Delta\text{SRA} = -49\%$) est plus importante que dans CuHah1 ($\Delta\text{SRA} = -23\%$), certainement pour s’adapter à la plus grande exposition de K60 dans HgHah1 ($\Delta\text{SRA} = 18\%$).

Dans Atx1, K65 (L_5) devient plus exposée au solvant dans HgAtx1 par rapport à apoAtx1 ($\Delta\text{SRA}_{\text{Hg-apo}} = 20\%$) et à CuAtx1 ($\Delta\text{SRA}_{\text{Cu-apo}} = 4\%$). Contrairement à CuAtx1, L40 (L_3) est aussi exposée dans HgAtx1 que dans apoAtx1 (SRA $\approx 35\%$). Enfin, les accessibilités au solvant de E29 et G30 (L_2) dans CuMerP et d’HgMerP sont analogues, ainsi que pour F38 (L_3). Pour cette dernière, l’exposition augmente de 40% en moyenne par rapport à apoMerP.

Le motif consensus MXCXXC est relativement exposé au solvant ($\langle \text{SRA} \rangle \approx 40\%$), indépendamment de la présence ou de l’absence de métal chélaté, et en accord avec les structures expérimentales disponibles (apoHah1 1TL5, CuHah1 1TL4, apoAtx1 1FES^{exp}, CuAtx1 1FD8, HgAtx1 1CC8, apoMerP 1AFI et HgMerP 1AFJ).

On note également une variabilité marquée des SRA d’un acide aminé à l’autre du motif. Par exemple, pour Atx1 (Fig. 7.39A), alors que M13 et C18 sont enfouies dans les formes holo, C15 et G17 sont relativement exposées (SRA > 60%). Une certaine différence existe pour CuAtx1 dont le motif apparaît plus exposé dans la simulation que dans la structure RMN 1FD8. Les SRA moyennes par résidu se révèlent globalement plus élevées de 15-20% dans la simulation que dans la structure RMN moyenne, et même davantage pour T14 et G17 si on compare les profils d’accessibilité au solvant de la figure 7.39. La surestimation de l’accessibilité du motif MXCXXC de CuAtx1 provient probablement du fait que les conditions expérimentales qui ont permis la résolution de la structure de CuAtx1, comportaient certainement du DTT complexé au Cu^(I). Le DTT participait peut-être à l’écrantage des résidus de la boucle de CuAtx1 par rapport à l’environnement.

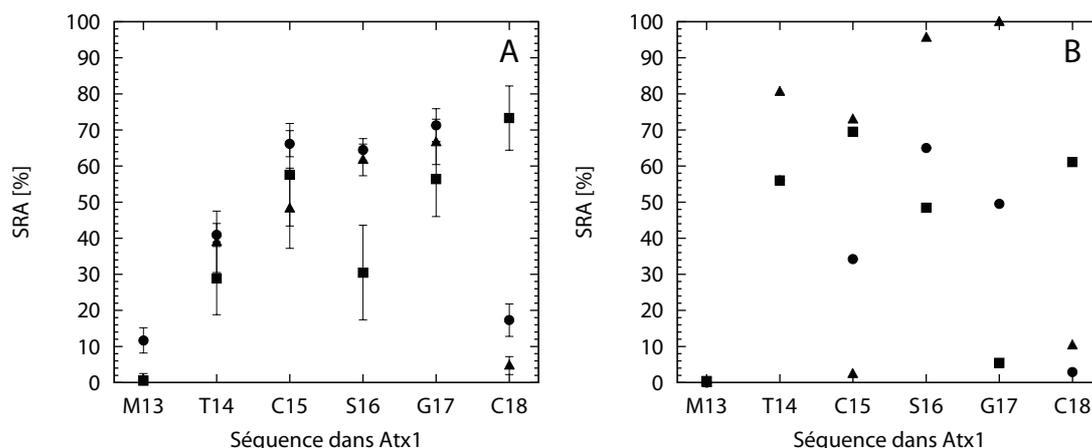


FIG. 7.39 – Surfaces relatives accessibles (SRA) moyennes des chaînes latérales du motif MTCXXC d'Atx1 calculées à partir des structures simulées (A) et expérimentale (B). (■) ApoAtx1, (●) CuAtx1, (▲) HgAtx1. Pour les structures expérimentales, les SRA sont calculées à partir des structures 1FES, 1FD8 et 1CC8.

Les ions métalliques sont toujours totalement enfouis dans le site de chélation (SRA < 3%), aussi bien dans les formes simulées qu'observées expérimentalement.

En conclusion, globalement, l'exposition des résidus des protéines n'est pas sensiblement changée par la présence ou non d'un métal. La nature du métal n'a pas non plus d'effet significatif sur l'accessibilité au solvant des chaînes latérales. Les modifications les plus importantes concernent les résidus des boucles L_1 , L_3 et L_5 .

Le motif MXCXXC conserve en moyenne la même accessibilité au solvant quel que soit l'état de métallation des protéines (SRA \approx 40%). Les cystéines complexant le métal ont des expositions similaires dans Hah1, Atx1 et MerP quand un métal est lié, indépendamment de sa nature : la première cystéine du motif MXCXXC est très exposée (SRA 50%) alors que la seconde est plus enfouie (SRA \approx 20%). Dans les apo-protéines, bien que les accessibilités soient très variables d'une protéine à l'autre, la première cystéine est toujours très exposée au solvant alors que la seconde est enfouie, sauf pour apoAtx1 où elle est complètement accessible au solvant.

Effet de la nature du métal lié à Hah1, Atx1 et à MerP

Quand le $\text{Cu}^{(I)}$ ou le $\text{Hg}^{(II)}$ se lient à Hah1, Atx1 et MerP, les effets sont globalement voisins pour chaque protéine.

La flexibilité des protéines est principalement changée au niveau de la boucle L_1 . Dans Atx1, la liaison des deux métaux contribue à rigidifier autant la structure. En revanche, l'effet est plus intéressant pour Hah1 et MerP car seul le métal natif contribue à réduire la flexibilité de la boucle L_1 . Ainsi le cuivre réduit la mobilité de L_1 dans Hah1, et le $\text{Hg}^{(II)}$ ne change pas la flexibilité de L_1 dans HgMerP comparé à apoMerP. A l'inverse, le $\text{Hg}^{(II)}$ augmente la flexibilité de L_1 dans HgHah1, de même pour le $\text{Cu}^{(I)}$ dans CuMerP. Le $\text{Cu}^{(I)}$ et le $\text{Hg}^{(II)}$ ont des effets opposés pour une même protéine. L'effet

pour les boucles L_3 et L_5 est par contre similaire pour les deux métaux dans une même protéine.

L'effet produit par la liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ et du $\text{Hg}^{(II)}$ sur la structure des protéines Hah1, Atx1 et MerP par rapport aux formes apo correspondantes, est de même ampleur, mais ne mène pas à des structures semblables. Néanmoins, localement, autour de l'ion, la conformation adoptée par le motif MXCXXC se révèle similaire pour une même protéine, qu'elle soit en présence de $\text{Cu}^{(I)}$ ou de $\text{Hg}^{(II)}$. En outre, les structures métallées du motif MXCXXC sont très proches d'une protéine à l'autre, pour un même métal, avec un effet plus structurant pour le $\text{Cu}^{(I)}$ que pour le $\text{Hg}^{(II)}$.

L'exposition au solvant des résidus des holoprotéines n'est pas modifiée par la nature du métal. La présence du $\text{Cu}^{(I)}$ et du $\text{Hg}^{(II)}$ changent majoritairement l'accessibilité des boucles L_1 , L_3 et L_5 . Le motif MXCXXC est relativement exposé ($\text{SRA} \approx 40\%$) dans les formes apo et holo d'Hah1, d'Atx1 et de MerP, alors que l'ion métallique est totalement enfoui. ■

7.4 La méthionine du motif MTCXXC et le cœur hydrophobe

Dans les séquences des métallochaperones alignées sur la figure 2.2 (§2, p. 17), une douzaine de résidus hydrophobes sont très conservés, aussi bien chez les Eucaryotes que chez les Procaryotes, quelle que soit la nature du métal transporté par les métallochaperones. La plupart de ces résidus sont enfouis dans les protéines [Arnesano *et al.*, 2002]. Parmi eux, il y a la méthionine du motif MXCXXC. L'étude qui suit propose dans un premier lieu de caractériser quelques propriétés structurales et dynamiques du cœur hydrophobe d'Hah1, d'Atx1 et de MerP, puis d'analyser plus précisément la méthionine dans Hah1 pour tenter d'expliquer pourquoi ce résidu est si bien conservé.

7.4.1 Définition du cœur hydrophobe

Le repliement des protéines est souvent stabilisé par l'effondrement des résidus hydrophobes sur eux-mêmes qui forment alors un cœur (le cœur hydrophobe) riche en interactions d'empilement [Kwok et Hodges, 2003, Gerstman et Chapagain, 2005]. Le cœur hydrophobe peut conférer aux protéines des propriétés particulières. Par exemple, la rusticyanine chez *Thiobacillus ferrooxidans* est une protéine rédox liant le cuivre, particulièrement rigide. Une trentaine de résidus hydrophobes protègent son cœur où le cuivre est complexé, d'interactions avec le solvant et contribuent ainsi à rendre cette région relativement rigide et hydrophobe [Jimenez *et al.*, 2003].

Dans Hah1, Atx1 et MerP, les résidus appartenant au cœur hydrophobe ont été définis comme ceux qui, dans les formes apo des métallochaperones, ont une SRA moyenne de leur chaîne latérale inférieure à 10%. Les aminoacides du cœur hydrophobe d'Hah1, d'Atx1 et de MerP sont indiqués en rouge sur l'alignement de séquence

des trois protéines sur la figure 7.40 (l'alignement a été effectué avec le programme CLUSTALW 1.81¹). Les résidus du cœur hydrophobe occupent des positions analogues pour les trois protéines, et sont relativement conservés. Ils sont presque tous compris dans les hélices α ou dans le feuillet β .

```

      5      10      15      20      25      30      35      40      45      50      55      60      65
Hah1  ---MPKHEFSVD-MTCGGCADAVSRVLNKLGG--VKYDIDLPNKKVCIESEHSMDTLLATLKKTG
Atx1  MAEIKHYQFNVV-MTCSGSGAVNKVLTKLEPDVSKIDISLEKQLVDVYTTLPYDFILEKIKKTG
MerP  --ATQTVTLAVPGMTCAACPITVKKALSKVEG-VSKVDVGFEKREAVVTFDDTKASVQKLTKATA

      70      75
Hah1  KTVSYLGLE-
Atx1  KEVR-SGKQL
MerP  DAGYPSSVKQ

```

FIG. 7.40 – Alignement des séquences d'Hah1, d'Atx1 et de MerP (réalisé avec le programme CLUSTALW). Les résidus du cœur hydrophobe sont soulignés. Le motif consensus MXCXXC est situé entre les aminoacides aux positions 14 et 19.

Pour certains résidus, la chaîne latérale est enfouie (RSA < 10%) mais ils ne sont pas comptés dans le cœur hydrophobe car, soit le résidu est polaire, soit il est hydrophobe mais trop loin des autres résidus enfouis pour interagir avec eux.

7.4.2 Propriétés dynamiques et structurales du cœur hydrophobe

7.4.2.1 Mobilité des atomes C_α du cœur hydrophobe

Les résidus du cœur hydrophobe d'Hah1, d'Atx1 et de MerP bougent très peu au cours des simulations, avec des RMSF moyens inférieurs à 1 Å. Leur mobilité n'est pas affectée par la présence d'un ion métallique chélaté. Par exemple, dans le cas de MerP, la mobilité de son cœur hydrophobe est de $0.5 \text{ \AA} \pm 0.1 \text{ \AA}$, $0.6 \text{ \AA} \pm 0.2 \text{ \AA}$ et $0.6 \text{ \AA} \pm 0.2 \text{ \AA}$ dans les formes apo, Cu^(I) et Hg^(II) respectivement. Cela s'explique notamment par le fait que presque tous les résidus du cœur hydrophobe sont dans des régions repliées en hélice α ou en brin β , celles-ci s'avérant les parties les moins mobiles des protéines.

7.4.2.2 Structure du cœur hydrophobe

Le tableau 7.25 répertorie les variations autour de leurs valeurs moyennes, des positions des atomes lourds du cœur hydrophobe au sein de chacune des formes des métallochaperones étudiées. Pour chaque protéine, toutes les conformations de la simulation sont superposées à la structure moyenne *ad hoc* par rapport aux positions des atomes du squelette peptidique de l'ensemble des résidus. Ensuite, on évalue la moyenne des valeurs des RMSD des atomes lourds du cœur hydrophobe. Cette méthode permet de savoir si les résidus du cœur hydrophobe occupent les mêmes places relatives au sein des protéines. C'est le cas pour les trois protéines, Hah1, Atx1 et MerP, et quel que soit leur état de métallation, apo ou holo, avec des RMSD

¹<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

moyens de 0.4 Å et des dispersions des RMSD également très faibles (inférieures à 0.07 Å).

Protéines	RMSD		
	apo [Å]	Cu ^(I) [Å]	Hg ^(II) [Å]
Hah1	0.28 ± 0.05	0.24 ± 0.04	0.32 ± 0.06
Atx1	0.25 ± 0.07	0.22 ± 0.04	0.24 ± 0.04
MerP	0.37 ± 0.04	0.32 ± 0.05	0.29 ± 0.06

TAB. 7.25 – RMSD des positions des atomes lourds du cœur hydrophobe dans les formes apo et holo d’Hah1, d’Atx1 et de MerP. La structure de référence pour chaque calcul de RMSD est la conformation moyenne (dont l’énergie a été minimisée) de la simulation correspondante. Le RMSD est calculé en superposant d’abord les atomes N, C, O et C_α du squelette peptidique de tous les résidus, puis la moyenne des valeurs des RMSD des atomes lourds du cœur hydrophobe est évaluée.

Cependant, bien qu’aucun réarrangement conformationnel ne se produise pour le cœur hydrophobe, si on compare les positions des atomes du cœur hydrophobe des holoprotéines par rapport à celles des apoprotéines correspondantes (Tab. 7.26), on note que la position globale du cœur hydrophobe de chaque protéine change selon qu’un métal est chélaté ou non, et selon la nature du métal, sauf pour Hah1 (RMSD_{apo/holo} < 1 Å) (Fig. 7.41a). En effet, dans le cas d’Atx1 et de MerP, les RMSD entre les formes apo et holo prennent des valeurs supérieures à 1.5 Å, les valeurs maximales étant pour la superposition des formes apo avec les formes Hg^(II). Cela s’explique notamment par le fait que l’orientation relatives des hélices α par rapport au feuillet β est sensible à la présence ou à l’absence du métal. Par conséquent, comme la grande majorité des résidus des cœurs hydrophobes appartiennent à des éléments de structure secondaire, l’arrangement relatif de ces aminoacides les uns par rapport aux autres au sein des protéines peut varier, comme le montre la figure 7.41b.

Protéines	RMSD _{apo/Cu}	RMSD _{apo/Hg}
	[Å]	[Å]
Hah1	0.70	0.95
Atx1	1.92	2.74
MerP	1.48	2.65

TAB. 7.26 – RMSD des positions des atomes lourds du cœur hydrophobe dans les formes holo d’Hah1, d’Atx1 et de MerP par rapport aux apostructures moyennes correspondantes. Le RMSD est calculé en superposant au mieux les atomes lourds des résidus du cœur hydrophobe.

7.4.2.3 Interactions de van der Waals

Excepté dans le cas d’apoMerP où elle est totalement exposée au solvant, la méthionine du motif MTCXXC est toujours enfouie dans la protéine. Dans ce cas, sa chaîne latérale interagit fortement avec certains résidus du cœur hydrophobe, aussi bien dans les formes apo que holo. Par exemple, dans le cas d’Hah1 (Fig. 7.42), les

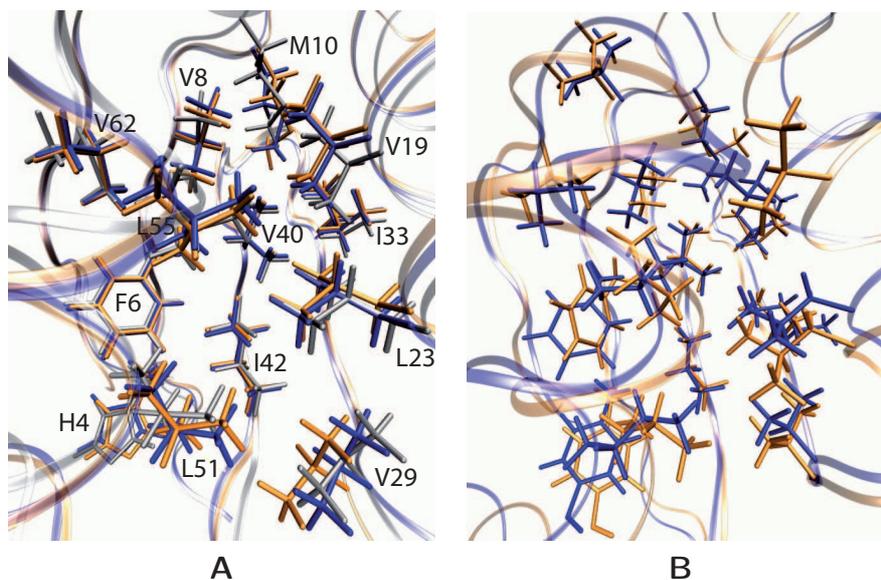


FIG. 7.41 – Superposition des résidus du cœur hydrophobe des formes apo, $\text{Cu}^{(\text{I})}$ et $\text{Hg}^{(\text{II})}$ d’Hah1 (**A**), et apo et $\text{Cu}^{(\text{I})}$ d’Atx1 (**B**). En bleu, forme apo; en orange, forme liée au $\text{Cu}^{(\text{I})}$; en gris, forme liée au $\text{Hg}^{(\text{II})}$. Les noms des résidus du cœur hydrophobe d’Hah1 sont indiqués.

interactions de van der Waals entre M10 et les résidus V8, V19, I33 et V40 du cœur hydrophobe sont relativement importantes (en plus des interactions avec L35 et K38). En outre, la cystéine 15 (la seconde cystéine du motif MTCXXC) est enfouie dans apo- et holoHah1 et participe au réseau d’interactions de M10.

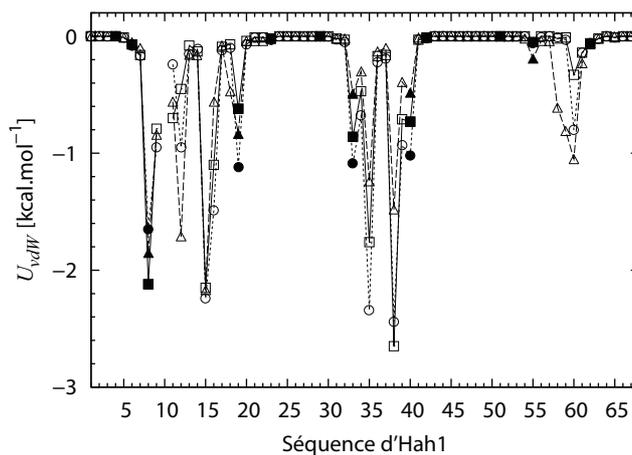


FIG. 7.42 – Energies d’interaction de van der Waals de la méthionine 10 avec les autres résidus d’Hah1 dans les formes apo (\square) et liées au $\text{Cu}^{(\text{I})}$ (\circ) ou $\text{Hg}^{(\text{II})}$ (\triangle). Les symboles pleins indiquent la position des résidus du cœur hydrophobe dans apoHah1 (\blacksquare), CuHah1 (\bullet) et HgHah1 (\blacktriangle).

7.4.3 Mutants M10A et M10S d'Hah1

Le rôle de la méthionine 10 d'Hah1 a été étudié en la mutant en alanine et en sérine. Ces deux mutations permettent de sonder deux propriétés de la chaîne latérale de la méthionine (ou de l'aminoacide (I, V, L) parfois rencontré à cette position chez certaines métallochaperones à cuivre(I) d'organismes procaryotes (Fig. 2.2, p. 17)) : une chaîne latérale relativement longue et apolaire.

L'alanine a une chaîne latérale aliphatique courte (un méthyle $-\text{CH}_3$). Cette mutation permet de mettre en évidence l'importance que peut jouer la longueur de la chaîne latérale car, même dans les protéines où la méthionine est absente, elle est remplacée par des résidus qui partagent une chaîne aliphatique longue (Ile, Leu, Val).

La sérine (chaîne latérale hydroxyméthyle $-\text{CH}_2\text{OH}$) accentue la sévérité de la mutation en introduisant un groupement polaire à cette position dans la séquence. Cela permet de savoir si un résidu hydrophobe est nécessaire à cette position dans la protéine.

Il semble que M10 joue essentiellement un rôle structural car un mutant avec une valine à cette position reste fonctionnel et peu interagir avec Wnd [Larin *et al.*, 1999].

La forme sauvage d'Hah1 (comportant M10) est notée Hah1^{WT} (*wild type*). Quand une alanine se substitue à M10, Hah1 est dite Hah1^{M10A}, de même pour Hah1^{M10S} où une sérine remplace M10. Le motif du site de liaison du métal est alors : **M**¹⁰CGGC dans Hah1^{WT}, **A**¹⁰CGGC dans Hah1^{M10A} et **S**¹⁰CGGC dans Hah1^{M10S}.

Six simulations de dynamique moléculaire sont à disposition pour élucider le rôle possible de cette méthionine très conservée : les protéines Hah1^{WT}, Hah1^{M10A} et Hah1^{M10S} ont été modélisées sous leur forme apo et complexée au Cu^(I).

Le repliement d'Hah1, sous les formes apo ou holo, n'est pas affecté par les mutations. La longueur des éléments de structure secondaire α et β ne varie que d'un acide aminé en plus ou en moins à leurs extrémités N- et C-terminales. La boucle L_1 est réduite de deux résidus dans tous les complexes Cu^(I) (l'hélice α_1 s'étend jusqu'à G13).

7.4.3.1 Mobilité des atomes C_α du cœur hydrophobe

- **Mobilité moyenne des cœurs hydrophobes**

Afin de pouvoir comparer l'effet des mutations sur les propriétés du cœur hydrophobe d'Hah1, les résidus des mutants d'Hah1 supposés appartenir au cœur hydrophobe, sont déterminés arbitrairement à partir du cœur hydrophobe d'apoHah1^{WT}, à savoir : H4, F6, V8, M10 (ou A10, ou S10), V19, L23, V29, I33, V40, I42, L51, L55 et V62.

Les RMSF des positions des atomes C_α du cœur hydrophobe des mutants sont reportés dans le tableau 7.27. L'effet de la mutation apparaît distinctement pour les formes apo où, plus la mutation est sévère, plus la mobilité du cœur hydrophobe augmente :

$\text{RMSF}_{\text{WT}} = 0.6 \text{ \AA} \pm 0.2 \text{ \AA}$, $\text{RMSF}_{\text{M10A}} = 0.8 \text{ \AA} \pm 0.3 \text{ \AA}$, $\text{RMSF}_{\text{M10S}} = 1.1 \text{ \AA} \pm 0.4 \text{ \AA}$. En revanche, les mutations apparaissent *silencieuses* lorsque les protéines sont liées au $\text{Cu}^{(\text{I})}$ avec des RMSF proches entre les holoprotéines mutantes et sauvages ($\text{RMSF} \approx 0.7 \text{ \AA}$).

Mutants	$\text{RMSF}_{\text{C}\alpha}$	
	apo [Å]	$\text{Cu}^{(\text{I})}$ [Å]
WT	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.3
M10A	0.8 ± 0.3	0.4 ± 0.1
M10S	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.3

TAB. 7.27 – RMSF des positions des résidus du cœur hydrophobe dans les formes apo et holo des mutants M10A et M10S d’Hah1.

• Effet de la mutation

La figure 7.43 montre que malgré une influence limitée des mutations sur la mobilité globale du cœur hydrophobe, la dynamique de l’ensemble des résidus est affectée par les mutations, essentiellement par la mutation M10S car cette dernière entraîne pour tous les résidus un accroissement des RMSF aussi bien pour apoHah1^{M10S} (Fig. 7.43A) que pour CuHah1^{M10S} (Fig. 7.43B). C’est essentiellement la dynamique des boucles L_1 , L_3 et L_5 qui subit des modifications notables.

La mutation M10A a un effet réduit. Dans apoHah1^{M10A}, la mobilité des boucles L_1 (A10-C12) et L_5 (G59-T61) est plus grande ($\Delta\text{RMSF} > 1 \text{ \AA}$). Dans la forme $\text{Cu}^{(\text{I})}$, G59 (L_5) est nettement moins mobile comparé à la protéine sauvage ($\Delta\text{RMSF} \approx -1.1 \text{ \AA}$), certainement du fait de la liaison hydrogène $\text{O}_\gamma^{\text{T58}} \dots \text{O}^{\text{L55}}$ (probabilité de présence $\omega = 97\%$) qui stabilise localement la boucle.

L’effet de la mutation M10S est plus général sur l’ensemble des protéines. Une augmentation de la mobilité est visible pour presque tous les résidus. L’effet de la mutation est encore amplifié dans CuHah1^{M10S}, en particulier dans les boucles L_1 et L_3 qui demeurent très flexibles comparées à la forme sauvage, avec un ΔRMSF jusqu’à 2.3 \AA pour G13 (Fig. 7.43B) [Poger *et al.*, 2005].

La mobilité de la sérine 10 est plus importante que celle de la méthionine 10, aussi bien dans les formes apo (RMSF de 1.7 \AA et 0.9 \AA respectivement) que dans celles complexées au $\text{Cu}^{(\text{I})}$ (RMSF de 1.2 \AA et 0.5 \AA). Les cystéines C12 et C15, bien que liées au $\text{Cu}^{(\text{I})}$, restent aussi très mobiles dans CuHah1^{M10S} (RMSF de 2.6 \AA et 1.5 \AA respectivement, contre 0.7 \AA et 0.2 \AA pour CuHah1^{WT}).

• Effet de la liaison du $\text{Cu}^{(\text{I})}$

La figure 7.43 indique que les résidus des états métallés d’Hah1 sauvage et du mutant M10A ont sensiblement la même mobilité, malgré une flexibilité accrue de la boucle L_1 dans la forme apo. Ainsi, comme la figure 7.44 l’illustre, la rigidification

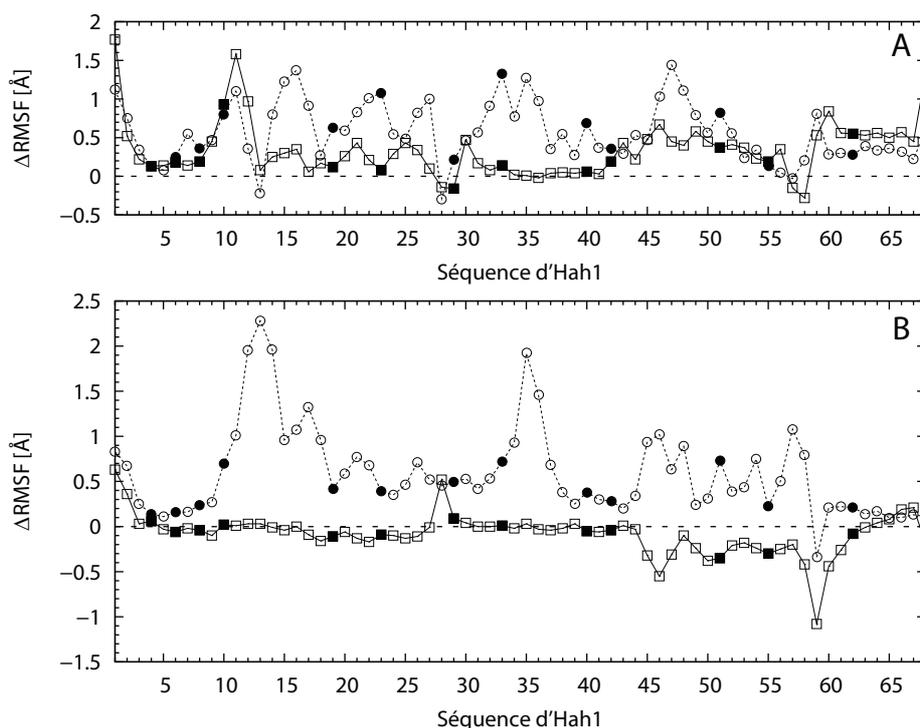


FIG. 7.43 – Variations des RMSF des C_{α} entre les formes mutantes et sauvages d'apo- et d'holoHah1 ($\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_{\text{mutant}} - \text{RMSF}_{\text{WT}}$). **(A)** ΔRMSF entre les formes apo d'Hah1; **(B)** ΔRMSF entre les formes liées au $\text{Cu}^{(I)}$. (—) Mutant M10A; (---) Mutant M10S. Les carrés pleins indiquent la position des résidus du cœur hydrophobe.

de la boucle L_1 en raison de la présence de $\text{Cu}^{(I)}$, est d'autant plus grande pour $\text{CuHah1}^{\text{M10A}}$ que pour $\text{CuHah1}^{\text{WT}}$.

Les boucles L_4 et L_5 sont aussi moins mobiles pour $\text{CuHah1}^{\text{M10A}}$ que pour $\text{CuHah1}^{\text{WT}}$.

L'effet dynamique dû à la liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ reste local et moins net pour le mutant M10S. La liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ ne parvient pas à rétablir une mobilité des résidus analogue à la forme sauvage. Les boucles L_1 et L_3 (notamment L_{35}) sont beaucoup plus mobiles pour ce mutant. Pour G13 et G14 (α_1), cela s'explique par un affaiblissement global des premières liaisons hydrogène entre les atomes du squelette peptidique de l'hélice α_1 ($\text{O}^{\text{G13}} \dots \text{N}^{\text{E17}}$, $\text{O}^{\text{G14}} \dots \text{N}^{\text{A18}}$ et $\text{O}^{\text{C15}} \dots \text{N}^{\text{V19}}$), permettant ainsi aux glycines d'être plus mobiles que dans la forme sauvage [Poger *et al.*, 2005].

7.4.3.2 Structure du cœur hydrophobe

• Structure générale des protéines

Les structures apo des protéines mutantes sont différentes de la forme sauvage avec des RMSD respectifs entre les structures moyennes d'apoHah1^{WT} et des mutants M10A et M10S de 1.74 Å et 2.80 Å (Tab. 7.28). Même localement, au niveau du motif X¹⁰TCGGC (*i.e.* le motif XTCGGC, X=M, A ou S), la superposition des squelettes peptidiques produit des RMSD du même ordre de grandeur. La différence la plus grande concerne le mutant M10S.

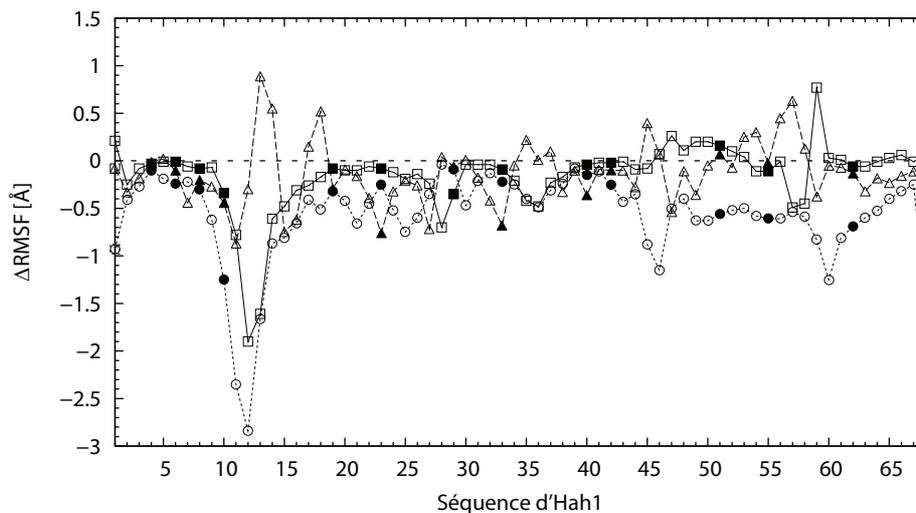


FIG. 7.44 – Variations des RMSF des C_α entre les formes $\text{Cu}^{(I)}$ et apo des protéines Hah1 sauvage et mutantes ($\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_{\text{Cu}} - \text{RMSF}_{\text{apo}}$). (▲) ΔRMSF entre les formes liées au $\text{Cu}^{(I)}$ et apo d'Hah1. (◻) Hah1 sauvage; (○) Mutant M10A; (△) Mutant M10S. Les symboles pleins indiquent la position des résidus du cœur hydrophobe dans Hah1^{WT} (■), Hah1^{M10A} (●) et Hah1^{M10S} (▲).

En présence de $\text{Cu}^{(I)}$, les structures moyennes des protéines sauvage et mutantes sont relativement proches les unes des autres avec des RMSD d'environ 1.5 Å. Elles se révèlent presque identiques si l'on ne superpose que les résidus du motif XTCGGC, avec des RMSD inférieurs à 0.2 Å. Sur la figure 7.45, il est clair que les conformations adoptées par ces six résidus sont similaires; même l'atome C_β de A10 et de S10 occupent la même position que celui de M10 dans $\text{CuHah1}^{\text{WT}}$. On assiste donc à un effet local hyper-structurant de la liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ sur les protéines, même dans le cas d'une mutation aussi sévère que M10S.

Mutants	RMSD _{WT/mutant}		apo		Cu ^(I)	
	Tous les résidus ^a	X ¹⁰ TTCGGC ^b	Tous les résidus ^a	X ¹⁰ TTCGGC ^b	Tous les résidus ^a	X ¹⁰ TTCGGC ^b
	[Å]	[Å]	[Å]	[Å]	[Å]	[Å]
M10A	1.74	1.95	1.48	0.11		
M10S	2.80	2.82	1.52	0.15		

TAB. 7.28 – RMSD des positions des atomes du squelette peptidique entre les structures moyennes d'Hah1^{WT} et des mutants. ^a Les RMSD sont calculés avec l'ensemble des résidus. ^b Seuls les positions du motif M¹⁰TTCGGC, sauvage ou muté, sont prises en compte pour évaluer le RMSD.

Si l'on superpose les formes apo et $\text{Cu}^{(I)}$ on obtient les RMSD suivants : 0.97 Å pour Hah1^{WT}, 2.16 Å pour Hah1^{M10A} et 2.68 Å pour Hah1^{M10S}. La perte de rigidité observée dans les apoprotéines mutantes se distribue donc sur l'ensemble des structures et non localement.

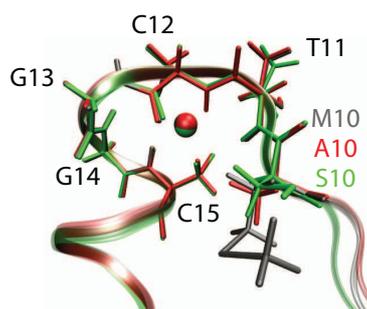


FIG. 7.45 – Superpositions des motifs X¹⁰TGCCG des formes Cu^(I) des protéines Hah1 sauvage (—) ainsi que mutées M10A (—) et M10S (—).

• Le cœur hydrophobe

La superposition des atomes lourds du cœur hydrophobe d'Hah1^{WT} apo et Cu^(I) produit un RMSD de 0.70Å. Cela traduit un effet minime de la liaison du métal sur l'agencement tridimensionnel des résidus du cœur hydrophobe les uns par rapport aux autres. La même superposition en utilisant les structures moyennes des mutants montre de plus grandes différences structurales entre les états apo et métallés, avec des valeurs de RMSD élevées : 1.88 Å et 2.67 Å pour Hah1^{M10A} et Hah1^{M10S}, respectivement (Tab. 7.29).

Mutants	RMSD _{apo/Cu} [Å]	RMSD _{WT/mutant} ^a	
		apo [Å]	Cu ^(I) [Å]
WT	0.70	—	—
M10A	1.88	1.61	0.72
M10S	2.67	2.53	1.11

TAB. 7.29 – RMSD des positions des atomes lourds du cœur hydrophobe des mutants M10A et M10S d'Hah1. ^a Pour le résidu 10, seules les positions des atomes lourds de son squelette peptidique sont utilisées dans le calcul des RMSD.

Les structures moyennes du cœur hydrophobe des apoprotéines mutantes sont les plus éloignées de sa configuration dans la forme sauvage avec des RMSD_{WT/mutant} de plus de 1.6 Å. Les formes cuivrées ont un RMSD d'environ 1 Å par rapport à la structure moyenne du cœur hydrophobe de CuHah1^{WT}. La présence du Cu^(I) réduit donc la dispersion des structures et tend à positionner les aminoacides constitutifs du cœur hydrophobe dans un arrangement spatial commun (Fig. 7.46).

7.4.3.3 Accessibilité au solvant

Les mutations ne changent globalement pas l'accessibilité au solvant du motif XTCCGC d'Hah1 qui reste exposé à environ 40%. Le site de liaison du métal demeure relativement exposé à la surface de la protéine avec de grandes disparités d'un résidu à l'autre comme dans les Hah1^{WT}, apo ou métallée, tandis que l'ion Cu^(I) est toujours très enfoui (accessibilité nulle).

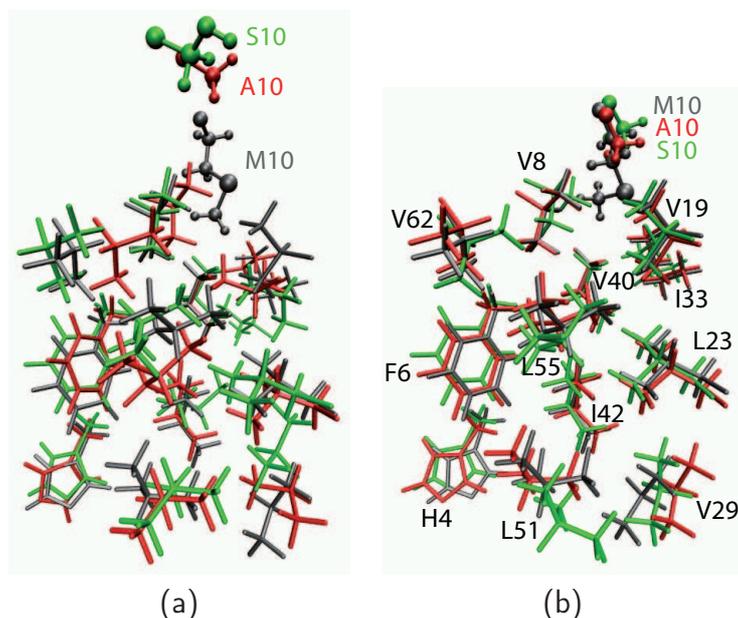


FIG. 7.46 – Superpositions des structures moyennes des formes apo (a) et Cu^(I) (b) des protéines Hah1 sauvages et mutantes. (—) Hah1 sauvage ; (—) Mutant M10A ; (—) Mutant M10S.

Toutefois, bien que le résidu 10 reste relativement enfoui dans toutes les simulations, A10 est en moyenne plus accessible au solvant que M10 dans la forme apo (SRA \approx 8.5%) par rapport à M10 (SRA \approx 2.8%). Dans Hah1^{M10S}, la chaîne latérale de S10 reste toujours accessible à environ 11% dans les deux états de métallation. L'autre effet notable de la mutation M10S est la plus grande accessibilité au solvant de C15 (SRA \approx 17% et SRA \approx 26% dans apo- et CuHah1^{WT} respectivement) par rapport aux formes sauvages et M10A d'Hah1 (SRA d'environ 7% et 15% dans apo- et CuHah1 respectivement).

Les résidus du cœur hydrophobe subissent très peu de variations de leur SRA suite aux mutations, avec ou sans Cu^(I). Les plus grandes différences sont pour apoHah1^{M10S} où I33 devient plus accessible avec une SRA passant de 5% (WT) à 35% (M10S).

7.4.3.4 Interactions de van der Waals avec le cœur hydrophobe

Du fait de la mutation de la méthionine en un résidu à chaîne latérale plus courte, la plupart des interactions de van der Waals du résidu 10 avec le cœur hydrophobe est perdue. Dans les formes apo (Fig. 7.47A), seule l'interaction entre A10, ou S10, et V8 est conservée dans Hah1^{M10A} et Hah1^{M10S}, avec une amplitude près de trois fois inférieure à celle de M10-V8 ($U_{vdW} = -2.1 \pm 0.8$ kcal.mol⁻¹, -0.7 ± 0.4 kcal.mol⁻¹ et -0.8 ± 0.3 kcal.mol⁻¹ pour apoHah1^{WT}, apoHah1^{M10A} et apoHah1^{M10S}, respectivement). Les interactions très fortes de M10 avec L35 et K38 de L_3 sont nettement diminuées. A10 maintient un contact avec C15 qui est enfouie.

La présence du Cu^(I) empêche la disparition de certaines interactions dans CuHah1^{M10A}, malgré des énergies plus faibles (Fig. 7.47B). C'est le cas pour C15, L35, K38 et K60. La sérine 10 interagit avec V8 du cœur hydrophobe, ainsi qu'avec

C15 et K38.

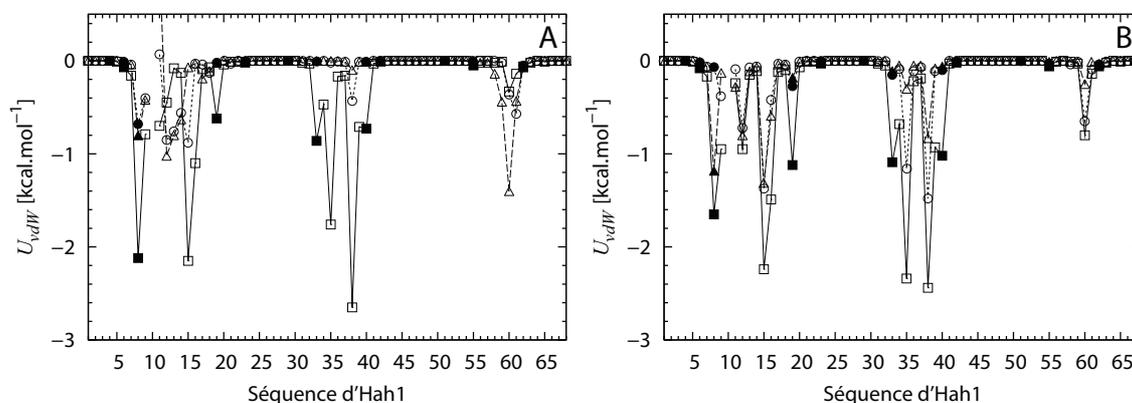


FIG. 7.47 – Energies d’interaction de van der Waals du résidu 10 avec les autres aminoacides d’Hah1 dans les formes apo (**A**) et liées au $\text{Cu}^{(1)}$ (**B**). (◻) Hah1 sauvage; (○) Mutant M10A; (△) Mutant M10S. Les symboles pleins indiquent la position des résidus du cœur hydrophobe dans apoHah1 (●), CuHah1 (●) et HgHah1 (▲).

Le rôle de M10 est également mis en évidence par la mesure de la contribution du résidu 10 à l’énergie de stabilisation de van der Waals du cœur hydrophobe (Tab. 7.30). M10 participe pour environ 20% (4.5/23.9) au réseau d’interactions entre les résidus du cœur hydrophobe dans les formes apo et $\text{Cu}^{(1)}$ d’Hah1 sauvage. La contribution chute à environ 4-5% dans les formes apo des mutants.

Types d’interactions	WT [kcal.mol ⁻¹]	M10A [kcal.mol ⁻¹]	M10S [kcal.mol ⁻¹]
CH-CH ^a	-23.9 ± 4.0	-18.3 ± 4.2	-17.0 ± 5.1
Résidu 10-CH ^b	-4.5 ± 1.0	-0.8 ± 0.4	-0.9 ± 0.4

TAB. 7.30 – Interactions de van der Waals dans le cœur hydrophobe des formes sauvages et mutantes d’apoHah1, calculées (^a) entre tous les résidus du cœur hydrophobe (énergie propre de van der Waals), ou (^b), entre le résidu 10 et les autres aminoacides du cœur hydrophobe.

Pour les protéines liées au $\text{Cu}^{(1)}$, bien que l’énergie propre de van der Waals du cœur hydrophobe ne change guère par rapport aux apoprotéines, la contribution du résidu 10 à la stabilisation du cœur hydrophobe varie en fonction de la mutation (Tab. 7.30). Elle augmente à 9% dans CuHah1^{M10S} mais demeure inférieure à 5% dans CuHah1^{M10A}. La participation plus grande de S10 à la stabilisation du cœur hydrophobe procède d’une réorientation favorable du squelette peptidique de la boucle L_1 induite par le site $\text{Cu}^{(1)}$, en direction de V8 et de V19.

Rôle de la méthionine du motif MXCXXC des métallochaperones

Conclusion

Dans *Hah1*, *Atx1* et *MerP*, le cœur hydrophobe est constitué de résidus peu mobiles dont la disposition dans la protéine change peu en fonction de la présence ou de l'absence d'un métal lié.

Les mutants *M10A* et *M10S* d'*Hah1* montrent que la mobilité des acides aminés du cœur hydrophobe est augmentée dans les formes apo (davantage dans apo*Hah1*^{M10S} que dans apo*Hah1*^{M10A}), mais reste comparable à celle de la forme sauvage dans les protéines complexées au cuivre. Concernant l'ensemble de aminoacides des protéines, leur dynamique est affectée par les mutations. Pour les mutants *M10A*, seul l'état apo est perturbé avec une flexibilité accrue de la boucle L_1 . En revanche, la mutation *M10S* entraîne une augmentation générale de la mobilité de tous les résidus, aussi bien dans apo*Hah1*^{M10S} que dans Cu*Hah1*^{M10S}, notamment de L_1 et de L_3 . Par conséquent, la liaison du Cu^(I) ne parvient pas à contre-balancer la perturbation introduite par une mutation aussi sévère que *M10S*.

Cependant, localement, le Cu^(I) impose la même structure au motif (A/S)TGCCG que celle de MTGCCG dans l'holoprotéine sauvage. La disposition relative des résidus du cœur hydrophobe se révèle également affectée par la mutation étant donnée que, dans les apoprotéines, la configuration des résidus du cœur hydrophobe change par rapport à celle d'apo*Hah1*^{WT}. La présence du Cu^(I) restaure la configuration native du cœur hydrophobe que l'on observe dans Cu*Hah1*^{WT}.

L'accessibilité au solvant du motif XTCGGC n'est quant à elle pas perturbée par les mutations.

Enfin, le réseau d'interactions de van der Waals du résidu 10 avec le cœur hydrophobe, la cystéine 15 et la boucle L_3 , est perturbé et affaibli par les mutations. Alors que la contribution de *M10* à la stabilisation du cœur hydrophobe est d'environ 20% pour les énergies de van der Waals, elle est 2 à 3 fois plus faibles dans les mutants, même en présence de cuivre. ■

7.5 Interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 des métallochaperones

L'étude structurale des métallochaperones dans leurs formes apo et métallées a permis de mettre en lumière un réseau d'interactions autour du site de liaison du métal entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 pour *Hah1*, *MerP*, *Atx1*, *EhCopZ* et *BsCopZ* (cf. intro) [Arnesano *et al.*, 2001b, Arnesano *et al.*, 2002, Anastassopoulou *et al.*, 2004, Banci *et al.*, 2001b, Banci *et al.*, 2003b, Banci *et al.*, 2003a, Steele et Opella, 1997, Wimmer *et al.*, 1999]. Les résidus en jeu sont les mêmes d'une protéine à l'autre. Les simulations de dynamique moléculaire d'*Hah1*, d'*Atx1* et de *MerP* en absence de métal, et en présence de cuivre(I) et de mercure(II) permettent de retrouver globalement l'ensemble de ces interactions. Vu que les schémas d'interactions inter-boucles sont communs aux trois molécules, seule le cas d'*Hah1* sera détaillé par la suite, puis comparé avec *Atx1* et *MerP*.

7.5.1 Interactions entre L_1 , L_3 et L_5 dans Hah1

Les diverses analyses des structures des métallochaperones ont révélé le rôle particulier joué par les aminoacides M14 (L_1), (L/F)42 (L_3) et (K/Y/F)73 (L_5) (numérotation des résidus selon l'alignement de la figure 2.2, p. 17). Dans Hah1, les acides aminés correspondants sont M10, L35 et K60. La figure 7.48 représente les interactions de chacun de ces résidus avec le reste de la protéine, en absence et en présence de cation chélaté.

L'interaction avec le résidu K38 a aussi été étudiée, car l'étude du cœur hydrophobe d'Hah1 a montré une interaction d'empilement relativement importante de sa chaîne latérale avec celle de M10 (Fig. 7.47).

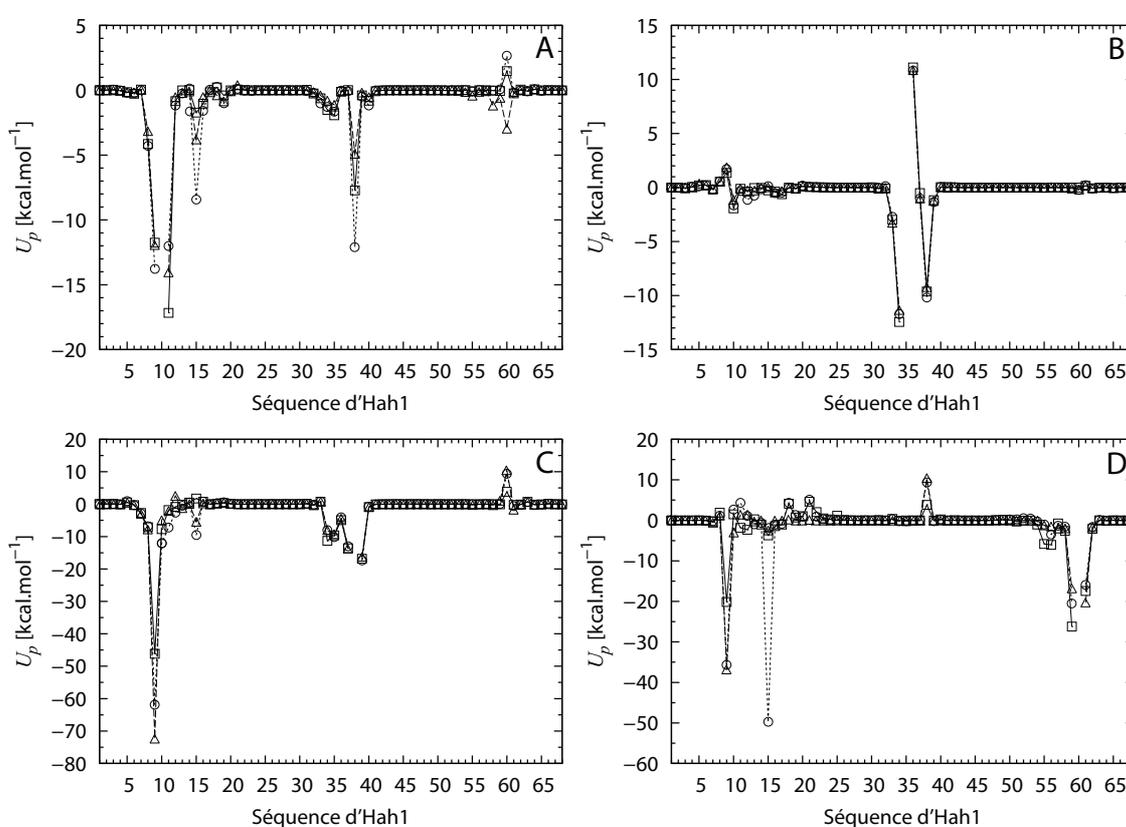


FIG. 7.48 – Energies d'interaction des résidus M10 (L_1) (A), L35 (L_3) (B), K38 (L_3) (C) et K60 (L_5) (D) d'Hah1 avec les autres résidus dans les formes apo (\square), $\text{Cu}^{(I)}$ (\circ) et $\text{Hg}^{(II)}$ (\triangle).

7.5.1.1 Dans apoHah1

La chaîne latérale de M10 interagit avec C15 (Fig. 7.49a). C'est une interaction hydrophobe qui participe à la structuration de la boucle L_1 , et du motif MTCGGC en particulier, car elle permet de l'ancrer dans le cœur hydrophobe de la protéine *via* les chaînes latérales de M10 et de C15. Bien que cette interaction paraisse faible sur la figure 7.48A en terme d'énergie d'interaction totale ($U_p = -1.7 \pm 1.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$), l'empilement des deux chaînes latérales s'avère important comparé à celui de M10 avec les autres résidus ($U_{\text{vdW}} = -2.2 \pm 0.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

L'interaction dominante entre les boucles L_1 et L_3 est celle entre D9-M10 et K38 (Fig. 7.49b) : la chaîne latérale de M10 s'empile avec la chaîne hydrocarbonée de la lysine ($U_{\text{vdW}} = -2.7 \pm 0.9 \text{ kcal.mol}^{-1}$) et l'interaction est largement stabilisée par une interaction électrostatique $\text{O}^{\text{M10}} \dots \text{N}_{\zeta}^{\text{K38}}$ ($U_{\text{el}} = -5.1 \pm 6.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$). L'asparate 9 stabilise l'ensemble du complexe par une interaction électrostatique de son groupement carboxylate de sa chaîne latérale avec aussi l'ammonium de K38 ($U_p = -46.2 \pm 28.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$). En outre, L35 vient compléter le réseau d'interactions entre les deux boucles en s'empilant avec M10 ($U_{\text{vdW}} = -1.8 \pm 0.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$), la liaison hydrogène $\text{O}^{\text{L35}} \dots \text{H} - \text{N}^{\text{K38}}$ ($\omega = 63\%$) assurant une orientation favorable de L35.

La chaîne latérale de K60 se révèle relativement mobile ($\text{RMSF}_{\text{N}_{\zeta}^{\text{K60}}} = 2.5 \text{ \AA}$) et oscille entre une position exposée au solvant ou une autre interagissant par intermittence avec O^{D9} ($U_p = -20.2 \pm 14.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$) (Fig. 7.49c).

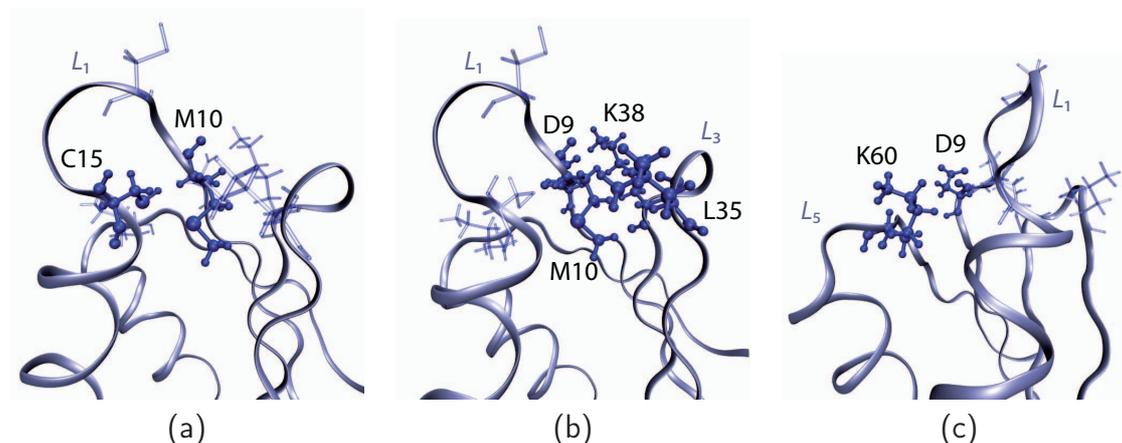


FIG. 7.49 – Interactions entre les résidus de la boucle L_1 (a), et entre les boucles L_1 et L_3 (b) et L_1 et L_5 (c) dans apoHah1.

7.5.1.2 Dans CuHah1

L'interaction entre M10 et C15 est nettement accrue par la présence du $\text{Cu}^{(I)}$ car elle passe d'à peine -2 kcal.mol^{-1} dans apoHah1 à $-8.4 \pm 1.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ dans CuHah1. Les chaînes latérales sont orientées différemment de sorte que le groupement $-\text{CH}_2\text{S}^-$ de C15 est proche de la chaîne latérale de M10, mais aussi de son squelette peptidique (notamment de l'atome H_{α}) (Fig. 7.50a).

Le réseau d'interactions faisant intervenir D9 et M10 d'une part, et L35 et K38 d'autre part, subsiste dans CuHah1 et est même renforcé par le $\text{Cu}^{(I)}$ (Fig. 7.50b). Les interactions prépondérantes D9-K38 et M10-K38 se révèlent respectivement 57% et 34% supérieures à celles calculées dans apoHah1. Les interactions d'empilement de L35 avec M10 et K38 ne sont pas changées. L'effet de la charge négative de C15 (cystéinate) est perçu par le groupement $-\text{NH}_3^+$ de K38 de par l'augmentation du terme d'énergie d'interaction électrostatique qui atteint $-9.6 \pm 2.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ contre

$1.8 \pm 1.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ dans la forme apo.

La variation la plus spectaculaire concerne l'interaction de K60 (L_5) avec D9 et C15 de L_1 . K60 se réoriente en direction du S_γ de C15 (Fig. 7.50c) et l'intensité de l'interaction, majoritairement d'origine électrostatique, est multipliée d'un facteur 14 environ ($U_p = -3.7 \pm 3.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ dans apoHah1 et $U_p = -49.8 \pm 11.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ dans CuHah1). L'interaction D9-K60 est aussi renforcée (+76% par rapport à apoHah1).

Les interactions C15-K60 et D9-K60 sont ainsi les interactions majeures de L_1 avec L_5 dans CuHah1.

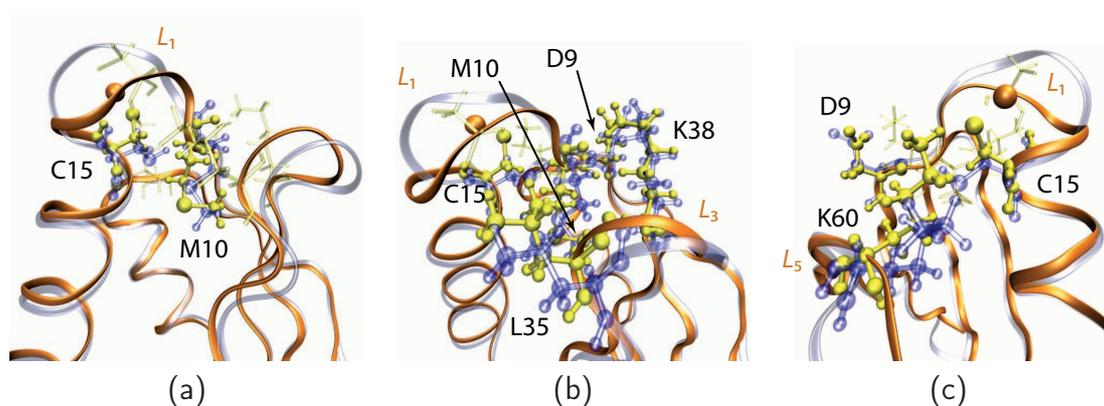


FIG. 7.50 – Interactions entre les résidus de la boucle L_1 (a), et entre les boucles L_1 et L_3 (b) et L_1 et L_5 (c) dans CuHah1. En orange, CuHah1 : en bleu transparent, apoHah1.

7.5.1.3 Dans HgHah1

L'interaction de M10 avec C15 est plus forte en présence de $\text{Hg}^{(\text{II})}$ par rapport à apoHah1, mais demeure plus faible que à celle étudiée dans CuHah1 (Fig. 7.51a).

Les interactions de D9 et de M10 avec L_3 (L35 et K38) changent significativement par rapport aux états apo et $\text{Cu}^{(\text{I})}$ d'Hah1 (Fig. 7.51b). Alors que la liaison du $\text{Hg}^{(\text{II})}$ renforce davantage l'interaction de D9 avec K38 que celle du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ($\Delta U_p = +57\%$ par rapport à apoHah1), l'amplitude de l'interaction d'empilement entre M10 et K38 décroît de 37% par rapport à apoHah1. Les autres interactions de van der Waals de L35 avec M10 et K38 demeurent inchangées, aussi bien comparées à apoHah1 qu'à CuHah1.

L'interaction L_1-L_5 consiste principalement, comme dans apoHah1, en l'attraction électrostatique de l'ammonium de K60 en direction du carboxylate de D9. L'intensité de l'interaction est cependant plus forte, similaire à celle dans CuHah1 (*i.e.* $U_p \approx -36 \text{ kcal.mol}^{-1}$), à la différence que, dans CuHah1, cette interaction est à plus longue distance car la chaîne latérale de K60 pointe directement vers S_γ^{C15} . Dans HgHah1, la conformation de L_5 est telle que K60 n'interagit pas avec C15 (Fig. 7.51c).

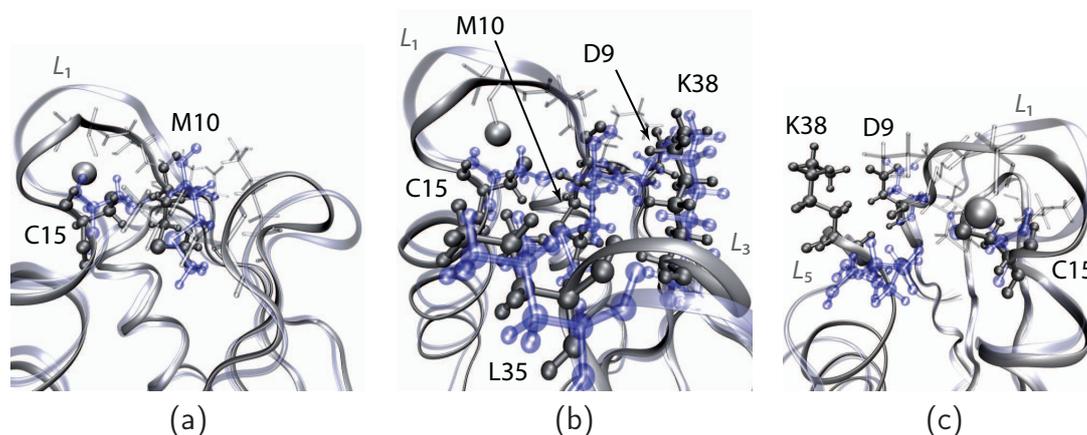


FIG. 7.51 – Interactions entre les résidus de la boucle L_1 (a), et entre les boucles L_1 et L_3 (b) et L_1 et L_5 (c) dans HgHah1. En gris, HgHah1 : en bleu transparent, apoHah1.

Les interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 dans Hah1

Les interactions entre les trois boucles varient en fonction de la présence ou de l'absence de métal, mais également en fonction de la nature du métal lié.

Dans apoHah1, les interactions prépondérantes s'articulent autour de D9 (L_1). Les lysines 38 (L_3) et 60 (L_5) sont attirées par ce résidu.

La liaison du $\text{Cu}^{(I)}$ change l'orientation de K60 qui bascule vers l'atome S_γ de C15 et contracte alors une interaction électrostatique majeure avec cet atome. Dès lors, seule K38 reste en interaction avec le carboxylate de la chaîne latérale de D9, avec une intensité plus grande.

En présence de $\text{Hg}^{(II)}$, K60 et K38 sont en interaction avec D9, comme dans apoHah1, mais l'amplitude des interactions électrostatiques est plus grande que dans apoHah1, et proche de celles calculées dans CuHah1. K60 n'a pas d'interaction avec C15 cette fois-ci.

Pour les trois états de métallation (apo et liés à $\text{Cu}^{(I)}$ ou $\text{Hg}^{(II)}$), on observe toujours un groupe de 3-4 résidus en interaction de van der Waals : M10 (L_1), C15 (L_1), L35 (L_3) et K38 (L_3). Ce «noyau» stabilisateur entre les boucles L_1 et L_3 est plus ou moins sensible à la présence d'un métal : l'interaction C15-M10 est alors renforcée. Par rapport à la forme apo, l'interaction M10-K38 est plus importante en présence de $\text{Cu}^{(I)}$ mais plus faible avec le $\text{Hg}^{(II)}$.

On note encore une fois le rôle particulier de la méthionine 10 qui joue un rôle de pivot entre la boucle (L_1) et le cœur hydrophobe, au sein même de L_1 en resserrant l'interaction de van der Waals avec C15 quand un métal est lié, et avec la boucle L_3 en s'empilant avec de longues chaînes alphas (L_35 et K38).

La lysine 38 a également un comportement remarquable dû à la nature de sa chaîne latérale : son extrémité ammonium l'ancre à proximité de D9 en «bordure» de L_1 , tandis que sa chaîne hydrocarbonée butylène interagit avec les chaînes latérales de M10 et L35.

Les interactions de L_{35} ne changent pas, quel que soit la forme (apo ou holo) de la protéine. Elles sont structurantes et participent à la stabilité globale de l'interaction L_1 - L_3 . ■

7.5.2 Comparaison avec Atx1 et MerP

7.5.2.1 Interactions dans Atx1

Dans Atx1, on retrouve le même réseau global d'interactions où interviennent les résidus situés en position homologue à ceux d'Hah1 : M13 (M10 dans Hah1), L40 (L35 dans Hah1), Q43 (K38) et K65 (K60).

M13 interagit avec quelques résidus du cœur hydrophobe d'Atx1 ainsi qu'avec le «noyau» qu'elle forme avec L40 et Q43, de façon semblable à M10 dans Hah1. Les interactions de van der Waals que nouent les chaînes latérales de ces 3 acides aminés ne sont pas affectées par la présence d'un métal lié. L'oxygène O^ϵ de Q43 stabilise l'ensemble par une liaison hydrogène avec le squelette peptidique de M13 ($\omega = 92\%$). Néanmoins, à la différence d'Hah1, L40 dans Atx1 voit son orientation changée quand le cuivre est lié, ce qui réduit ses interactions avec M13 et Q43.

En outre, M13 interagit très fortement avec K65 dans apoAtx1. La conformation de la boucle apo étant relativement différente à celle d'apoHah1, l'absence d'ancrage de C18 dans le cœur hydrophobe conduit à une conformation de la boucle plus ouverte que dans apoHah1. Cela permet à K65 de venir assez proche du motif $M^{13}TCSGC^{18}$. Les interactions de K65 avec ces 6 résidus sont les plus fortes dans apoAtx1.

En présence de $Cu^{(I)}$, comme dans CuHah1, K65 se positionne à proximité du soufre de la seconde cystéine (S_γ^{C18}). C'est l'interaction majeure dans CuAtx1. Par ailleurs, autre fait important, la chaîne latérale de R68 (L_5) bascule vers Q43. Q43 développe deux liaisons hydrogène relativement fortes ($O_\epsilon^{Q43} \dots H - N^{M13} : \omega = 90\%$ et $O_\epsilon^{Q43} \dots H - N_\eta^{R68} : \omega = 80\%$). Ainsi, Q43 joue ici un rôle particulièrement stabilisateur car sa chaîne latérale contribue à la rigidification globale de l'ensemble L_1 - L_3 - L_5 : Q43 (L_3) assure un pont stabilisateur entre M13 (L_1) et K68 (L_5). M13 de son côté a son interaction avec C18 accentuée (comme dans CuHah1). C18 interagit fortement avec K65 (L_5). Enfin, les interactions N10-R68 et N10-Q43 apportent une certaine stabilisation au réseau. Cette interaction entre N10 (dernier acide aminé de β_1) et Q43 est toujours présente dans Atx1 (apo et holo).

Le réseau d'interactions dans HgAtx1 est sensiblement le même que celui dans CuAtx1, si ce n'est que la chaîne latérale K65 n'est plus dirigée vers le site métallique mais vers le solvant. L'interaction avec C18 est totalement perdue. R68 est plus distante de Q43 ; l'intensité de l'interaction Q43-R68 est intermédiaire entre la forme apo et la forme $Cu^{(I)}$.

Comparée à CuAtx1, la forme $Hg^{(II)}$ se caractérise davantage par des pertes et des affaiblissements d'interactions que par de créations ou des renforcements d'autres interactions.

7.5.2.2 Interaction dans MerP

Les résidus équivalents à ceux d'Hah1 dans les boucles de MerP sont : M12 (M10 dans Hah1), F38 (L35 dans Hah1), R41 (K38 dans Hah1) et Y66 (K60 dans Hah1). Il est à noter que la lysine de la boucle L_5 d'Hah1 et d'Atx1 est remplacée ici par un acide aminé aromatique.

D'une manière générale, les interactions dans les diverses formes de MerP sont plus faibles que dans Hah1 et Atx1.

Comme M12 est exposée au solvant dans apoMerP et non enfouie, des interactions avec le cœur hydrophobe ne sont pas possibles. En revanche, M12 interagit fortement avec le cycle aromatique de F38. F38 est impliquée dans un cluster riche en interactions avec E39 et R41 : le carboxylate de E39 est proche du guanidinium de R41 du fait de l'attraction électrostatique, et R41 est stabilisée dans cette orientation grâce à une liaison hydrogène ($\omega = 98\%$) entre un azote N_7 du groupement guanidinium et le carbonyle de la liaison peptidique de F38. Les interactions F38-R41 et E39-R41 sont les plus importantes dans apoMerP. Y66 est en interaction d'empilement avec la chaîne latérale de M12.

Dans les formes métallées, les réseaux d'interaction entre les boucles sont plus limités, du fait de la conformation très différente que prennent L_3 et L_5 par rapport aux formes holo correspondantes d'Hah1 et d'Atx1.

Dans CuMerP, R41 bascule vers le solvant et ne contracte plus d'interaction avec M12 et F38. Son groupement guanidinium pointe vers le squelette peptidique de P10. F38 conserve toutefois une interaction d'empilement avec M12 (environ -2 kcal.mol⁻¹ mais n'est plus proche de R41 (l'énergie d'interaction chute de 90% par rapport à apoMerP). Y66 est également plus distante de L_1 et n'est plus en interaction avec M12.

Dans HgMerP, les interactions significatives entre les boucles qui subsistent, voire même qui sont accrues par rapport à apoMerP, sont celles de M12 avec F38 et Y66.

Comme dans Hah1 et Atx1, M12 interagit davantage avec la seconde cystéine du motif MXCXXC (ici C17) lorsqu'un métal est lié, l'intensité de l'interaction étant toujours la plus importante pour les formes complexées au Cu^(I).

Caractères généraux des interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 dans Hah1, Atx1 et MerP

On utilise ici la numérotation des résidus selon l'alignement de la figure 7.52.

La méthionine M14 (M10 dans Hah1, M13 dans Atx1, M12 dans MerP) interagit toujours plus ou moins avec la seconde cystéine du motif M¹⁴TCXXC¹⁹. L'interaction est de nature hydrophobe et son intensité augmente lorsque le métal est lié, davantage en présence de Cu^(I) que de Hg^(II).

Le résidu polaire X44 (K38 dans Hah1, Q43 dans Atx1 et R41 dans MerP) joue un rôle structurant majeur dans l'interaction L_1-L_3 des 3 protéines, quel que soit leur état de métallation. X44 appartient à la triade M14/X41/X44 où X41 est un acide aminé hydrophobe de la boucle L_3 (L35 dans Hah1, L40 dans Atx1 et F38 dans MerP). Cette triade est généralement riche en interactions et assure une rigidification de l'association L_1-L_3 . Par ailleurs, les interactions de X41 avec M14 et X44 sont souvent constantes et peu sensibles aux formes des protéines, apo ou holo. L'effet de cette triade est plus variable dans MerP car les interactions sont plus «lâches» du fait de changements conformationnels importants de L_3 par rapport à L_1 quand un métal est lié.

Les interactions de la boucle L_1 avec la boucle L_5 sont différentes selon les protéines. Dans Hah1 et Atx1, le résidu remarquable est la lysine 66 (K60 dans Hah1 et K65 dans Atx1), tandis que dans MerP c'est une tyrosine en position 69 dans l'alignement de la figure 7.52 (pour plus de clarté, cette tyrosine sera appelée X66 pour la comparaison avec Hah1 et Atx1). Les interactions mises en jeu sont alors différentes. Les interactions de X66 dans Hah1 et Atx1 sont médiées par l'électrostatique alors que les interactions hydrophobes dominent dans MerP. Dans les formes apo, X66 interagit avec L_1 de manière variable d'une protéine à l'autre. En revanche dans les formes métallées, la différence entre MerP et Hah1 et Atx1 est plus nette. L'interaction de van der Waals entre X66 et L_1 (au niveau de M14) augmente dans HgMerP par rapport à apoMerP alors qu'elle disparaît dans CuMerP. A l'inverse, dans Hah1 et Atx1, l'extrémité ammonium de la chaîne latérale des lysines 66 pointe vers l'atome S_γ de C19 dans les formes Cu^(I) uniquement. Il n'y a pas d'interaction de X66 avec le motif $M^{14}TCXXC^{19}$ dans les formes liées au Hg^(II).

Enfin, X44 interagit souvent plus ou moins fortement avec un résidu de l'extrémité N-terminale de L_1 : D12 dans Hah1, N10 dans Atx1 et P12 dans MerP. ■

```

      5      10      15      20      25      30      35      40      45      50      55      60      65
Hah1  ---MPKHEFSVD-MTCGGCADAVSRVLNKLG--VKYDIDLPNKKVCIESEHSMDTLLATLKKTG
Atx1  MAEIKHYQFNVV-MTCSCGSGAVNKVLTKLEPDVSKIDISLEKQLVDVYTTLPYDFILEKIKKTG
MerP  --ATQTVTLAVPGMTCAACPITVKKALSKVEG-VSKVDVGFEKREAVVTFDDTKASVQKLTKATA

      70      75
Hah1  KTVSYLGLE-
Atx1  KEVR-SGKQL
MerP  DAGYPSSVKQ

```

FIG. 7.52 – Alignement des séquences d'Hah1, d'Atx1 et de MerP (réalisé avec le programme CLUSTALW). Les résidus des boucles L_1 , L_3 et L_5 dont les interactions ont été étudiés sont soulignés. Le motif consensus MXCXXC est situé entre les aminoacides aux positions 14 et 19.

Chapitre 8

Résultats des Expériences d’Absorption de Rayons X

Sommaire

8.1 XANES des sites Cu^(I)	167
8.1.1 Composés modèles	167
8.1.2 Echantillons d’intérêt biologique	169
8.2 Analyse de l’EXAFS	171
8.2.1 Affinement des oscillations EXAFS expérimentales	171
8.2.2 Distribution radiale des atomes voisins du Cu ^(I)	173
8.2.3 Modèles de complexation du Cu ^(I) par le glutathion et Atx1	176

8.1 XANES des sites Cu^(I)

8.1.1 Composés modèles

Les composés de référence utilisés ont été décrits au §6.4 (p. 84) : **I** est un complexe linéaire du Cu^(I), **II** est trigonal plan et **III**, tétraédrique. Les spectres XANES de ces complexes sont représentés sur la figure 8.1.

Les spectres des trois adduits modèles sont en accord avec la littérature. Etant donné la configuration électronique du Cu^(I) ($3d^{10}4s^1$), il ne peut pas y avoir de transition électronique $1s \rightarrow 3d$ caractéristique des orbitales $3d$ partiellement vacantes. C’est pourquoi, pour le Cu^(I), il n’y a pas de présueil avant le saut d’absorption. En revanche, il existe un présueil pour le Cu^(II) ($3d^9 4s^1$). Comme aucun des spectres des composés modèles ne présente de présueil, aucun complexe de Cu^(II) n’est présent.

Les travaux de Kau *et al.* [Kau *et al.*, 1987] ont mis en évidence une corrélation entre l’énergie, la forme et l’intensité du pic d’absorption du Cu^(I) situé à 8983-8984 eV, et la géométrie du site de coordination du métal. Ainsi, en passant d’une géométrie linéaire (2 ligands, nombre de coordination NC=2) à trigonale plane (NC=3) puis tétraédrique (NC=4), on remarque que l’intensité du pic à 8984 eV diminue

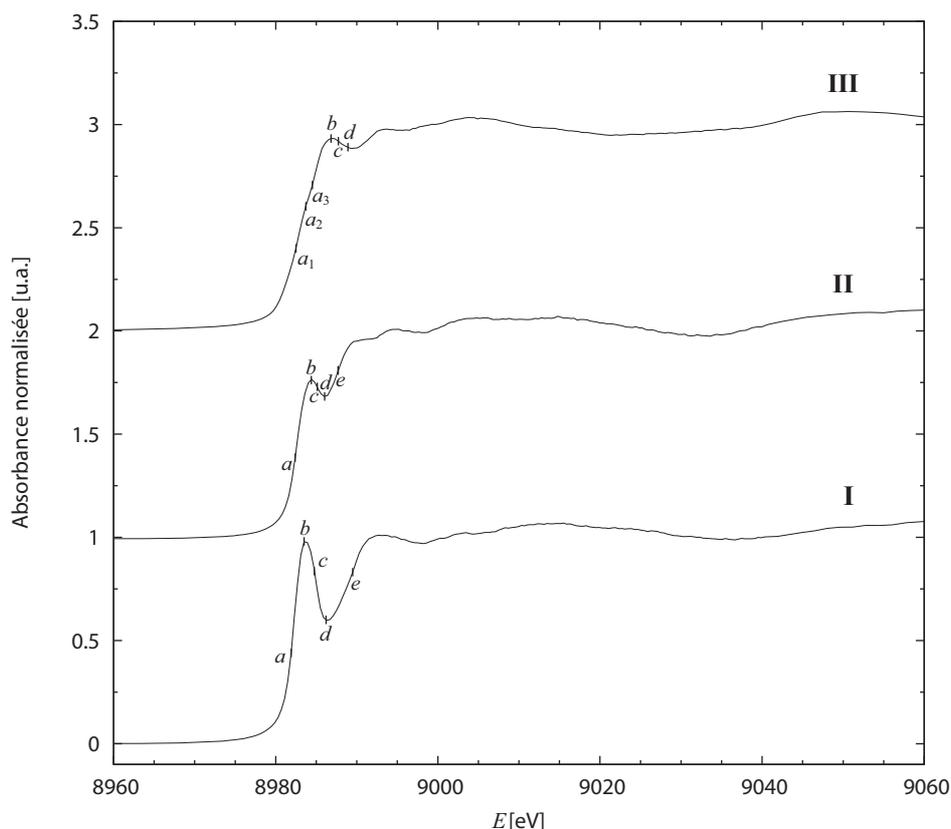


FIG. 8.1 – Spectres XANES normalisés des complexes modèles du Cu^{I} au seuil K du Cu . **I**, $[\text{Et}_4\text{N}][\text{Cu}(\text{SAd})_2]$; **II**, $[\text{Et}_4\text{N}]_2[\text{Cu}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-Cl})_3]$; **III**, $[\text{Cu}(\text{SC}_5\text{H}_5\text{N})_3]_2\text{Cl}_2$.

sensiblement, sachant qu'il est très intense quand la géométrie est linéaire. Entre les géométries linéaire et trigonale plane, il existe une géométrie limite dite *T-shaped* où deux ligands sont alignés avec le métal à des distances métal–ligand similaires, alors que le troisième ligand est plus éloigné du métal dans une orientation quasiment orthogonale à l'axe formé par les deux premiers ligands et le métal coordonné. Dans une telle géométrie, Kau *et al.* ont observé un pic d'intensité analogue à celle d'un composé à géométrie linéaire.

Les complexes modèles suivent la même tendance. Le composé **I** a un pic au seuil d'absorption à 8983.5 eV avec une amplitude normalisée de 0.98 (pic *b*). Dans le complexe **II**, la présence d'une troisième ligand réduit l'intensité du premier pic d'absorption (*b*) à 8984.3 eV à la valeur de 0.77. Pour la structure tétracoordinée **III**, le principal pic d'absorption est déplacé vers des énergies plus grandes à 8986.8 eV, avec une amplitude normalisée de 0.94.

L'attribution des deux premiers pics des spectres d'absorption est facilitée par l'utilisation des dérivées de l'absorbance. Les valeurs des énergies correspondant aux pics *a*, *b*, *c*, *d* et *e* sont données dans le tableau 8.1.

Les complexes **I** et **II** présentent des spectres XANES très proches, comme l'étude de Kau *et al.* pouvait le prévoir, alors que celui de **III** est décalé vers de plus grandes

Composés modèles	Energies caractéristiques				
	<i>a</i> [eV]	<i>b</i> [eV]	<i>c</i> [eV]	<i>d</i> [eV]	<i>e</i> [eV]
I	8981.9	8983.5	8984.6	8986.2	8989.5
II	8982.4	8984.3	8984.8	8985.8	8987.2
III	8982.5 (<i>a</i> ₁) 8983.7 (<i>a</i> ₂) 8984.5 (<i>a</i> ₃)	8986.8	8987.7	8988.9	<i>nr</i>

TAB. 8.1 – Energies caractéristiques des spectres XANES des composés modèles. *nr*, pic non résolu.

énergies. L'étude des spectres des dérivées de l'absorbance montre trois points d'inflexion (*a*₁, *a*₂ et *a*₃). Ils correspondent probablement au premier pic à environ 8983.8 eV rapporté par l'étude de Kau *et al.* pour un composé tétraédrique du Cu^(I) coordonné par 4 thiolates. Ce pic est d'autant mieux défini que l'interaction du Cu^(I) avec le ligand est forte (*i.e.* covalente), ce qui est le cas avec un thiolate.

8.1.2 Echantillons d'intérêt biologique

Les échantillons étudiés sont des complexes de Cu^(I) dont les ligands sont : le glutathion (**A**), Atx1 (**B**) et Atx1 en présence de glutathion (**C**).

Les spectres XANES des échantillons **A**, **B** et **C** sont sur la figure 8.2.

Les spectres XANES des complexes **A-C** ne montrent aucun préseuil. Il n'y a donc pas de complexe de Cu^(II). Les énergies caractéristiques des pics sont indiquées dans le tableau 8.2.

Complexes	Energies caractéristiques			
	<i>a</i> [eV]	<i>b</i> [eV]	<i>c</i> [eV]	<i>d</i> [eV]
A	8982.4	8983.6	8984.0	8984.2
B	8983.5	8984.9	8985.5	<i>nr</i>
C	8982.1	8984.0	<i>nr</i>	<i>nr</i>

TAB. 8.2 – Energies caractéristiques des spectres XANES des composés d'étude **A**, **B** et **C**. *nr*, pic non résolu.

Le seuil d'absorption des trois spectres (pic *b*) est proche de 8984.3 eV, comme pour le seuil du composé **II**. En outre, la comparaison avec les spectres XANES des composés **I-III** suggère que les amplitudes normalisées du premier pic d'absorption (annoté *b* sur la figure 8.2, sont compatibles avec un environnement trigonal plan pour le Cu^(I) dans les trois complexes (**A** : 0.51, **B** : 0.78 et **C** : 0.74).

Par ailleurs, les spectres des dérivées de l'absorbance indiquent des énergies caractéristiques (*a*, *b* et *c* principalement) analogues à celles mesurées pour le composé modèle trigonal plan **II** (Tab. 8.2).

L'intensité du pic *b* du complexe **A** est plus faible par rapport à celle des autres composés **B** et **C** et du complexe de référence **II**. Cependant, le bon accord entre les

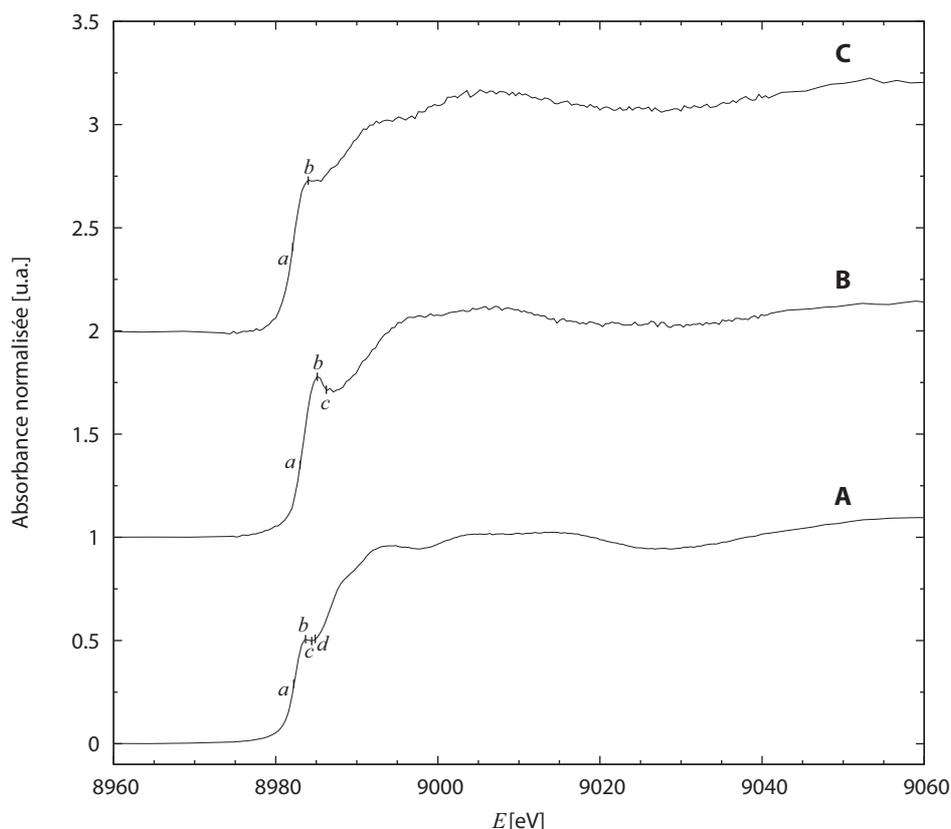


FIG. 8.2 – Spectres XANES normalisés au seuil K du Cu des complexes du $\text{Cu}^{(I)}$ du glutathion (**A**), d'Atx1 en absence de glutathion (**B**) et d'Atx1 en présence de glutathion (**C**).

valeurs des énergies caractéristiques a , b , c et d qui existe avec celles relevées pour le composé modèle **II** et les deux autres échantillons d'Atx1, tend à prouver qu'une géométrie trigonale pour le $\text{Cu}^{(I)}$ complexé par du glutathion est la plus probable. La tricoordination du $\text{Cu}^{(I)}$ complexé par Atx1 en absence de glutathion (**B**) est en accord avec le modèle trigonal proposé par Pufahl *et al.* [Pufahl *et al.*, 1997].

La signature du complexe de coordination du $\text{Cu}^{(I)}$ par Atx1 en présence de glutathion (**C**) est moins bien définie, très probablement à cause d'un rapport signal sur bruit défavorable. Toutefois, la comparaison qualitative de son spectre XANES à ceux des composés linéaire (**I**) et tétraédrique (**III**), ainsi que la comparaison des valeurs des énergies des pics aux points a et b , excluent ces modèles comme coordination potentielle du $\text{Cu}^{(I)}$.

Par ailleurs, les spectres XANES de **A**, **B** et **C** présentent la même allure générale que ceux rapportés par Xiao *et al.* dans leur étude de la complexation du $\text{Cu}^{(I)}$ par Ctr1c [Xiao *et al.*, 2004], à la fois pour le composé modèle utilisé qui est trigonal plan, et pour le modèle de Ctr1c proposé sous la forme d'un complexe polynucléaire de type $\text{Cu}_4^{(I)}(\mu - \text{S} - \text{Cys})_6$ où les 6 thiolates endogènes de Ctr1c sont dans une topologie où tous les soufres sont pontants.

8.2 Analyse de l'EXAFS

8.2.1 Affinement des oscillations EXAFS expérimentales

Les oscillations EXAFS des complexes **A**, **B** et **C** sont reportées sur la figure 8.3. Le signal, obtenu après traitement conformément à la procédure décrite au §6.2.3, y est représenté pondéré par une composante en k afin d'amplifier les oscillations aux grands vecteurs d'onde \mathbf{k} . L'étude s'est limitée à des vecteurs d'onde $|\mathbf{k}| < 10 \text{ \AA}^{-1}$ car au delà, les spectres apparaissent trop bruités et perturbent l'analyse.

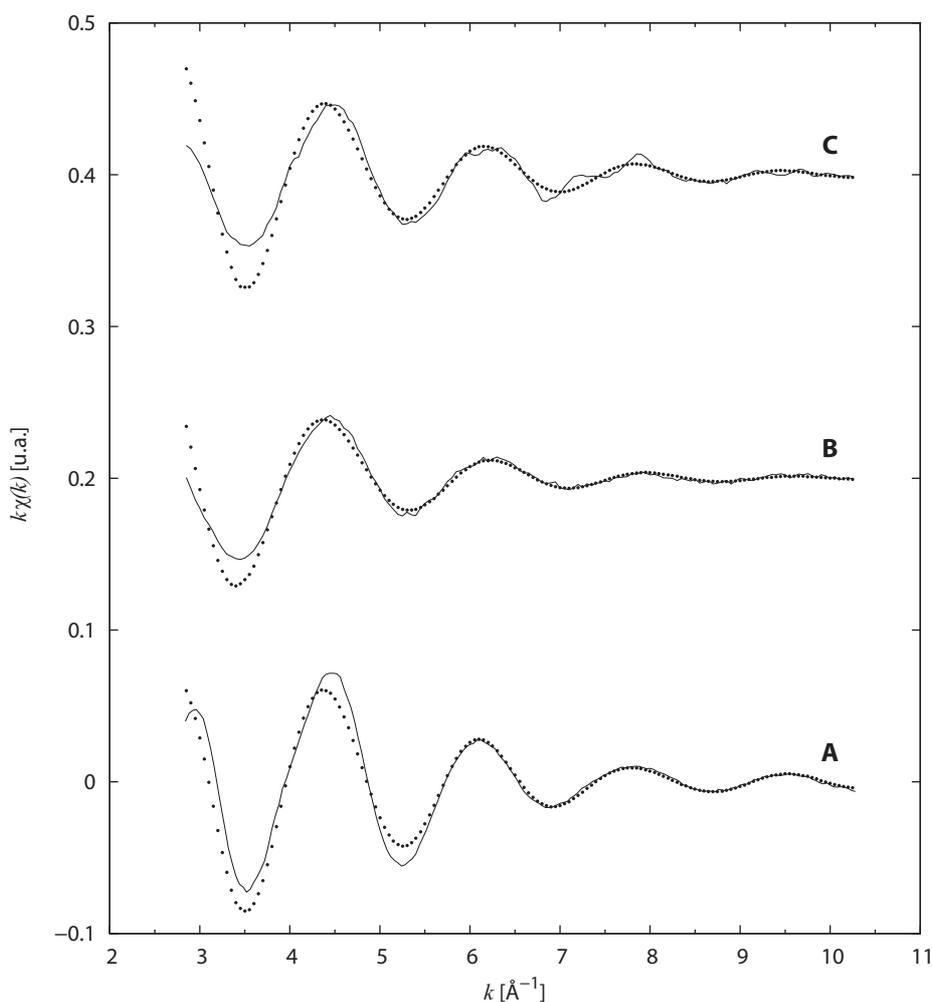


FIG. 8.3 – Oscillations du signal EXAFS des complexes du $\text{Cu}^{(I)}$ du glutathion (**A**), d'Atx1 en absence de glutathion (**B**) et d'Atx1 en présence de glutathion (**C**). (—) Oscillations expérimentales de $k\chi(k)$; (\cdots) Oscillations affinées.

Etant donné que l'étude du XANES des 3 complexes **A**, **B** et **C**, a conclu à une géométrie trigonale plane du $\text{Cu}^{(I)}$ dans chaque cas, l'affinement des signaux EXAFS, $k\chi(k)$, a été effectué pour chacun des complexes en prenant en considération différents environnements locaux, mais en respectant la symétrie trigonale mise en évidence par le XANES.

Les affinements ont été réalisés dans un intervalle $[2.7 \text{ \AA}^{-1}; 10.3 \text{ \AA}^{-1}]$ en vecteur

d’onde, avec le programme ARTEMIS [Ravel, 2005]. Ainsi les paramètres structuraux initiaux choisis comme paramètres d’entrée pour les ajustements respectent cette contrainte.

Contrairement aux complexes **B** et **C**, dans le cas du complexe **A**, un traitement correct de toutes les diffusions détectées par EXAFS au niveau du proche environnement du métal (limite de sensibilité de la technique égale à environ 5 Å) a nécessité la prise en compte d’un second atome de cuivre à une distance inférieure à 3 Å. Il sera par la suite discuté en détail de la présence ou non de ce cuivre dans les complexes formés.

Pour les affinements en moindres carrés (visibles sur la figure 8.3), seuls des chemins de diffusion simple depuis les atomes S_γ , C_β , O et Cu ont été introduits dans la procédure d’ajustement. L’ajout de chemins de diffusion multiple n’a pas amélioré la qualité des affinements. Les distances S_γ -Cu et C_β -Cu utilisées en début de procédure d’affinement sont extraites de la structure cristallographique du composé modèle CuS_3 (**II**), alors que, lorsque nécessaire, la distance Cu-Cu est issue de la structure cristallographique du complexe modèle Cu_2S_6 (**III**). La distance initiale O-Cu est calculée à partir d’une structure obtenue par mécanique moléculaire de CuAtx1, en contraignant les deux sulfures de C15 et C18 de telle manière à adopter une géométrie compatible avec une géométrie pseudo-trigonale. Un troisième ligand, le carbonyle de la cystéine C15 en l’occurrence, a ainsi été identifié comme ligand potentiel endogène, se positionnant à 1.97 Å du cuivre, dans une géométrie pseudo-trigonale (le dièdre impropre (Cu, S_γ^{C15} , S_γ^{C18} , O^{C15}) a une valeur de 22° dans cette structure modélisée.

Les paramètres électroniques, décrits au §6.2.2 (phases φ_j et les amplitudes de rétrodiffusion f_j du photoélectron, ainsi que les libres parcours moyens λ), ont été initialement calculés par le programme FEFF [Rehr et Albers, 2000] pour les atomes d’intérêt (S_γ , C_β , O et Cu) en se référant aux structures du complexe CuAtx1 (1FD8) [Arnesano *et al.*, 2001a] et du composé modèle de type Cu_2S_6 (**III**) [Stergioudis *et al.*, 1987].

Un bon accord est obtenu sur la périodicité des oscillations EXAFS et leur amortissement, même si des différences en amplitude sont visibles aux faibles valeurs de k . Un tel comportement est usuel dans une procédure de traitement du signal d’absorption X. La qualité des affinements peut s’exprimer par les facteurs de confiance de chacun des affinements : ils sont ici respectivement de 95.3%, 92.9% et 94.4% pour les complexes **A**, **B** et **C**. Les paramètres finaux obtenus à l’issue des affinements avec ARTEMIS sont listés dans le tableau 8.3.

Il est important de souligner que les écarts pour ces paramètres entre les valeurs d’entrée et les valeurs optimales obtenues par affinement sont minimales. Ceci valide les justifications émises pour le choix de la nature et du nombre d’atomes rétrodiffuseurs, ainsi que l’analyse globale des signaux XANES pour ces trois complexes.

Complexes	Nature du ligand j	N_j	R_j [Å]	σ_j^2 [Å ²]
A	S	3	2.26	0.004
	C	3	3.42	0.035
	Cu	1	2.68	0.008
B	S	2	2.24	0.009
	O	1	1.94	0.019
C	S	3	2.27	0.008
	C	3	3.43	0.069

TAB. 8.3 – Paramètres finaux obtenus pour l'affinement des oscillations EXAFS des complexes **A**, **B** et **C**. N_j et R_j sont respectivement le nombre d'atomes de type j situés à la distance R_j du Cu^(I) absorbeur. σ_j^2 est le facteur de Debye-Waller associé à la sphère de coordination des atomes j (équation 6.6, p. 79).

8.2.2 Distribution radiale des atomes coordinants et des proches voisins du Cu^(I)

Les distributions radiales dérivées par transformée de Fourier (TF) de $k\chi(k)$ pour les complexes **A**, **B** et **C** sont reportées respectivement sur les figures 8.4, 8.5 et 8.6. Les distances R depuis le Cu^(I) absorbeur sont indiquées à un facteur de phase ϕ près, d'ordinaire déterminé par l'analyse fine de composés modèles. En d'autres termes, les distributions radiales doivent être décalées de ce facteur de phase pour correspondre aux valeurs des affinements affichées dans le tableau 8.3. La sensibilité de l'EXAFS permet de distinguer des atomes coordinants et/ou des proches voisins du Cu^(I) situés à une distance inférieure à 5 Å de l'atome absorbeur.

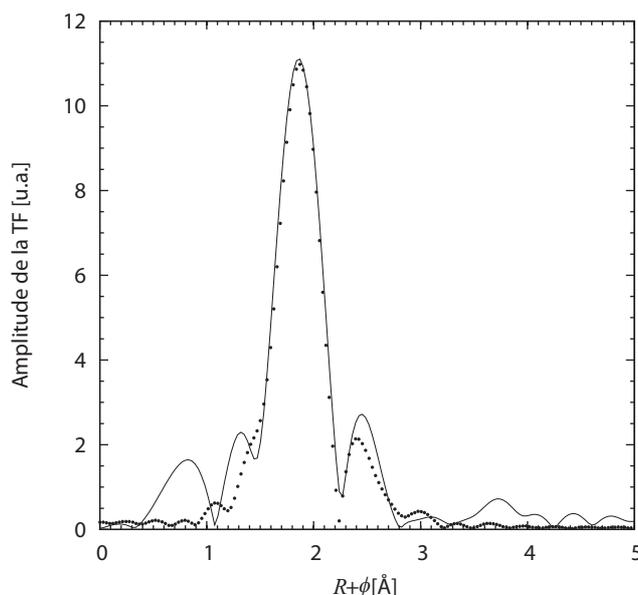


FIG. 8.4 – Amplitude de la TF de $k\chi(k)$ du complexe Cu^(I)-glutathion (**A**). Les distances R absorbeur-rétrodiffuseur sont à un facteur de phase ϕ près. (—) Amplitude de la TF à partir des données expérimentales de $k\chi(k)$; (···) TF affinées.

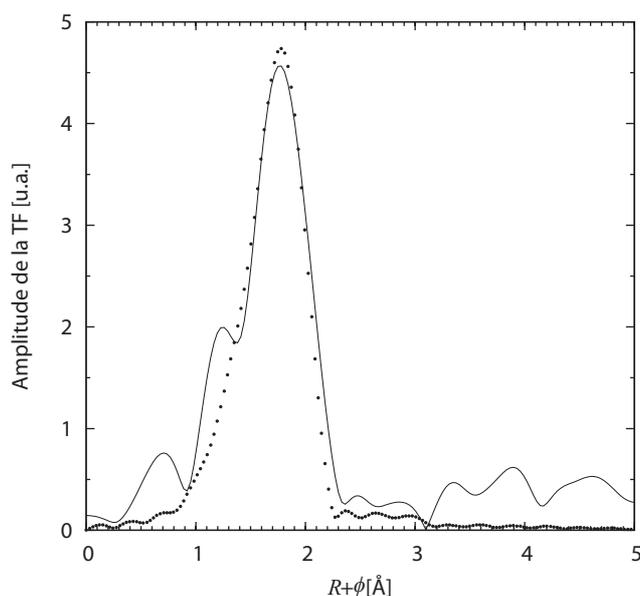


FIG. 8.5 – Amplitude de la TF de $k\chi(k)$ du complexe $\text{Cu}^{(\text{I})}$ -Atx1 en absence de glutathion (**B**). Les distances R absorbeur-rétrodiffuseur sont à un facteur de phase ϕ près. (—) Amplitude de la TF à partir des données expérimentales de $k\chi(k)$; (···) TF affinées.

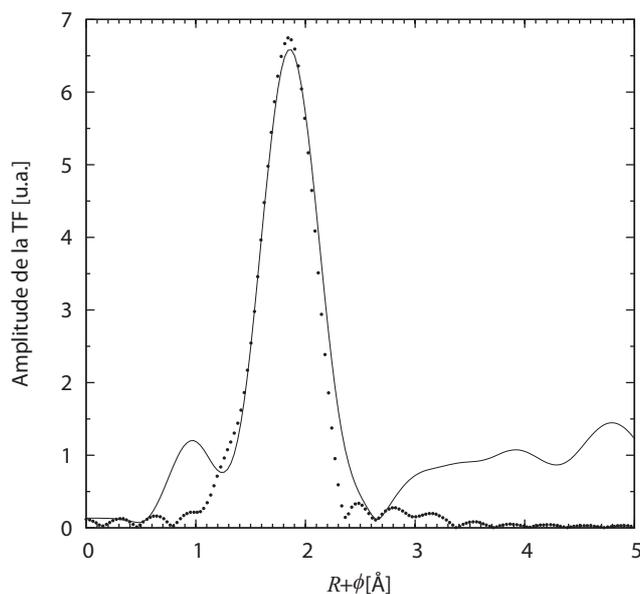


FIG. 8.6 – Amplitude de la TF de $k\chi(k)$ du complexe $\text{Cu}^{(\text{I})}$ -Atx1 en présence de glutathion (**C**). Les distances R absorbeur-rétrodiffuseur sont à un facteur de phase ϕ près. Les distances R absorbeur-rétrodiffuseur sont à un facteur de phase ϕ près. (—) Amplitude de la TF à partir des données expérimentales de $k\chi(k)$; (···) TF affinées.

Sur ces figures, les distributions radiales de chacun des complexes sont quasiment unimodales, montrant une composante majoritaire correspondant aux trois atomes coordonnant le métal (S_γ , O). Quelle que soit la nature du complexe examiné, il est remarquable de constater que la distance $\text{Cu}-\text{S}_\gamma$ est parfaitement conservée (2.26 à 2.27 Å), tendant à indiquer que les propriétés électroniques du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ et des

ligands soufre définissent une organisation préférentielle de la première sphère de coordination des complexes dans une géométrie trigonale quasi-canonique.

Cette tendance semble être également confirmée par la conservation des valeurs affinées pour les distances Cu–C dans le cas des complexes **A** et **C** (pour le complexe **B**, l'introduction des atomes de carbone n'améliorait en rien l'affinement). Il est par ailleurs important de constater que le barycentre du pic principal est légèrement déplacé vers les plus faibles valeurs de $R + \phi$ dans le cas du complexe **B** (CuAtx1 sans glutathion), puisqu'intégrant l'oxygène de la fonction carbonyle de la cystéine 15 déterminé par mécanique moléculaire à 1.94 Å et affiné à 1.97 Å. Dans le cas du glutathion seul (complexe **A**), un épaulement supplémentaire significatif est visible à $R + \phi \approx 2.5$ Å, correspondant à la présence d'une distance Cu–Cu détectée, égale à 2.68 Å.

La stabilité structurale des complexes trigonaux du Cu^(I) mis en évidence ici, peut néanmoins être discutée sur la base des facteurs de Debye-Waller, lesquels incluent à la fois le désordre dynamique et statique des complexes. D'après le tableau 8.3, il semblerait que les complexes **B** et **C** soient «plus dynamiques» ou «moins structurés» que le complexe **A**. Une explication pourrait résider dans la nature protéique des complexes **B** et **C** : même si la flexibilité intrinsèque de la chaîne polypeptidique et des chaînes latérales est susceptible d'accommoder le positionnement de trois ligands donneurs autour du métal, l'encombrement stérique de la protéine doit limiter la structuration d'une géométrie trigonale plane idéale. Une géométrie trigonale plane distordue est sans doute plus raisonnable pour ces deux complexes. Pour le complexe **A**, la taille réduite des ligands et une accessibilité plus importante du métal semblent autoriser une meilleure structuration du complexe. Le caractère très intense du pic principal sur la composante $\chi(R)$, pourrait être une signature d'une moindre dispersion des distances Cu–S.

Géométries des complexes de Cu^(I) du glutathion et d'Atx1, en présence et en absence de glutathion

Une structure locale stable trigonale autour du Cu^(I) est donc mise en évidence, nécessitant la participation de trois ligands donneurs que semble accommoder chacun des complexes, selon un modèle 3S ou 2S+O.

Dans le cas du complexe **A**, 3 molécules de glutathion lient un Cu^(I) par un effet coopératif. La coopérativité se justifie par l'existence d'une seule espèce majoritaire.

Le complexe **B** met en évidence une flexibilité intrinsèque de la boucle L₁ de la protéine Atx1 pour faciliter l'approche du carbonyle de la cystéine 14.

Quant au complexe **C**, Atx1 ne pouvant fournir que deux ligands soufre, la participation d'un glutathion à la coordination d'un Cu^(I) apparaît comme envisageable. Elle est discutée plus loin au §8.2.3.2. ■

8.2.3 Modèles de complexation du Cu^(I) par le glutathion et Atx1

Sur la base des résultats de XANES et d'EXAFS, certains modèles moléculaires peuvent être proposés comme structures dominantes pour chacun de ces complexes. Le choix de ces modèles est discuté en fonction de considérations d'ordre cellulaire sur la séquestration et le transfert du cuivre(I).

8.2.3.1 Les complexes Cu-glutathion

Le glutathion (GSH) est un séquestrant cellulaire majeur du cuivre dans la cellule. De nombreuses expériences de reconstitution de métalloenzymes à partir de leurs formes apo ont été réalisées en envisageant le glutathion en tant que donneur cellulaire principal de cuivre(I). La reconstitution des formes holo de la Cu,ZnSOD [Ciriolo *et al.*, 1990] ou de l'hémocyanine [Brouwer et Brouwer-Hoexum, 1992] à partir des apoprotéines, a été notamment examinée *in vitro* en utilisant le glutathion comme seul convoyeur moléculaire de cuivre. Ces études n'ont que très peu abordé la question des formes moléculaires des complexes Cu-GSH existantes, tant du point de vue de leur stœchiométrie que de leur structure. Des données parcellaires sur ce problème peuvent néanmoins être isolées de la littérature. Les résultats des expériences d'absorption X présentées ici apportent un modèle d'interaction du glutathion avec le Cu^(I).

Il a été montré par RMN [Kato *et al.*, 1999] que pour un excès de ligand (glutathion) par rapport au métal, la formation d'espèces polymériques de type (GS⁻Cu⁺)_n était observée en conditions non-oxydatives (anaérobie, atmosphère d'argon) censées reproduire les conditions de la cellule (pas ou très peu d'espèces réactives de l'oxygène en conditions normales) [Corazza *et al.*, 1996]. De telles espèces polymériques contribuent à l'élargissement du spectre 1D ¹H-RMN. Cet effet spectral pourrait néanmoins être imputable à des échanges entre espèces polymériques de différentes stœchiométries.

Par ailleurs, Vortisch *et al.* [Vortisch *et al.*, 1976] ont examiné par des mesures de titration acide la coordination du cuivre par des groupements soufrés, en utilisant différents ligands modèles : thiolates, thiols, thioéthers *etc.* Ces mesures ont été réalisées dans un mélange eau:acétonitrile 1:1, environnement éloigné du milieu intracellulaire et du milieu utilisé pour les expériences EXAFS, puisqu'il est reconnu que l'acétonitrile complexe le cuivre(I). Ils identifient ainsi le glutathion comme appartenant à une classe de molécules (thiols potentiellement bidentates) susceptibles de donner, sous certaines conditions de pH, deux coordinations avec le cuivre grâce à son sulfhydryle -SH et la fonction amide de la liaison peptidique -CONH-. Si cela s'avère vrai pour une large gamme de ligands de ce type, ils observent en revanche que la fonction peptidique du glutathion (même à des pH allant jusqu'à 14) ne se déprotone pas, et qu'une seconde coordination n'apparaît jamais. A des concentrations de ligands faibles, l'espèce majoritaire a été déterminée comme étant [Cu⁺-SR]. A des concentrations supérieures en ligands thiolates (RS⁻), Vortisch *et al.* détectent la formation d'un complexe binucléaire [RS-Cu-RS-Cu-SR]⁻ (**M1a**), susceptible de polymériser sous une forme polynucléaire (notée **M2**) où chaque Cu^(I) possède une

sphère de coordination à 4 sulfures (Fig. 8.7). Un équilibre existe entre ces deux formes.

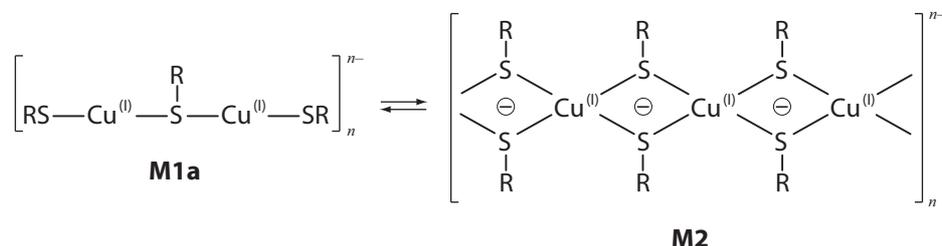


FIG. 8.7 – Polymérisation du complexe de glutathion binucléaire **M1a** en complexe polynucléaire (**M2**) déterminée par Vortisch *et al.* [Vortisch *et al.*, 1976]. Chaque $\text{Cu}^{(I)}$ dans **M2** est dans une géométrie tétraédrique.

Etant donné le caractère purement qualitatif de nos analyses XANES, il ne semble alors pas surprenant de détecter (pour un excès de GSH) un complexe possédant une symétrie trigonale, pouvant être un intermédiaire entre **M1a** et **M2**, ou du moins une moyenne. D'un point de vue des distances Cu-S, le composé modèle CuS_2 fournit une distance Cu-S de 2.16 Å, alors que le composé modèle Cu_2S_6 en donne une autre de 2.32 Å. Un équilibre fortement déplacé vers la forme polymérique **M2** de Vortisch *et al.* serait donc en accord avec nos résultats. Faute de temps de faisceau disponible, nous n'avons pas pu valider l'existence d'un tel équilibre, par la mesure du signal EXAFS à différents rapports stoechiométriques Cu:GSH.

Les données XANES, notamment l'accord avec les composés modèles pour les dérivées premières du signal, penchent néanmoins fortement en faveur d'une espèce stable possédant la symétrie trigonale au niveau de sa première sphère de coordination. Ces résultats concordent avec l'étude de Corazza *et al.* qui a mis en évidence par RMN et par EXAFS, l'existence d'une forme polymérique de complexes trigonaux du $\text{Cu}^{(I)}$ [Corazza *et al.*, 1996]. En aucun cas nous ne pouvons affirmer avoir pu détecter un intermédiaire furtif de polymérisation. Une alternative au modèle de polymérisation proposé par Vortisch *et al.*, en plein accord avec nos données, pourrait donc être celui de la figure 8.8 où l'unité monomérique est un cluster Cu_2S_4 de 2 $\text{Cu}^{(I)}$ trigonaux (**M1b**), contrairement au monomère **M1a** prédit par Vortisch *et al.* pour le glutathion.

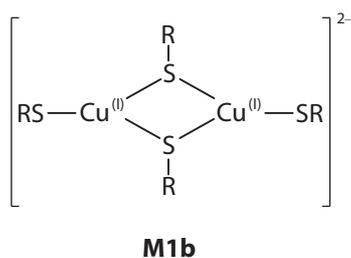


FIG. 8.8 – Entité monomérique Cu_2S_4 du polymère de glutathion proposé à partir de nos résultats (noté **M1b**). Chaque $\text{Cu}^{(I)}$ est dans une géométrie trigonale.

Chacun de ces modèles (**M1a** et **M1b**) peut condenser (à forte concentration en ligand) pour donner la même espèce polymérique **M2**. Néanmoins, notre modèle présente l’avantage de distinguer une espèce monomérique stable, avec la symétrie trigonale pour le $\text{Cu}^{(I)}$. Dans le complexe **M1b**, les distances Cu–S et Cu–Cu détectées contraignent l’angle $S_p\text{–Cu–}S_p$ à une valeur de 107.6° (S_p , soufre pontant). Si les angles $S_t\text{–Cu–}S_p$ (S_t , soufre terminal) sont maintenus à la valeur canonique de 120° , alors on est en présence d’un cluster binucléaire présentant une symétrie trigonale distordue.

8.2.3.2 Modèles pour la complexation du $\text{Cu}^{(I)}$ par Atx1

In vivo, Atx1 séquestre un seul ion $\text{Cu}^{(I)}$ pour le convoier vers Ccc2, sa protéine partenaire. De nombreuses structures en solution d’Atx1 ou de domaines homologues (incluant des domaines solubles d’ATPases), obtenues par RMN en présence de leurs cofacteur métallique physiologique ($\text{Cu}^{(I)}$), montrent la participation constante des deux cystéines à la coordination du métal.

• Complexe du $\text{Cu}^{(I)}$ par Atx1 en absence de glutathion

L’EXAFS de CuAtx1 réalisé par Pufahl *et al.* [Pufahl *et al.*, 1997] a mis en évidence une géométrie trigonale distordue du $\text{Cu}^{(I)}$ où les deux cystéines C15 et C18 d’Atx1 lient le $\text{Cu}^{(I)}$, le troisième ligand étant certainement une molécule de DTT provenant du milieu (cf §2.3.1.1, p. 19).

Contrairement aux conditions expérimentales de Pufahl *et al.*, le milieu de préparation du complexe **B** $\text{Cu}^{(I)}$ -Atx1 ne comporte pas de DTT. Pourtant, l’étude du spectre XANES montre une géométrie trigonale, confortée par l’EXAFS. Dans **B**, la tricoordination du $\text{Cu}^{(I)}$ est atteinte grâce à la participation de l’oxygène carbonyle de C15.

Une tricoordination du $\text{Cu}^{(I)}$ de type 2S+O a déjà été observée dans CuBsCopZ par Banci *et al.* [Banci *et al.*, 2003b]. Les auteurs ont en effet mis en évidence que, lorsque le milieu ne comporte pas de ligand soufré exogène potentiel mais de l’ascorbate, BsCopZ complète la sphère de coordination du $\text{Cu}^{(I)}$ en liant un oxygène de l’ascorbate. Les distances obtenues dans ce cas ($R_{\text{Cu–S}} = 2.25 \text{ \AA}$ et $R_{\text{Cu–O}} = 1.95 \text{ \AA}$) sont en parfait accord avec celles mesurées dans le cas d’Atx1 (2.24 \AA et 1.94 \AA respectivement).

Ce résultat tend à montrer qu’Atx1 complexe le $\text{Cu}^{(I)}$ dans une géométrie trigonale, quel que soit le milieu. Si un ligand exogène est présent, elle l’utilise, sinon un ligand endogène (O^{C15}) intervient. Comme cela avait déjà été mis en évidence pour BsCopZ [Banci *et al.*, 2003b], il existe une préférence pour la tricoordination dans Atx1. La figure 8.9 propose un modèle de coordination trigonale 2S+O du $\text{Cu}^{(I)}$ à partir de la structure d’Atx1 simulée sous contrainte avec le potentiel d’interaction $\text{Cu}^{(I)} \cdot \text{Cys}_2$ qui a permis de mettre en évidence l’implication de l’atome O^{C15} .

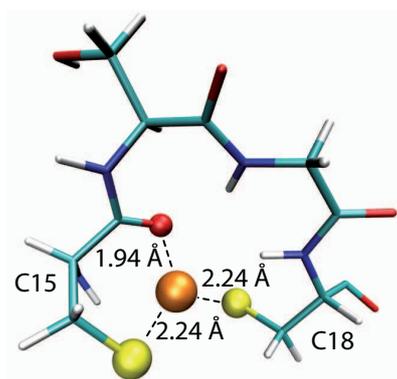


FIG. 8.9 – Modèle du site de la géométrie 2S+O du $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ dans Atx1 en absence de glutathion. Ce modèle est construit par mécanique moléculaire à l'aide de contraintes de distances entre les atomes S_γ de C15 et de C18. Les distances indiquées sont celles déduites de l'affinement du signal EXAFS du complexe **B**.

• Complexe du $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ par Atx1 en présence de glutathion

L'analyse du spectre XANES du complexe **C** indique que le $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ est dans une géométrie trigonale plane. L'affinement des oscillations de $k\chi(k)$ précise que, contrairement au composé **B**, c'est un troisième soufre qui coordine le $\text{Cu}^{\text{(I)}}$, à une distance équivalente des deux S_γ des cystéinates d'Atx1.

Ce troisième soufre peut provenir de deux ligands exogènes : une molécule de glutathion ou une deuxième protéine Atx1. On peut alors construire 3 modèles possibles pour le complexe **C** (Fig. 8.10).

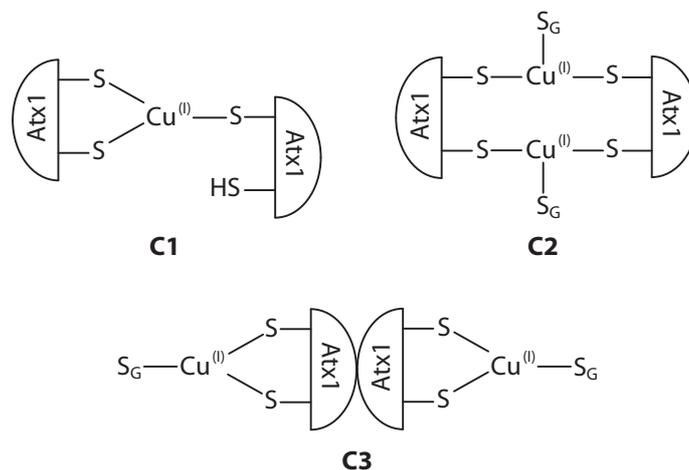


FIG. 8.10 – Modèles possibles du complexe **C** $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ -Atx1 en présence de glutathion. **C1**, Complexe homodimérique d'Atx1, mononucléaire, où un monomère d'Atx1 a une cystéine libre. **C2**, Complexe homodimérique d'Atx1, binucléaire, où chaque $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ est complexé par un cystéinate de chacun des deux monomères, le troisième ligand étant le soufre de la fonction thiolate du glutathion (S_G). **C3**, Complexe homodimérique d'Atx1, binucléaire, où chaque $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ est complexé par les deux cystéinates d'un même monomère, le troisième ligand étant le soufre de la fonction thiolate du glutathion (S_G).

L'étude de Miras *et al.* a établi l'existence *in vitro* d'un dimère d'Atx1 en présence de glutathion dont la stœchiométrie globale est $\text{Cu}_2(\text{Atx1})_2(\text{GS})_2$ où GS^- est une

molécule de glutathion dont la cystéine est sous forme thiolate [Miras *et al.*, 2005]. Cela invalide le modèle **C1**.

Les modèles **C2** et **C3** sont en revanche compatibles avec l’hypothèse d’un homodimère binucléaire. Le modèle **C2** suggère une proximité entre les deux ions $\text{Cu}^{(I)}$. Or l’affinement de l’EXAFS ne révèle pas de présence de rétrodiffusion Cu–Cu, contrairement au complexe du glutathion seul **A**. Deux hypothèses sont alors possibles : soit le modèle **C2** n’est pas le bon, soit la structure du dimère éloigne les deux $\text{Cu}^{(I)}$ à une distance au-delà de la limite de la résolution de l’EXAFS, si l’on considère que la raison principale de l’absence de signal n’est pas dû à un bruit trop important dans le signal. Quoi qu’il en soit, on ne peut pas départager les modèles **C2** et **C3** sur la base des données d’EXAFS.

Le modèle **C3** peut être dû au fait que les expériences ont été réalisées en milieu concentré (1mM) et aurait favorisé des interactions protéines–protéines qui n’ont pas lieu en milieu plus dilué.

Des homodimères $\text{Cu}^{(I)}$ -dépendants ont déjà été mis en évidence *in vitro* pour *EhCopZ* [Cobine *et al.*, 2002, Urvoas *et al.*, 2004], *BsCopZ* [Kihlken *et al.*, 2002, Banci *et al.*, 2003b], Hah1 [Rosenzweig et O’Halloran, 2000] et *ScAtx1* [Banci *et al.*, 2004a], et *in vivo* pour Hah1 [Tanchou *et al.*, 2004]. L’hypothèse d’un homodimère pour Atx1 paraît donc d’autant plus plausible.

Quatrième partie

Discussion

Chapitre 9

Discussion

Sommaire

9.1	Complexation du Cu^(I) et Hg^(II) dans une géométrie digonale 2S	184
9.1.1	Chélation du métal natif	185
9.1.2	Chélation du métal non natif	191
9.1.3	Existe-t-il une sélectivité de la chélation d'un métal?	194
9.2	Un modèle de sélectivité pour le Cu^(I)	195
9.2.1	Propriétés de complexation du Cu ^(I) par Atx1 <i>in vitro</i>	195
9.2.2	Propriétés de complexation du Cu ^(I) <i>in vivo</i>	195
9.3	Rôle pivot de la méthionine du motif MXCXXC	196
9.4	Un modèle d'interaction d'Atx1 avec Ccc2	197

Dans cette partie, une synthèse globale et comparative des simulations d'Hah1, d'Atx1 et de MerP dans leur forme apo et holo (liées au Cu^(I) ou au Hg^(II)), est présentée.

Les simulations de dynamique moléculaire des protéines métallées ont été permises grâce au développement de nouveaux potentiels d'interaction d'un cation métallique – Cu^(I), Hg^(II)– avec deux résidus cystéinates [Fuchs *et al.*, 2005]. Ces potentiels d'interaction ont été validés en confrontant les simulations de dynamique moléculaire aux données expérimentales disponibles : structures des protéines et géométries locales des métaux déterminées par EXAFS. Un très bon accord a été trouvé et a donc permis de réaliser des simulations avec une bonne confiance dans les modèles des holoprotéines proposés ici.

Cependant, il est important de garder à l'esprit les limitations intrinsèques des simulations. **Les potentiels d'interaction métal–cystéinates ne sont valables que pour des ions Cu^(I) ou Hg^(II) liés dans un environnement digonal, à deux soufres provenant de deux thiolates.** Par conséquent, bien que le potentiel Cu^(I)–S rende possible une interaction Cu^(I)–O pour un Cu^(I) trigonal dans une géométrie 2S+O, les potentiels modèles développés restent optimisés pour une interaction M+2S sans contrainte.

Ainsi, la question d'un troisième ligand soufré pour CuAtx1, suggérée par les

expériences d'EXAFS de Pufahl *et al.*, ne peut pas être confirmée ou infirmée par la simulation car seules les deux cystéines d'Atx1 sont correctement prises en compte par le champ de forces Cu^(I)-S. Le modèle proposé pour CuAtx1 à l'issue des simulations est donc un modèle théorique, où Atx1 chélate le Cu^(I) dans une géométrie linéaire, de la même façon qu'Hah1. De même, le modèle de CuMerP simulée ne laisse en aucun cas présager de la géométrie réelle du Cu^(I) dans MerP *in vitro*.

La sélectivité des métallochaperones Atx1, Hah1 et MerP pour le Cu^(I) et pour le Hg^(II) a été étudiée par dynamique moléculaire. Les propriétés dynamiques, structurales et énergétiques de ces trois protéines ont successivement été mises en lumière tout au long du chapitre 7. La comparaison avec les résultats des expériences d'absorption de rayons X par le Cu^(I) chélaté par Atx1, permet de proposer un modèle de sélectivité des métallochaperones pour le Cu^(I) ou le Hg^(II), et d'Atx1 en particulier, *in vitro* mais également *in vivo*.

Le rôle de la méthionine du motif MXCXXC a également été étudié pour tenter d'expliquer la raison pour laquelle c'est un acide aminé extrêmement conservé parmi l'ensemble des métallochaperones eucaryotes et procaryotes, à Cu^(I) ou à Hg^(II).

Dans l'étude comparative qui suit, la numérotation des résidus est celle de l'alignement de l'ensemble des séquences de métallochaperones avérées et potentielles réalisé par Arnesano et al. [Arnesano et al., 2002] (chapitre 2, Fig. 2.2, p. 15). Ainsi, les acides aminés clés identifiés jusqu'ici sont : M14 (M10 dans Hah1, M13 dans Atx1, M12 dans MerP), C16 et C19 les deux cystéines de la protéine qui lient le Cu^(I) ou le Hg^(II) (C12 et C15 dans Hah1, C15 et C18 dans Atx1, C14 et C17 dans MerP), X42 (L35 dans Hah1, L40 dans Atx1, F38 dans MerP) et X45 (K38 dans Hah1, Q43 dans Atx1, R41 dans MerP) dans L₃, et X73 (K60 dans Hah1, K65 dans Atx1, Y66 dans MerP) dans L₅.

9.1 Complexation du Cu^(I) et Hg^(II) dans une géométrie digonale 2S

La complexation d'un ion métallique par Hah1, Atx1 ou MerP impose des contraintes à la protéine. Les résultats des simulations de dynamique moléculaire ont montré que les différences majeures entre les formes holo et apo de ces métallochaperones résident essentiellement au niveau de la région liant le cation métallique, à savoir les boucles L₁ (dont le motif MXCXXC), L₃ et L₅. Pour autant, étant donné qu'*in vivo* Hah1 et Atx1 convoient le cuivre(I) et MerP le mercure(II), on peut se demander si les propriétés structurales et dynamiques des protéines varient en fonction de la nature du métal chélaté. En d'autres termes, ***la complexation du métal non natif conduit-elle à des propriétés différentes de la protéine dans une forme métallée native ?***

9.1.1 Chélation du métal natif

Hah1 et Atx1 complexent naturellement le $\text{Cu}^{(I)}$, tandis que MerP est une métallochaperone à $\text{Hg}^{(II)}$.

9.1.1.1 Une dynamique réduite dans les holoprotéines

Dans les apométallochaperones à cuivre, la boucle L_1 se caractérise par une relativement grande flexibilité. La présence du $\text{Cu}^{(I)}$ réduit significativement la dynamique de cette boucle avec des RMSF diminuant jusqu'à plus de 1.5 Å par exemple pour les aminoacides les plus mobiles. Des deux métallochaperones eucaryotes Atx1 et Hah1, seule la première fait l'objet d'un changement conformationnel très important où l'hélice α_1 augmente significativement en taille quand le cuivre est lié. Dans Hah1, bien que l'effet le plus notable soit aussi pour L_1 , la présence du $\text{Cu}^{(I)}$ tend également à diminuer la mobilité de la boucle L_3 .

La réduction de la flexibilité de l'holoprotéine par rapport à l'apoprotéine est une caractéristique largement partagée par l'ensemble des métallochaperones de la famille d'Atx1. La résolution expérimentale par RMN des structures d'Atx1 [Arnesano *et al.*, 2001a], d'Hah1 [Anastassopoulou *et al.*, 2004], de ScAtx1 [Banci *et al.*, 2004a] et de BsCopZ [Banci *et al.*, 2001b, Banci *et al.*, 2003a], a mis en lumière une relativement grande mobilité des résidus de la boucle L_1 , en particulier des acides aminés centraux du motif $\text{M}^{14}\text{XCXXC}^{19}$ ($\text{X}^{15}\text{CXXC}^{19}$) dont l'identification n'a pas toujours été possible directement à partir des spectres RMN. Par exemple, T15, S17, G18 et C19 du motif $\text{M}^{14}\text{TCSGC}^{19}$ dans Atx1, ou S15, C16, Q17 et H18 du motif $\text{M}^{14}\text{SCQHC}^{19}$ dans BsCopZ, montrent une dynamique très importante dans les formes apo, alors que lorsque C16 et C19 lient un ion cuivre(I), la mobilité globale de ces résidus est fortement diminuée, si bien que leur identification expérimentale devient possible.

La flexibilité de MerP apparaît quant à elle peu modifiée par la présence ou l'absence de mercure complexé. De manière très intéressante, les simulations de dynamique moléculaire mettent en évidence une faible mobilité de l'ensemble des résidus de la forme apo et non de de la forme liée au $\text{Hg}^{(II)}$. En outre, c'est dans HgMerP que la boucle L_3 possède la plus grande flexibilité. Ainsi, Steele *et al.* ont observé des différences spectroscopiques entre les deux formes de la protéine, certes au niveau du motif $\text{M}^{14}\text{TCAAC}^{19}$, mais aussi dans les boucles L_3 et L_5 , notamment pour les résidus F42 et Y73 respectivement [Steele et Opella, 1997]. *A priori*, cela ne semble pas aller dans le sens des simulations réalisées sur MerP. Toutefois, Steele *et al.* ont mesuré une dynamique plus importante des résidus de part et d'autre du motif MTCXXC d'apoMerP, et non au sein de ce motif. Quant à la flexibilité de L_3 , c'est effectivement en présence d' $\text{Hg}^{(II)}$ qu'elle augmente. La liaison du $\text{Hg}^{(II)}$ change donc localement l'environnement de cette boucle, notamment de F42, au point que sa dynamique en est profondément affectée.

Par conséquent, concernant la boucle L_1 qui lie le métal, **il existe entre Hah1 et Atx1 d'une part, et MerP d'autre part, des propriétés dynamiques**

distinctes et des évènements particuliers liés à la présence du métal natif (Cu^(I) pour Hah1 et Atx1, Hg^(II) pour MerP) : (i) la complexation du Hg^(II) ne rigidifie pas la boucle L_1 dans MerP, contrairement au Cu^(I) dans Hah1 et Atx1. Pour autant, **ce sont davantage les formes apo qui diffèrent que les formes holo natives.** En effet, la dynamique de la boucle L_1 d'apoMerP est semblable à celle de CuHah1 et de CuAtx1 (avec un RMSF moyen d'environ 0.75 Å). C'est donc la forme apo de MerP qui est singulièrement peu flexible. Il existe alors dans MerP, des facteurs structurants préexistants qui ne sont pas corrélés avec la présence du Hg^(II). (ii) A l'inverse, le comportement dynamique de L_3 dépend de la présence du métal. Dans HgMerP, L_3 est plus mobile que dans apoMerP. Dans CuHah1 et CuAtx1, elle est moins mobile et cette observation s'inscrit dans un effet global de rigidification des boucles à proximité du site de chélation du cuivre, *i.e.* des boucles L_1 et L_3 .

9.1.1.2 Dynamique des ligands cystéinates du motif MXCXXC

Le comportement dynamique des cystéines du site de chélation du métal (MXC¹⁶XXC¹⁹) est le même pour les trois protéines et pour chacune des formes apo et holo native, à l'exception d'apoAtx1. C16 réside toujours dans la boucle L_1 des apo- et holoprotéines.

Dans les formes apo, C19 est soit à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_1 (apoHah1, apoMerP), soit dans la boucle L_1 (apoAtx1). Dans apoHah1 et apoMerP, le fait d'appartenir à un élément de structure secondaire réduit la capacité de mouvement du résidu. Dans apoAtx1, C19 est au milieu de la boucle L_1 , *i.e.* dans une région de flexibilité maximale. Cet effet de structuration différentielle du motif de chélation semble donc constituer l'explication au fait que pour Atx1, C19 soit la plus dynamique, et non C16 comme dans apoHah1 et apoMerP. Les mêmes caractéristiques dynamiques des cystéines des apoprotéines se retrouvent également expérimentalement pour apoHah1 [Anastassopoulou *et al.*, 2004] et apoMerP [Steele et Opella, 1997]. Concernant apoAtx1, l'étude d'Arnesano *et al.* montre une mobilité analogue entre C16 et C19 [Arnesano *et al.*, 2001a].

Dans les états holo natifs, on observe la même tendance ($\text{RMSF}_{C_\alpha}^{C16} > \text{RMSF}_{C_\alpha}^{C19}$) mais dans une moindre mesure ($\Delta\text{RMSF} \approx 0.2$ Å) par rapport aux formes apo, où le RMSF de C16 peut être supérieur de 1.5 Å à celui de C19.

Dans Hah1 et Atx1, la liaison du Cu^(I) participe à la rigidification de la boucle L_1 , si bien que sa moitié C-terminale bascule dans α_1 . Ainsi, en plus de l'effet de la présence du métal qui solidarise les mouvements de C16 à ceux de C19, C16 se retrouve à l'extrémité C-terminale de L_1 dans CuHah1 et CuAtx1. Dès lors, sa mobilité décroît inévitablement. L'ampleur du phénomène est la plus importante pour Atx1 où l'extension N-terminale de l'hélice α_1 est de longueur équivalente à celle de l'hélice dans la forme apo. Il y a donc un réarrangement majeur au niveau de L_1 - α_1 dans Atx1, et qui n'est pas reproduit, du moins avec une telle amplitude, dans Hah1. Ce constat est remarquable aussi bien dans les simulations, qu'expérimentalement [Anastassopoulou *et al.*, 2004].

Les propriétés dynamiques des deux cystéines sont communes aux autres métallochaperones à cuivre (apoEhCopZ [Wimmer *et al.*, 1999], BsCopZ [Banci *et al.*, 2001b, Banci *et al.*, 2003a] et ScAtx1 [Banci *et al.*, 2004a]).

Il semble donc que le potentiel modèle M+2S pour le $\text{Cu}^{(I)}$ reproduise des nombreuses observations d'ordre expérimental, et permette ainsi d'apprécier dans le détail des modifications tant structurales que dynamiques du site de liaison métallique.

Dans le cas de MerP, la présence du mercure ne change pas la mobilité de C16, seule celle de 19 est réduite de 0.2 Å par rapport à apoHah1. Le repliement n'est pas non plus modifié localement. L'hélice α_1 est de taille identique dans les deux formes. Le réarrangement structural des cystéines induit par le $\text{Hg}^{(II)}$ n'est donc pas important. Ceci corrobore l'observation précédente d'une faible mobilité d'apoMerP.

9.1.1.3 Des effets structuraux variables

Les changements conformationnels globaux entre les formes apo et holo natives sont d'amplitude différentes, mais sont généralement localisés dans les boucles (toujours au moins dans L_1) et au niveau des hélices α_1 et α_2 (changements d'orientation).

Dans BsCopZ, Banci *et al.* ont montré que la différence structurale principale entre les formes apo et liée au $\text{Cu}^{(I)}$ est due à une réorientation des boucles L_1 et L_5 , et de α_1 , conduisant à un RMSD des positions des atomes du squelette peptidique de 2.21 Å entre apoBsCopZ et CuBsCopZ, RMSD qui chute à 0.97 Å si l'on ne superpose que les résidus du feuillet β [Banci *et al.*, 2003a]. Le même calcul des RMSD sur l'ensemble des résidus entre apoAtx1 et CuAtx1, et entre apoHah1 et CuHah1, fournit des valeurs respectives de 1.80 Å [Arnesano *et al.*, 2001a] et de moins de 1 Å [Anastassopoulou *et al.*, 2004]. Ces informations indiquent que la structure d'Hah1 est peu affectée par la présence du cuivre, alors que dans Atx1, il existe un certain effet dû à la métallation, pour l'essentiel au niveau de L_1 et de α_1 .

De ce point de vue, alors que les simulations d'Hah1 semblent être confortées par l'étude d'Anastassopoulou *et al.*, celles d'Atx1 le sont moins, car le RMSD calculé entre les structures moyennes apo et $\text{Cu}^{(I)}$ simulées est de 2.84 Å. Deux explications peuvent être avancées : d'une part, la structure initiale de la simulation d'Atx1 (fichier PDB 1FD8) est une structure moyenne, sans véritable signification physique, *i.e.* ne correspondant pas à une moyenne d'ensemble thermodynamique; d'autre part, les conditions expérimentales de résolution de la structure par Arnesano *et al.* ne sont pas reproduites par les conditions de simulation.

En effet, CuAtx1 1FD8 étant une structure moyenne ne correspondant pas forcément à un état d'équilibre, la simulation lui a permis de relaxer. Cette relaxation n'a pas nécessairement abouti à un repliement natif au minimum global dans le paysage énergétique de la protéine (mais dans un puits local). Dans ce cas, on observe ici la dynamique de CuAtx1 dans un autre puits de potentiel. Quoi qu'il

en soit, dans CuAtx1 1FD8, la géométrie du Cu^(I) est celle décrite en EXAFS par Pufahl *et al.* [Pufahl *et al.*, 1997], *i.e.* une géométrie où le Cu^(I) est tricoordiné par les cystéines C16 et C19 du motif MXCXXC, mais aussi par un atome de soufre d'une molécule de DTT exogène. Or les simulations de dynamique moléculaire sont ici réalisées en l'absence de troisième ligand. Le potentiel d'interaction Cu-S utilisé dans CHARMM est celui développé au laboratoire par Fuchs *et al.* [Fuchs *et al.*, 2005] où le Cu^(I) est complexé par 2 cystéinates. Un potentiel modèle M+3S est en cours de développement au laboratoire. Il n'a pas pu être exploité dans le cadre de cette thèse. Les calculs seront repris avec ce potentiel et une analyse comparative sera effectuée avec le potentiel M+2S.

Par conséquent, les différentes superpositions d'apoAtx1 et de CuAtx1 (simulée ou 1FD8) démontrent que lorsque le Cu^(I) est trigonal et lié à 3 soufres, le réarrangement structural par rapport à apoAtx1 est plus faible que lorsque le Cu^(I) n'est complexé que par les cystéines de la protéine. Dans ce dernier cas, les changements conformationnels concernent certes L_1 et α_1 (comme les études de dynamique ont pu le montrer, et comme dans CuAtx1 1FD8), mais également une réorganisation notamment de α_2 et des autres boucles.

Concernant MerP, on remarque des différences du même ordre que celles établies pour Atx1. Les structures moyennes d'apoMerP et d'HgMerP calculées à partir des simulations, ne se superposent pas aussi bien que les structures moyennes issues des conformères résolus expérimentalement par Steele *et al.* [Steele et Opella, 1997]. Là encore, c'est la structure holo native qui a le plus changé. Au cours de la simulation d'HgMerP, l'hélice α_1 s'est réorientée par rapport à α_2 entraînant ainsi L_1 dans son mouvement.

La disposition de l'hélice α_1 dans les métallochaperones simulées est donc un élément non négligeable car la structure et la dynamique de cette hélice sont directement reliées à celle de la boucle qui lie le métal. Dans ScAtx1, les plus grands réarrangements structuraux induits par la liaison du Cu^(I) concernent les boucles L_1 , L_3 et L_5 , ainsi que l'hélice α_1 [Banci *et al.*, 2004a]. C'est toute la région de la protéine autour du Cu^(I) qui se réorganise.

9.1.1.4 Un réseau d'interactions riche entre les boucles L_1 , L_3 et L_5

Les résidus de la boucle L_1 et de la partie N-terminale de l'hélice α_1 adoptent des conformations plus exposées au solvant dans les formes apo que dans les formes holo. Cela s'observe aussi bien dans Atx1 [Arnesano *et al.*, 2001a], Hah1 [Anastassopoulou *et al.*, 2004] et BsCopZ [Banci *et al.*, 2001b, Banci *et al.*, 2003a] que dans MerP [Steele et Opella, 1997], dans des proportions variables d'une protéine à l'autre.

La chélation du métal natif entraîne un remodelage des interactions autour du site métallique qui implique des résidus du motif M¹⁴XCXX¹⁹ et des boucles L_3 et L_5 . En dépit des variations de séquence et des conformations diverses des acides aminés qui peuvent induire des modifications locales dans les contacts inter-résidus,

un réseau global d'interactions électrostatiques et hydrophobes demeure constant parmi toutes ces protéines.

• Les apoprotéines

En comparant les structures des métallochaperones Atx1, Hah1, *BsCopZ*, *EhCopZ* et MerP, Banci *et al.* ont proposé que dans les apoprotéines, les contacts $L_1 - L_3$ sont privilégiés devant les contacts $L_1 - L_5$ [Banci *et al.*, 2003a]. La figure 9.1 illustre les interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 identifiées par Banci *et al.*. Ces contacts font souvent intervenir M14, C19 et X42. Les contacts avec X73 sont quant à eux souvent très réduits. Quand M14 n'est pas enfouie (comme dans apo*BsCopZ* et apoMerP), l'interaction de van der Waals avec la chaîne latérale de X42 est assurée par C19. Dans le cas où M14 est enfouie et en contact de van der Waals avec certains résidus du cœur hydrophobe (dans apo*EhCopZ*, apoAtx1 et apoHah1), des interactions entre M14 et C19 sont parfois favorisées.

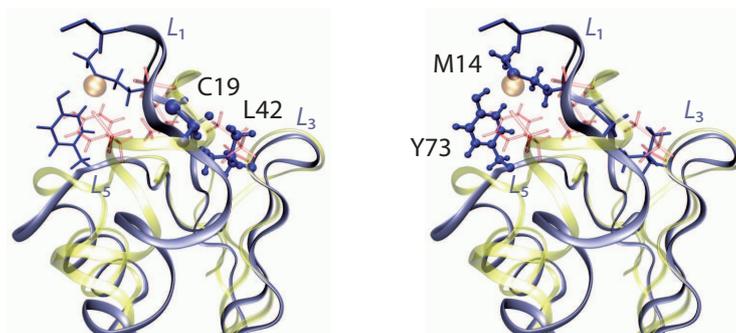


FIG. 9.1 – Modèles d'interactions entre les boucles L_1 et L_3 (à gauche) et L_1 et L_5 (à droite) dans apo*BsCopZ* proposés par Banci *et al.* [Banci *et al.*, 2003a]. En bleu, apo*BsCopZ*; en transparent, jaune et rouge, Cu*BsCopZ*.

Les simulations de dynamique moléculaire confortent en partie ce modèle et le complètent en introduisant un autre acide aminé de L_3 , aussi très conservé, qui est X45. C'est un résidu de nature variable mais toujours polaire : K45 dans Hah1, Q45 dans Atx1 et R45 dans MerP.

L'interaction $L_1 - L_3$ fait ainsi intervenir trois résidus, M14, X42 et X45. X42 est un résidu hydrophobe (leucine dans Hah1 et Atx1, phénylalanine dans MerP). Le résidu X45 est moins mobile que X42 dans la boucle L_3 d'Hah1 et d'Atx1. Sa position est davantage stabilisée.

Dans Hah1, K45 a sa chaîne latérale en interaction hydrophobe directe avec celle de M14. L'interaction M14-K45 est la plus importante dans apoHah1. L42 se positionne à proximité de ces résidus et développent des interactions hydrophobes de type van der Waals avec eux. L'étirement de la chaîne latérale de K45 est assuré par une interaction électrostatique très forte avec D12 (L_1) qui précède M14 (il y a une délétion dans l'alignement de la figure. 2.2 entre les positions 12 et 14 d'Hah1, p. 15). Dans Atx1, le carboxylate de Q45 contracte une liaison hydrogène avec le squelette peptidique de M14. L42 interagit avec M14.

Dans MerP, l'interaction avec M14 est indirecte car M14 est exposée au solvant et non enfouie. M14 interagit fortement avec le cycle aromatique de F42, et R45 vient former une liaison hydrogène avec le squelette peptidique de F42.

L'interaction $L_1 - L_3$ est effectivement dominante dans apoMerP et apoHah1, mais pas dans apoAtx1. Dans cette dernière, la boucle est plus étendue que dans les autres apoprotéines. C19 est complètement exposée au solvant, très mobile, alors que dans apoHah1 et apoMerP elle est enfouie, peu mobile, en contact avec le cœur hydrophobe (et M14 si elle est enfouie), et participe ainsi à l'ancrage de la boucle L_1 à proximité de L_3 . Dès lors, c'est l'interaction avec K73 dans apoAtx1 qui domine. K73 est en interaction directe avec l'ensemble du motif M¹⁴XCXXC.

• Les holoprotéines

Dans les holoprotéines, les interactions $L_1 - L_5$ sont favorisées notamment par des contacts entre M14 (voire aussi C16) et le résidu 73.

Dans les chaperones eucaryotes, ce résidu est invariablement une lysine. L'interaction avec la boucle L_1 est alors préférentiellement conduite par l'attraction électrostatique de l'extrémité amino de la lysine vers le site de liaison du cuivre(I) dont la charge nette est de -1 . L'atome N_ζ de la lysine K73 pointe ainsi vers l'atome S_γ de C19 dans les deux protéines. Dans la structure d'Atx1 d'Arnesano *et al.* [Arnesano *et al.*, 2001a], K73 passe d'une conformation exposée au solvant dans apoAtx1 à une autre plus enfouie à proximité de S_γ^{C16} . Dans les simulations, K73 n'est jamais accessible au solvant et pointe vers S_γ^{C19} . Ces différences s'expliquent peut-être aussi comme précédemment, par le fait que l'environnement du $Cu^{(I)}$ est différent entre les conditions expérimentales et de simulation.

En revanche, un très bon accord est trouvé entre la simulation de CuHah1 et les structures expérimentales de CuHah1, monomérique [Anastassopoulou *et al.*, 2004] et homodimérique [Wernimont *et al.*, 2000], où la plus grande différence entre apoHah1 et CuHah1 concerne la conformation de K73 qui dans la forme $Cu^{(I)}$, se rapproche de S_γ^{C19} .

Dans les métallochaperones telles que MerP et *BsCopZ*, on trouve un résidu hydrophobe en position 73 (une tyrosine dans les deux protéines). X73 interagit avec M14 dans les formes apo et métallées natives de ces protéines [Banci *et al.*, 2003b]. Quand le métal est lié, M14 n'est plus accessible au solvant, elle s'enfouit dans le cœur hydrophobe, aussi bien pour *CuBsCopZ* que pour HgMerP (Fig. 9.2).

Les simulations montrent que la boucle L_5 change aussi de conformation en présence de mercure pour MerP, comme Steele *et al.* l'ont décrit [Steele et Opella, 1997]. Y73 reste moyennement accessible cependant (SRA $\approx 20\%$), mais son interaction de van der Waals avec M14 est renforcée en présence de $Hg^{(II)}$. En outre, la configuration de M14 et Y73 permet à Y73 d'interagir aussi avec C19 qui, pour toutes les protéines, est enfouie en présence d'un métal lié, et en interaction avec M14.

Les mouvements du résidu X73 sont favorisés par le fait que le résidu en position 72

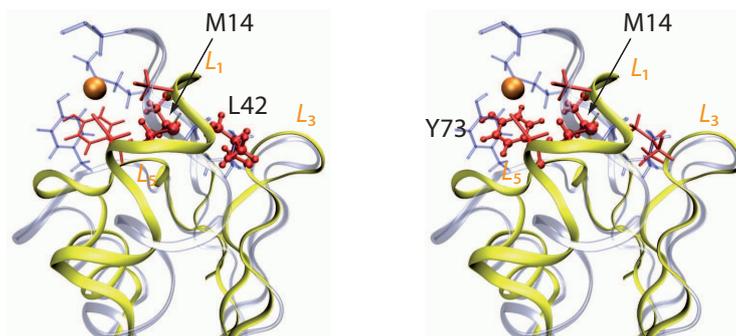


FIG. 9.2 – Modèles d’interactions entre les boucles L_1 et L_3 (à gauche) et L_1 et L_5 (à droite) dans CuBsCopZ proposés par Banci *et al.* [Banci *et al.*, 2003a]. En jaune et rouge, CuBsCopZ; en transparent, bleu, apoBsCopZ. L’ion $\text{Cu}^{(I)}$ est représenté par une boule orange.

est une glycine très conservée. Cela confère à X73 un plus grand degré de liberté conformationnelle selon qu’un métal soit lié ou non.

La **triade M14-X42-X45** permet toujours l’interaction $L_1 - L_3$ qui est même renforcée dans Hah1 et Atx1 grâce à la plus forte interaction de M14 avec X45. L’interaction avec X42 est plus labile dans CuAtx1 car cet acide aminé n’est pas dans une conformation favorable. Sa mobilité et son exposition au solvant sont augmentées en présence de $\text{Cu}^{(I)}$. On retrouve les mêmes changements dans HgMerP que dans CuAtx1. X45 ne développe alors que de faibles interactions hydrophobes avec M14. **Les interactions avec M14 sont privilégiées quand X73 est un résidu hydrophobe comme Y73 dans HgMerP. En revanche, quand c’est une lysine comme dans Atx1 et Hah1, K73 pointe vers le soufre de la seconde cystéine liant le $\text{Cu}^{(I)}$.**

9.1.2 Chélation du métal non natif

9.1.2.1 Une dynamique différente dans les holoprotéines

Dans les holoprotéines non natives, où Hah1 et Atx1 chélatent le $\text{Hg}^{(II)}$, et MerP le $\text{Cu}^{(I)}$, les propriétés dynamiques et structurales des protéines ne sont pas changées par rapport aux formes holo complexées au métal naturel.

La principale différence réside dans la mobilité de la boucle L_1 . Si l’on compare les différentes formes métallées d’Hah1 et de MerP, on remarque que la dynamique des résidus n’est pas affectée par le changement de métal, sauf pour la boucle L_1 où seule la présence de l’ion natif peut la rigidifier. En d’autres termes, **il y aurait donc dans la dynamique du site de chélation une signature du métal natif. En effet, la flexibilité de la boucle de complexation du métal est accrue, ou inchangée, quand la protéine n’est pas en présence du métal qu’elle chélate *in vivo*.**

Pour Atx1 en revanche, la dynamique de la boucle L_1 n’est pas modifiée : $\text{Hg}^{(II)}$, comme $\text{Cu}^{(I)}$, rigidifie la boucle L_1 avec la même intensité.

9.1.2.2 Une structuration globale et locale des holoprotéines

L'effet structural produit par la liaison des métaux est à la même amplitude par rapport aux apoprotéines correspondantes. Les changements de structure concernent essentiellement les boucles (L_1 et L_5 majoritairement) et l'orientation de l'hélice α_1 . Néanmoins, dans HgAtx1, la structure est davantage changée car c'est l'ensemble des hélices α qui se réarrangent.

Par ailleurs, bien que l'effet produit par la présence d'un métal soit sensiblement analogue quelle que soit la nature du métal lié (natif ou non natif), **la structure holo non native n'est pas la même que celle de l'holoprotéine native.** Par conséquent, la protéine adapte sa conformation en fonction de la nature du métal, même si la coordination de celui-ci est imposée par les potentiels d'interaction métal-cystéinates.

Cependant, localement, **la structure du site de chélation MXCXXC varie peu d'un métal à l'autre, et de façon très intéressante, d'une protéine à l'autre. Ainsi, le métal imposerait un certain arrangement conformationnel dans son environnement proche,** et la structure globale de la protéine réagit différemment à cette contrainte selon la nature du métal qu'elle chélate.

Le Cu^(I) a un effet structurant local plus marqué que le Hg^(II) sur le site de chélation. Les conformations des motifs liés au Cu^(I) se superposent mieux que celles des motifs en présence de Hg^(II). En outre, les résidus de la boucle L_1 autour du Cu^(I) ont leurs mouvements davantage corrélés comme les cartes des corrélations croisées dynamiques l'attestent. Cet effet est également visible pour CuMerP.

Par ailleurs, les mutants M14A et M14S d'Hah1 indique qu'en présence de Cu^(I), le motif (A/S)XCXXC retrouve la conformation de CuHah1 sauvage. **Le Cu^(I) impose ainsi une structure à son environnement,** même si celui-ci est très perturbé comme c'est le cas avec le mutant M14S.

La mobilité des résidus du motif MXCXXC d'Hah1, d'Atx1 et de MerP permet alors de mettre en évidence deux propriétés intéressantes liées à la nature du métal chélaté : la **stabilité dynamique du motif**, et la **stabilité structurale**. Si l'on prend l'état apo comme état de référence, la stabilité dynamique représente la facilité avec laquelle le motif peut adopter une conformation compatible avec la chélation (c'est un RMSD entre une forme holo et une autre apo). A partir du tableau 9.1, on remarque que MerP et Hah1 présente la plus grande adaptabilité, *i.e.* que leur motif s'accommode facilement à une géométrie digonale pour le métal. Ce n'est pas le cas pour Atx1 car on sait désormais que le Cu^(I) y est toujours trigonal. En d'autres termes, MerP, une protéine où le métal est naturellement digonal, et Hah1, où l'on sait que le Cu^(I) peut y être digonal, n'ont pas leur structure perturbée alors qu'Atx1 apparaît déstabilisée par la liaison d'un métal dans une géométrie à 2 ligands.

Pour autant, l'adaptabilité du site de chélation est remarquable si l'on compare les états holo cette fois-ci. Bien qu'Atx1 soit contrainte à adopter une géométrie linéaire pour son métal, elle présente, comme Hah1 et MerP, une faible divergence entre les structures liées au Cu^(I) et au Hg^(II). Par conséquent, **les effets responsables de la structuration des atomes autour du métal sont fins.**

Protéines	RMSD _{apo/M} [Å]	RMSD _{apo/\bar{M}} [Å]	RMSD _{M/\bar{M}} [Å]
Hah1	1.25	1.17	0.69
Atx1	2.50	2.19	1.29
MerP	1.44	1.80	1.20

TAB. 9.1 – RMSD des positions des atomes du squelette peptidique du motif MXCXXC entre les formes apo et métallées d’Hah1, d’Atx1 et de MerP. M est le métal natif pour la chélation ($\text{Cu}^{(I)}$ pour Hah1 et Atx1, $\text{Hg}^{(II)}$ pour MerP); \bar{M} est le métal non natif pour la chélation ($\text{Hg}^{(II)}$ pour Hah1 et Atx1, $\text{Cu}^{(I)}$ pour MerP).

9.1.2.3 Un réseau d’interactions dépendant du métal

La charge globale du complexe $\text{M}\cdot\text{Cys}_2$ joue probablement un rôle dans la structuration de la boucle L_1 . Le complexe du $\text{Cu}^{(I)}$ a une charge nette de -1 alors que celle du $\text{Hg}^{(II)}$ est nulle. C’est certainement la raison majeure expliquant les différences entre les formes complexées au $\text{Cu}^{(I)}$ et au $\text{Hg}^{(II)}$ dans Hah1 et Atx1. **Quand la charge du complexe est nulle, les interactions hydrophobes dominant (interactions M14-Y73 dans HgMerP ou $L_1 - L_3$ dans HgHah1 et HgAtx1) alors que lorsque la charge est de -1 , les interactions hydrophiles sont favorisées (basculement de K73 vers C16 dans CuHah1 et CuMerP) ou les interactions hydrophobes sont diminuées (réorientation de Y73 défavorable à un empilement avec M14 dans CuMerP).**

Alors que dans les formes holo natives d’Atx1 et d’Hah1, l’interaction entre les boucles L_1 et L_5 est dominée par K73 qui se positionne en direction de l’atome $\text{S}_\gamma^{\text{C19}}$, dans les états métallés par $\text{Hg}^{(II)}$, K73 ne pointe pas vers le site $\text{S}_\gamma^{\text{C16}} - \text{Hg} - \text{S}_\gamma^{\text{C19}}$. L’interaction $L_1 - L_3$ entre M14, X42 et X45 conserve la même architecture que dans les formes liées au $\text{Cu}^{(I)}$, mais les interactions avec X45 sont diminuées. Les interactions entre HgAtx1 et celles observées dans l’apoprotéine oxydée (avec un pont disulfure entre les deux cystéines 16 et 19) (entrée PDB 1CC8) [Rosenzweig *et al.*, 1999] sont similaires. K73 ne se positionne pas à proximité du site de chélation du métal. La conformation du résidu K73 dans Hah1 et dans Atx1 est donc directement dépendante de la charge nette du motif du site de chélation.

Il est plus difficile de mettre en évidence cette propriété dans MerP car le résidu remarquable de la boucle L_5 n’est pas polaire. Néanmoins, la comparaison de CuMerP avec HgMerP indique que les changements conformationnels de R45 et de Y73 sont plus importants que dans l’holoprotéine native, si bien que les interactions de L_1 (M14) avec ces deux acides aminées sont absentes. L’interaction la moins changée est celle de M14 avec F42 (L_3).

En conséquence, le réseau d’interaction entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 est affaibli dans les holoprotéines non natives par rapport aux formes holo natives correspondantes. **Il semble que le réseau d’interactions de chacune des protéines soit ainsi optimisé pour la nature du métal qu’elle doit chélater *in vivo*.**

9.1.3 Existe-t-il une sélectivité de la chélation d'un métal ?

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec un potentiel d'interaction M-S qui implique que le métal, $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ou $\text{Hg}^{(\text{II})}$, est bicoordiné par 2 thiolates, dans la protéine.

Ce potentiel permet de reproduire les conditions expérimentales de chélation du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ par Hah1 en l'absence de ligand exogène potentiel [Ralle *et al.*, 2003] et du $\text{Hg}^{(\text{II})}$ par MerP [Steele et Opella, 1997] et Atx1 [Pufahl *et al.*, 1997, Rosenzweig *et al.*, 1999]. Les simulations de CuAtx1 présentent un caractère théorique, car les expériences d'absorption de rayons X [Miras *et al.*, 2005] ont montré que, même en l'absence de ligand exogène, le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ adopte une géométrie trigonale.

Les structures d'Hah1, d'Atx1 et de MerP s'adaptent différemment à la présence d'un métal en fonction de sa nature. Bien que les conformations globales des protéines soient diverses, localement, le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ et le $\text{Hg}^{(\text{II})}$ ont le même environnement. La boucle L_1 , et le motif MXCXXC en particulier, présente la même conformation moyenne, quelle que soit la protéine et quel que soit le type de métal lié, natif ou non natif. **Les protéines montrent ainsi une plasticité qui leur permet d'arranger leurs ligands et l'environnement immédiat du site de complexation en présence du métal.** Aucune spécificité structurale n'a pu être mise en évidence entre les holoprotéines natives et non natives. En outre, l'accessibilité au solvant du motif MXCXXC et du métal ne varie pas en fonction de l'état de métallation ou de la nature du métal. Le motif est relativement exposé (SRA $\approx 40\%$) et les ions métalliques sont toujours totalement enfouis (toujours désolvatés).

Pourtant, Hah1 et MerP ont montré une dynamique de la boucle L_1 qui varie bien en fonction de la nature du métal car seul leur métal natif peut rigidifier cette boucle. Cela est à mettre en parallèle avec les interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 . La stabilisation dynamique (rigidification) de la boucle L_1 dans CuHah1 et CuAtx1 va de paire avec l'interaction très forte de L_1 (C16) avec L_5 (K73). A l'inverse, l'accroissement de la flexibilité de L_1 dans CuMerP s'explique par le fait que l'interaction hydrophobe entre M14 et Y73 est perdue. La stabilisation dynamique des holoprotéines s'accompagne donc d'une stabilisation énergétique des interactions entre les boucles.

Il existe par conséquent une certaine sélectivité intrinsèque au $\text{Cu}^{(\text{I})}$ pour Atx1 et Hah1, et au $\text{Hg}^{(\text{II})}$ pour MerP, puisque même si les réarrangements conformationnels produisent des environnements locaux semblables autour de l'ion métallique, **la rigidification du site de complexation est favorisée en présence du métal natif grâce à un renforcement des interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 .**

9.2 Un modèle de sélectivité pour le Cu^(I)

9.2.1 Propriétés de complexation du Cu^(I) par Atx1 *in vitro*

Les expériences de XANES et d'EXAFS du Cu^(I) complexé par Atx1 ont montré une tendance claire d'Atx1 à complexer le Cu^(I) dans une géométrie trigonale. En absence de ligand exogène possible, le Cu^(I) est chélaté par les deux cystéines du motif MXC¹⁶XXC¹⁹ de la protéine, et par un oxygène du squelette peptidique de C16 [Miras *et al.*, 2005]. Si une molécule potentiellement coordinante est présente dans le milieu (DTT [Pufahl *et al.*, 1997] ou glutathion [Miras *et al.*, 2005]), alors cette molécule lie le Cu^(I) à la place de l'oxygène O^{C16}.

Par conséquent, **ces expériences démontrent qu'Atx1 s'adapte au Cu^(I) de manière à lui offrir trois ligands**, de façon similaire à *EhCopZ* [Cobine *et al.*, 2002] et à *BsCopZ* [Banci *et al.*, 2003b]. Le comportement d'Atx1 et de *BsCopZ* est d'autant plus proche que le Cu^(I) dans *CuBsCopZ* a aussi été identifié par Banci *et al.* dans une géométrie 2S+O en présence d'ascorbate [Banci *et al.*, 2003b]. Dans *CuScAtx1*, le Cu^(I) est tricoordiné grâce à l'atome N_{e2} de l'histidine situé en position 73 (61 dans la séquence de *ScAtx1*) [Borrelly *et al.*, 2004]. On observe donc une réelle propension du Cu^(I) à adopter une géométrie trigonale dans les métallochaperones.

9.2.2 Propriétés de complexation du Cu^(I) *in vivo*

L'étude de Ralle *et al.* [Ralle *et al.*, 2003] a mis en évidence que le Cu^(I) tend plus difficilement vers une géométrie trigonale dans Hah1. Les simulations de dynamique moléculaire de CuHah1 (coordination de type 2S) ont montré que le site de chélation du Cu^(I) est fortement stabilisé par un ensemble relativement riche en interactions entre les boucles L₁, L₃ et L₅.

En outre, CuHah1 et HgHah1 ont des structures proches (RMSD_{Cu/Hg} = 1.73 Å, §7.3.3.3, p 141) qui ne nécessitent pas un réarrangement conformationnel aussi important que pour Atx1. Cela indique qu'Hah1 peut facilement s'adapter à une géométrie digonale, alors qu'Atx1 1FD8 (où les conditions expérimentales sont telles que le Cu^(I) est trigonal) a une structure très différente de celles simulées avec un potentiel Cu+2S ou Hg+2S. En d'autres termes, Atx1, comme *EhCopZ* et *BsCopZ*, a sa dynamique et sa structure qui sont optimisées pour offrir au Cu^(I) une géométrie trigonale, géométrie naturellement préférentielle du Cu^(I). Pourtant, les séquences d'Hah1 et d'Atx1 sont très proches (38% d'identité [Arnesano *et al.*, 2002]), et la séquence du motif ne diffère que d'un seul acide aminé (M¹⁴TCGGC dans Hah1, et M¹⁴TCSGC dans Atx1).

Il faut des concentrations élevées en ligand soufré exogène pour forcer une géométrie trigonale du Cu^(I) dans Hah1. Or, *in vivo*, la concentration en glutathion est élevée (≈ 5 mM), bien plus grande que celle en métallochaperone [Ralle *et al.*, 2003]. Cela laisse supposer que dans la cellule, Hah1 puisse être associée au glutathion pour tricoordiner le Cu^(I).

La sélectivité au $\text{Cu}^{(\text{I})}$ des métallochaperones pourrait provenir de l'aptitude de ces protéines à proposer uniquement deux ligands soufrés dans un milieu riche en thiol (le glutathion). Ainsi, le $\text{Cu}^{(\text{I})}$ serait complexé avec un arrangement trigonal des ligands, arrangement qui lui est préférentiel.

9.3 Rôle pivot de la méthionine du motif MXCXXC

La méthionine 14 est un résidu extrêmement conservé parmi l'ensemble des métallochaperones à cuivre et à mercure. Elle est parfois remplacée par une isoleucine (comme dans *ScAtx1*), une leucine ou une valine. Néanmoins, l'acide aminé à cette position est toujours aliphatique et apolaire.

Il semble que la conservation d'un résidu apolaire à cette position soit primordiale pour la fonction d'Hah1. Larin *et al.* ont en effet montré, par la méthode du double hybride, qu'un mutant M14V d'Hah1 peut interagir avec Wnd, tout comme la protéine sauvage [Larin *et al.*, 1999].

L'étude des interactions entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 a montré le rôle stabilisateur de M14. M14 est impliquée dans les interactions avec X42, aussi bien dans les apoprotéines que dans les holoprotéines, natives et non natives. Les contacts hydrophobes que M14 développent avec X42 sont une constante pour toutes les protéines, et leur intensité est peu ou pas modifiée par la présence d'un métal (sauf dans CuMerP, où la position de F42 induite par la présence du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ est défavorable pour que les interactions de van der Waals subsistent entre les deux acides aminés). M14 interagit également avec C19 dans toutes les protéines (sauf dans apoMerP) et avec la chaîne latérale de X73, que ce soit une lysine (Hah1, Atx1), ou une tyrosine (MerP).

M14 est fréquemment enfouie, sauf dans apoBsCopZ et apoMerP. La complexation du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ par BsCopZ ou du $\text{Hg}^{(\text{II})}$ par MerP s'accompagne de l'enfouissement de leur méthionine, qui entre alors en contact avec le cœur hydrophobe de ces protéines [Banci *et al.*, 2001b, Banci *et al.*, 2003a, Steele et Opella, 1997].

Dans Hah1, M14 n'est jamais accessible au solvant. Les mutants M14A et M14S perturbent la dynamique de la protéine, et de la boucle L_1 en particulier. Les aminoacides introduits par les mutations ont des chaînes latérales courtes qui ne permettent pas un ancrage aussi profond dans le cœur hydrophobe que la chaîne latérale de la méthionine autorise. Dès lors, la mobilité des résidus des deux protéines est augmentée dans leur forme apo et liée au $\text{Cu}^{(\text{I})}$.

La sévérité de la mutation nuance l'effet de la liaison du $\text{Cu}^{(\text{I})}$. La flexibilité de CuHah1^{M14A} est similaire à celle de CuHah1^{WT}. Ce n'est pas le cas du mutant M14S où l'introduction d'un résidu polaire désorganise plus ou moins localement la protéine, de telle sorte que la présence du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ ne permet pas de rétablir une dynamique proche de celle de la forme sauvage.

Le cœur hydrophobe est constitué d'une dizaine de résidus, apolaires, et enfouis dans la protéine. Ces acides aminés bougent peu et les interactions d'empilement entre leurs chaînes latérales stabilisent la protéine [Gerstman et Chapagain, 2005].

Les résidus du cœur hydrophobe appartiennent dans leur grande majorité aux brins β et aux hélices α . Ils sont donc moins mobiles que ceux des boucles.

Le cœur hydrophobe subit également des perturbations dues aux mutations et pouvant être annulées par la chélation du métal.

Dans les apoprotéines, la disposition relative des résidus du cœur hydrophobe change par rapport à celle d'apoHah1^{WT}. M14 représente environ 20% de l'énergie de stabilisation de van der Waals du cœur hydrophobe. La contribution de A14 et de S14 n'est que de 5% environ dans les apoprotéines. Le cœur hydrophobe est alors nettement moins stabilisé : ses résidus bougent davantage que dans apoHah1^{WT}, et la structure du cœur hydrophobe change. Cependant, en présence de Cu^(I), le cœur hydrophobe retrouve une structure identique à celle dans CuHah1^{WT}. Cela suggère que **le résidu en position 14 joue un rôle clé dans la structuration d'Hah1.**

Quand le Cu^(I) est chélaté, l'effet hyper-structurant du Cu^(I) permet de contrebalancer l'effet produit par la mutation M14A, mais pas celui de M14S. Dans ces conditions, A14 est orientée comme M14 et sa mobilité est réduite et similaire à celle de M14 dans CuHah1^{WT}. En effet, la présence du Cu^(I) contraint A14 dans une conformation proche de celle de M14 et favorable pour rétablir quelques interactions de van der Waals avec les résidus L42 et K45 de L_3 . Dès lors, A14 étant moins mobile, les résidus du cœur hydrophobe proches de sa chaîne latérale, ainsi que C19, peuvent développer des contacts, certes plus faibles comparés aux interactions avec M14, mais suffisants pour restituer au cœur hydrophobe sa structure et sa dynamique natives.

Par conséquent, **M14 joue un rôle très important dans la stabilisation globale de la protéine et remplit le rôle de trait d'union entre le site de chélation du métal et le cœur hydrophobe, élément structurant de la protéine.**

9.4 Un modèle d'interaction d'Atx1 avec Ccc2

Pufahl *et al.* ont proposé dès 1997 un mécanisme de transfert du Cu^(I) d'Atx1 à Ccc2. Dans ce modèle (décrit au §2.6), le Cu^(I) passe successivement d'un état bicoordiné dans la métallochaperone complexé au métal, à un état tricoordiné dans l'hétérodimère intermédiaire Atx1-Ccc2, puis revient à un état bicoordiné par les deux cystéines du site de chélation d'un MBD de Ccc2. Ce modèle est présenté sur la figure 9.3.

Ce modèle a été conforté par la structure d'HgAtx1 qui indique la possibilité pour Atx1 que ses deux cystéines, C16 et C19, adoptent un arrangement spatial compatible avec une géométrie linéaire du métal [Rosenzweig *et al.*, 1999]. D'autre part, la structure homodimérique d'Hah1 observée en cristallographie [Wernimont *et al.*, 2000, Huffman et O'Halloran, 2000] a montré que deux motifs MXCXXC peuvent interagir l'un avec l'autre. Comme les métallochaperones et les MBD des ATPases cibles présentent une grande homologie structurale, le

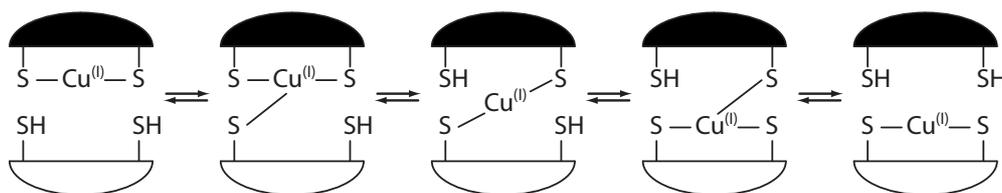


FIG. 9.3 – Mécanisme de transfert du cuivre(I) entre une métallochaperone et un MBD d'une ATPase cible [Pufahl *et al.*, 1997].

mécanisme hypothétique de Pufahl *et al.* semble conforté. D'autant plus que des homodimères d'Hah1 ont également été mis en évidence *in vivo* par Tanchou *et al.* [Tanchou *et al.*, 2004].

Le modèle actuel de reconnaissance entre les métallochaperones et les MBD repose sur la complémentarité des surfaces électrostatiques entre les partenaires. La présence de nombreuses lysines dans Atx1 et Hah1, et de glutamates et aspartates dans Ccc2a dans les MBD de Mnk, pourraient être le support d'une interaction électrostatique favorable entre Atx1 et Ccc2a [Arnesano *et al.*, 2001a, Banci *et al.*, 2001a, Arnesano *et al.*, 2004] d'une part, et Hah1 et les MBD de Mnk [Wernimont *et al.*, 2000, Strausak *et al.*, 2003, Banci *et al.*, 2004b, Banci *et al.*, 2005] d'autre part.

Cependant, l'étude *in vivo* dans *S. cerevisiae* de Morin *et al.* [Morin *et al.*, 2005] a mis en évidence que des protéines telles que Ccc2a et CopZ, dont la surface électrostatique est globalement négative comme celle de Ccc2a, peuvent interagir avec Ccc2a, de la même manière d'Atx1 qui a une surface électrostatique plutôt positive. L'hypothèse d'une interaction électrostatique prédominante entre la métallochaperone et sa cible apparaît donc partiellement remise en cause.

L'homodimérisation d'Atx1 en présence de $\text{Cu}^{(I)}$ et de glutathion [Miras *et al.*, 2005] suggère qu'*in vivo*, il est fort probable que ce soient des homodimères binucléaires d'Atx1 qui convoient le $\text{Cu}^{(I)}$ vers Ccc2. Les modèles possibles pour cet homodimère sont présentés sur la figure 9.4. Ainsi, la reconnaissance de la métallochaperone par Ccc2 pourrait être médiée par le glutathion. Le glutathion est, certes, un petit tripeptide, mais sa liaison pseudo-peptidique γ -glutamylcystéinyle lui permet d'adopter une conformation étirée et flexible. Le glutathion pourrait ainsi servir de pont entre Atx1 et les MBD de Ccc2. Les structures homodimériques d'Hah1 [Wernimont *et al.*, 2000] et le modèle du complexe Atx1-Ccc2a proposé par *docking* par Arnesano *et al.* [Arnesano *et al.*, 2004], impliquent que la zone de contact entre les monomères soient principalement au niveau de la boucle L_1 . Par conséquent, dans l'hypothèse d'une métallochaperone homodimérique associée à deux molécules de glutathion, on peut imaginer que l'association des boucles L_1 de la métallochaperone et du MBD cible soit favorisée par les deux molécules de glutathion.

L'étude de Rosenzweig *et al.* à propos d'HgAtx1 révèle qu'*in vitro*, en l'absence de glutathion, HgAtx1 peut transférer l'ion $\text{Hg}^{(II)}$ à Ccc2a [Rosenzweig *et al.*, 1999]. Le

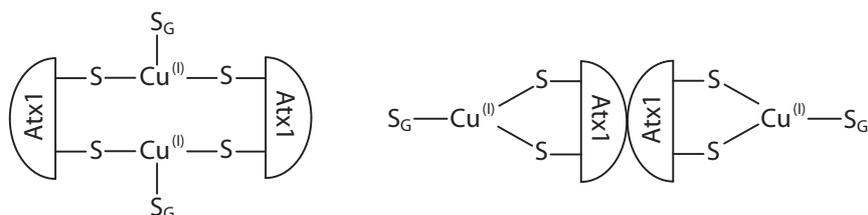


FIG. 9.4 – Modèles proposés pour l’homodimère glutathion-dépendant de CuAtx1.

couple fonctionnel Atx1-Ccc2a n’est donc pas spécifique du cuivre(I).

De même, Hah1 peut interagir avec Wnd en présence de $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ ou de $\text{Hg}^{\text{(II)}}$, mais pas de $\text{Zn}^{\text{(II)}}$, $\text{Cd}^{\text{(II)}}$, $\text{Co}^{\text{(II)}}$, $\text{Ni}^{\text{(II)}}$, $\text{Fe}^{\text{(III)}}$ ou de $\text{Cr}^{\text{(III)}}$ [Larin *et al.*, 1999]. Un criblage de la *Cambridge Structural Database* (CSD) [Allen *et al.*, 1979] indique une nette préférence de $\text{Zn}^{\text{(II)}}$, $\text{Cd}^{\text{(II)}}$, $\text{Co}^{\text{(II)}}$, $\text{Ni}^{\text{(II)}}$, $\text{Fe}^{\text{(III)}}$ et $\text{Cr}^{\text{(III)}}$ pour une géométrie tétracoordinée si les ligands sont des sulfures (Tab. 9.2).

Géométrie	Nombres de complexes trouvés dans la CSD							
	$\text{Cu}^{\text{(I)}}$	$\text{Hg}^{\text{(II)}}$	$\text{Zn}^{\text{(II)}}$	$\text{Cd}^{\text{(II)}}$	$\text{Co}^{\text{(II)}}$	$\text{Ni}^{\text{(II)}}$	$\text{Fe}^{\text{(III)}}$	$\text{Cr}^{\text{(III)}}$
MS_3	36	9	3	6	1	—	5	—
MS_4	40	48	72	53	37	640	53	3

TAB. 9.2 – Occurrence des complexes MS_n ($n = 3, 4$) pour $\text{M} = \text{Cu}^{\text{(I)}}$, $\text{Hg}^{\text{(II)}}$, $\text{Zn}^{\text{(II)}}$, $\text{Cd}^{\text{(II)}}$, $\text{Co}^{\text{(II)}}$, $\text{Ni}^{\text{(II)}}$, $\text{Fe}^{\text{(III)}}$ et $\text{Cr}^{\text{(III)}}$ trouvées dans la *Cambridge Structural Database* (CSD) [Allen *et al.*, 1979]. La requête pour cribler la CSD a imposé deux critères : (i) une géométrie de type $(\text{C-S})_n\text{M}$ avec M lié uniquement à n atomes S, et (ii) aucune liaison de type $\text{C}=\text{S}-\text{M}$.

La structure cristallographique d’Hah1 liée au $\text{Cd}^{\text{(II)}}$ est un homodimère mononucléaire où chacune des deux cystéines du motif MXCXXC des monomères participe à la coordination de l’ion métallique [Wernimont *et al.*, 2000]. Il semble donc probable qu’Hah1 forme des homodimères trop stables quand elle chélate ces ions pour pouvoir interagir avec Wnd car la rupture d’une liaison pour former un complexe tricoordiné est *a priori* défavorable.

Bien que le $\text{Hg}^{\text{(II)}}$ semble préférer être coordiné par 4 sulfures plutôt que 3 selon le tableau 9.2 (48 complexes HgS_4 contre 9 de type HgS_3), le nombre de complexes de type HgS_2 (47) indiquent que les géométries préférentielles du mercure en présence de thiolates sont de 2 ou 4 ligands. Le transfert du $\text{Hg}^{\text{(II)}}$ d’Atx1 vers Ccc2a implique donc le passage vers un état intermédiaire tricoordiné qui pourrait être proche de la structure de l’homodimère $\text{Hg}(\text{Hah1})_2$ résolue par Wernimont *et al.* [Wernimont *et al.*, 2000]. Comme Atx1 peut transférer un ion $\text{Hg}^{\text{(II)}}$ à Ccc2a, la liaison d’ $\text{Hg}^{\text{(II)}}$ aux deux cystéines d’Atx1 ne serait pas aussi forte que celle des autres métaux comme $\text{Zn}^{\text{(II)}}$ ou $\text{Ni}^{\text{(II)}}$ avec Hah1.

Cependant, *in vivo*, Ccc2a comporte une certaine sélectivité pour le cuivre de par son interaction avec Atx1. **La sélectivité du transfert du $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ d’Atx1 vers Ccc2a ou d’Hah1 vers Mnk/Wnd pourrait par conséquent être induite par le glutathion.** Ccc2a admet le $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ d’Atx1 grâce au glutathion qui, d’une part, offre au $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ une géométrie trigonale préférentielle du $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ dans la métallochaperone,

et, d'autre part, favoriserait l'interaction entre les deux partenaires protéiques. Par conséquent, la sélectivité de la complexation du $\text{Cu}^{(\text{I})}$ par Atx1 et par Ccc2 *in vivo* relèverait davantage du milieu cellulaire que des protéines elles-mêmes. **C'est un cofacteur, le glutathion, qui, associé à la métallochaperone, permet de former un site à 3 thiolates plus favorables au $\text{Cu}^{(\text{I})}$ qu'au $\text{Hg}^{(\text{II})}$ ou au $\text{Zn}^{(\text{II})}$, et qui ensuite assurerait en partie la reconnaissance du MBD Ccc2a par Atx1.**

Cinquième partie

Conclusion & Perspectives

Le développement de potentiel d'interaction entre un métal ($\text{Cu}^{(I)}$ ou $\text{Hg}^{(II)}$) et deux cystéinates, a permis l'étude par simulation de dynamique moléculaire de trois métallochaperones, Hah1, Atx1 et MerP dans les formes apo, liées au $\text{Cu}^{(I)}$ ou au $\text{Hg}^{(II)}$. Hah1 et Atx1 chélatent *in vivo* le $\text{Cu}^{(I)}$, tandis que MerP complexe le $\text{Hg}^{(II)}$.

Des propriétés communes, tant dynamiques qu'énergétiques, ont été mises en évidence pour les métallochaperones chélatées par leur métal natif. Les interactions polaires et apolaires entre les boucles L_1 , L_3 et L_5 d'Hah1, d'Atx1 et de MerP, ont permis de déterminer un réseau d'interactions différent d'un état métallé à l'autre, qui pourrait définir une possible sélectivité des protéines vis-à-vis des métaux. La chélation d'un métal induit une structuration importante au niveau de la boucle L_1 , accompagnée d'une rigidification quand le métal lié est le métal natif.

Les expériences d'absorption de rayons X du $\text{Cu}^{(I)}$ ont montré que le $\text{Cu}^{(I)}$ chélaté par Atx1 possède toujours une géométrie trigonale dont les ligands sont les deux cystéines du motif consensus MXCXXC et un troisième ligand de nature variable, selon qu'une molécule soufrée potentiellement coordinante est présente dans le milieu. Si ce n'est pas le cas, l'oxygène du squelette peptidique de la première cystéine du motif MXCXXC complète la sphère de coordination du $\text{Cu}^{(I)}$; sinon, c'est un ligand exogène comme le glutathion. Atx1 présente ainsi au $\text{Cu}^{(I)}$ une géométrie qui lui est préférentielle. *In vivo*, la combinaison des aspects physico-chimiques de la coordination du $\text{Cu}^{(I)}$ avec la flexibilité intrinsèque d'Atx1, pourrait être un déterminant de la sélectivité pour ce métal.

En présence de glutathion, le complexe $\text{Cu}^{(I)}$ -Atx1 forme un homodimère binucléaire associé à deux molécules de glutathion. L'implication de ce ligand exogène est proposée comme un autre facteur de la sélectivité *in vivo* d'Atx1 pour le $\text{Cu}^{(I)}$, et comme facteur de reconnaissance par Atx1 de son ATPases cible, Ccc2.

L'environnement trigonal du $\text{Cu}^{(I)}$ étant désormais certain pour Atx1, il serait intéressant de réaliser de nouvelles simulations des métallochaperones liées au $\text{Cu}^{(I)}$ à l'aide d'un potentiel d'interaction de type $\text{Cu}^{(I)}+3\text{S}$. Cela permettrait de comparer le comportement d'Atx1 selon que le $\text{Cu}^{(I)}$ est lié par deux ou trois cystéinates. Ces simulations nécessitent au préalable, le *docking* d'un ligand exogène, le DTT ou le glutathion. Dans le cas du glutathion, il serait fort intéressant d'étudier la dynamique, la structure et les interactions entre les boucles de l'homodimère binucléaire d'Atx1 associé à deux molécules de glutathion.

Le mode de complexation du $\text{Cu}^{(I)}$ par MerP n'est pas non plus connu. Des expériences d'EXAFS, dans les mêmes conditions que celles réalisées pour Atx1 (absence ou présence de glutathion) pourraient déterminer la géométrie locale de l'ion dans ce cas. Une confrontation de ces espèces aux simulations de CuMerP avec les potentiels d'interaction $\text{Cu}^{(I)}+2\text{S}$ et $\text{Cu}^{(I)}+3\text{S}$ serait intéressante à réaliser. Cette étude ouvrirait la porte à l'analyse de la sélectivité de MerP pour le $\text{Hg}^{(II)}$. Si MerP, protéine homologue d'Atx1, présente *in vitro* et *in silico* des propriétés proches de celles d'Atx1, cela démontrerait le rôle du milieu intracellulaire dans la sélectivité

des métallochaperones.

Les simulations de dynamique moléculaire ont mis en évidence le rôle de certains résidus clés tels que la lysine de la boucle L_5 dans Hah1 et dans Atx1, qui semble contribuer à structurer le site de chélation du $\text{Cu}^{(I)}$ grâce à une interaction électrostatique très forte avec une cystéine du motif MXCXXC. Muter ce résidu en tyrosine par exemple, de façon à obtenir une boucle L_5 ressemblant à celle de MerP, pourrait mettre en évidence le rôle de cet acide aminé. Est-ce que les mutants K73Y d'Hah1 et Atx1 ont des propriétés dynamiques, structurales et énergétiques comparables à MerP ? Et symétriquement, le comportement du mutant Y73K de MerP ressemble-t-il davantage à Hah1 et à Atx1 ? Grâce à de tels mutants, la relation entre la flexibilité des boucles L_1 et L_5 , la fonction de la protéine (transport du $\text{Cu}^{(I)}$ ou du $\text{Hg}^{(II)}$) et sa sélectivité pour un métal pourrait être reliées.

Enfin, la modélisation permet également de calculer des affinités relatives de complexation par la méthode des perturbations [Roux, 1996]. Dans ce cas, à l'aide des potentiels M+2S et M+3S, il serait possible de faire «apparaître» ou «disparaître» progressivement un ion $\text{Cu}^{(I)}$ ou $\text{Hg}^{(II)}$ liés à 2 ou 3 cystéinates. En dépit des difficultés techniques que posent ces simulations, ces calculs permettraient d'obtenir des $\Delta\Delta G$ de complexation, et d'évaluer ainsi l'affinité relative des métallochaperones pour ces deux métaux, pour un nombre de ligands du cuivre variable (2S ou 3S).

En plus de la fonction de transport du métal, des calculs de perturbations à partir de structures de métallochaperones et de MBD des ATPases permettraient d'établir également une échelle d'affinité relative entre les métallochaperones et leur(s) MBD(s) cible(s). Par ce biais, on étudie la fonction de transfert du métal des métallochaperones. Il a déjà été montré que le gradient thermodynamique de transfert du $\text{Cu}^{(I)}$ entre Atx1 et Ccc2a est très faible car la constante d'équilibre K_{eq} est de 1.4 ± 0.2 [Huffman et O'Halloran, 2000]. Il serait alors intéressant de comparer cette valeur à celle du transfert du $\text{Hg}^{(II)}$, pour ce couple de protéines mais aussi pour d'autres, comme par exemple Hah1 avec des MBD de Mnk. Cela montrerait si ces voies de convoyage du cuivre sont spécifiques de ce métal, ou si d'autres facteurs externes pourraient intervenir dans la spécificité de la chélation.

Bibliographie

- Abajian, C., Yatsunyk, L. A., Ramirez, B. E., et Rosenzweig, A. C. (1997). Yeast Cox17 solution structure and copper(I) binding. *J. Biol. Chem.*, 279(51) :53584–53592.
- Abdel-Ghany, S. E., Burkhead, J. L., Gogolin, K. A., Andrés-Colás, N., Bodecker, J. R., S., P., Peñarrubia, L., et Pilon, M. (2005). AtCcs is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett.*, 579(11) :2307–2312.
- Aiking, H., Govers, H., et van't Riet, J. (1985). Detoxification of mercury, cadmium, and lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC418 growing in continuous culture. *Appl Environ Microbiol.*, 50(5) :1262–1267.
- Allen, F. H., Bellard, S., Brice, M. D., Cartwright, B. A., Doubleday, A., Higgs, H., Hummelink, T., Hummelink-Peters, B. G., Kennard, O., Motherwell, W. D. S., Rodgers, J. R., et Watson, D. G. (1979). The Cambridge Crystallographic Data Centre : computer-based search, retrieval, analysis and display of information. *Acta Crystallogr.*, B35 :2331–2339.
- Anastassopoulou, I., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Katsari, E., et Rosato, A. (2004). Solution structure of the apo and copper(I)-loaded human metallochaperone Hah1. *Biochemistry*, 43 :13046–13053.
- Andersen, H. C. (1980). Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.*, 72(4) :2384–2393.
- Åqvist, J., van Gunsteren, W. F., Leionmarck, M., et O., T. (1985). A molecular dynamics study of the C-terminal fragment of the L7/L12 protein. *J. Mol. Biol.*, 183 :461–477.
- Arnesano, F., Banci, L., et Bertini, I. (2001a). Solution structure of the Cu(I) and apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1. *Biochemistry*, 40 :1528–1539.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., et Bonvin, A. M. J. J. (2004). A docking approach to the study of copper trafficking proteins : interaction between metallochaperones and soluble domains of copper ATPases. *Structure Fold. Des.*, 12 :669–676.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., , Ciofi-Bafoni, S., Huffman, D. L., et O'Halloran, T. V. (2001b). Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. *J. Biol. Chem.*, 276(44) :41365–41376.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Bafoni, S., Molteni, E., Huffman, D. L., et O'Halloran, T. V. (2002). Metallochaperones and metal-transporting ATPases : a comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res.*, 12(2) :255–271.

- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Chasapis, C. T., Hadjiliadis, N., et Rosato, A. (2005). An NMR study of the interaction between the human copper(I) chaperone and the second and fifth metal-binding domains of the Menkes protein. *FEBS J.*, 272 :865–871.
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., D’Onofrio, M., Gonnelli, L., Marhuenda-Egea, F. C., et Ruiz-Dueñas, F. J. (2002). Solution structure of the N-terminal domain of a potential copper-translocating P-type ATPase from *Bacillus subtilis* in the apo and Cu(I) loaded states. *J. Mol. Biol.*, 317(3) :415–429.
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Su, X.-C., Borrelly, G. P. M., et Robinson, N. J. (2004a). Solution structures of a cyanobacterial metallochaperone : Insight into an atypical copper-binding motif. *J. Biol. Chem.*, 279(26) :27502–27510.
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Huffman, D. L., et O’Halloran, T. V. (2001a). Solution structure of the yeast copper transporter domain Ccc2a in the apo and Cu(I)-loaded states. *J. Biol. Chem.*, 276(11) :8415–8426.
- Banci, L., Bertini, I., et Del Conte, R. (2003a). Solution structure of apoCopZ from *Bacillus subtilis* : further analysis of the changes associated with the presence of copper. *Biochemistry*, 42(46) :13422–13428.
- Banci, L., Bertini, I., Del Conte, R., D’Onofrio, M., et Rosato, A. (2004b). Solution structure and backbone dynamics of the Cu(I) and apo forms of the second metal-binding domain of the Menkes protein ATP7A. *Biochemistry*, 43 :3396–3403.
- Banci, L., Bertini, I., Del Conte, R., Mangani, S., et Meyer-Klaucke, W. (2003b). X-Ray absorption and NMR spectroscopic studies of CopZ, a copper chaperone in *Bacillus subtilis* : the coordination properties of the copper ion. *Biochemistry*, 42 :2467–2474.
- Banci, L., Bertini, I., Del Conte, R., Markey, J., et Ruiz-Duenñas, F. J. (2001b). Copper trafficking : the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemistry*, 40 :15660–15668.
- Banerjee, S., Wei, B., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H. B., et Smith, T. J. (2003). Structural determinants of metal specificity in the zinc transport protein ZnuA from *Synechocystis* 6803. *J. Mol. Biol.*, 333(5) :1061–1069.
- Barkay, T., Miller, S. M., et Summers, A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27(2-3) :355–384.
- Bartnikas, T. B. et Gitlin, J. D. (2001). How to make a metalloprotein. *Nat. Struct. Biol.*, 8(9) :733–734.
- Beers, J., Glerum, D. M., et Tzagoloff, A. (1997). Purification, characterization, and localization of Yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J. Biol. Chem.*, 272 :33191–33196.
- Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., et Straatsma, T. P. (1987). The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, 91 :6269–6271.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., et Hermans, J. (1981). Interaction models for water in relation to protein hydration. In Reidel, editor, *Intermolecular Forces*, pages 331–342. Dordrecht, The Netherlands.

- Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I., et Bourne, P. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 28 :235–242.
- Bertini, I., Cowan, J. A., Del Bianco, C., Luchinat, C., et Mansy, S. S. (2003). *Thermotoga maritima* IscU. Structural characterization and dynamics of a new class of metallochaperone. *J. Mol. Biol.*, 331(4) :907–924.
- Blokesch, M., Rohmoser, M., Rode, S., et Bock, A. (2004). HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation. *J. Bacteriol.*, 186(9) :2603–2611.
- Borrelly, G. P. M., Bindauer, C. A., Schmid, R., Butler, C. S., Cooper, C. E., Harvey, I., Sadler, P. J., et Robinson, N. J. (2004). A novel copper site in a cyanobacterial metallochaperone. *Biochem. J.*, 378 :293–297.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., et Karplus, M. (1983). CHARMM : A program for macromolecular energy minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.*, 4(2) :187–217.
- Brouwer, M. et Brouwer-Hoexum, T. (1992). Glutathione-mediated transfer of copper(I) into American lobster apohemocyanin. *Biochemistry*, 31(16) :4096–4102.
- Bull, P. C. et Cox, D. W. (1994). Wilson disease and Menkes disease : new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.*, 10(7) :246–252.
- Bull, P. C., Thomas, G. R., Rommens, J. M., Forbes, J. R., et Cox, D. W. (1993). The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat. Genet.*, 5(4) :327–337.
- Cavet, J. S., Meng, W., Pennella, M. A., Appelhoff, R. J., Giedroc, D. P., et Robinson, N. J. (2002). A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity. *J. Biol. Chem.*, 277(41) :38441–38448.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V., et Mondragon, A. (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by Cuer. *Science*, 301(5368) :1383–1387.
- Cheung, K. C., Strange, R. W., et Hasnain, S. S. (2000). 3D EXAFS refinement of the Cu site of azurin sheds light on the nature of structural change at the metal centre in an oxidation-reduction process : an integrated approach combining EXAFS and crystallography. *Acta Crystallogr.*, D56 :697–704.
- Choi, S. C., Chase Jr., T., et Bartha, R. (1994). Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(4) :1342–1346.
- Chu, C. C., Lee, W. C., Guo, W. Y., Pan, S. M., Chen, L. J., Li, H. M., et Jinn, T. L. (2005). A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*
- Ciriolo, M. ., Desideri, A., Paci, M., et Rotilio, G. (1990). Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I)-glutathione complex. *J. Biol. Chem.*, 265(19) :11030–11034.
- Clarage, J. B., Romo, T., Andrews, B. K., Pettitt, B. M., et Phillips, G. N. J. (1995). A sampling problem in molecular dynamics simulations of macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 :3288–3292.

- Cobine, P. A., George, G. N., Jones, C. E., Wickramasinghe, W. A., Solioz, M., et Dameron, C. T. (2002). Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn(II)CopY : metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry*, 41(18) :5822–5829.
- Cobine, P. A., Ojeda, L. D., Rigby, K. M., et Winge, D. R. (2004). Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.*, 279(14) :14447–14455.
- Colpas, G. J., Brayman, T. G., Ming, L. J., et Hausinger, R. P. (1999). Identification of metal-binding residues in the *Klebsiella aerogenes* urease nickel metallochaperone, UreE. *Biochemistry*, 38(13) :4078–4088.
- Corazza, A., Harvey, I., et Sadler, P. J. (1996). ^1H , ^{13}C NMR and X-ray absorption studies of copper(I) glutathione complexes. *Eur. J. Biochem.*, 236 :697–705.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., et Kollman, P. A. (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(19) :5179–5197.
- Cox, J. D., Hunt, J. A., Compher, K. M., Fierke, C. A., et Christianson, D. W. (2000). Structural influence of hydrophobic core residues on metal binding and specificity in carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 39(45) :13687–13694.
- Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L., Krems, B., et Gitlin, J. D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 272(38) :23469–23472.
- Darden, T., York, D., et Pedersen, L. G. (1993). Particle mesh ewald : An $n\text{-log}(n)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98(12) :10089–10092.
- De Loof, H., Nilsson, L., et Rigler, R. (1992). Molecular dynamics simulation of galanin in aqueous and nonaqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 114 :4028–4035.
- Dodd, F. E., Abraham, Z. H. L., Eady, R. R., et Hasnain, S. S. (2000). Structures of oxidised and deduced azurin II from *Alcaligenes xylosoxidans* at 1.75 Angstroms resolution. *Acta Crystallogr.*, D56 :690–696.
- Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J., et Kollman, P. A. (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.*, 24(16) :1999–2012.
- Dudev, T. et Lim, C. (2001). Metal selectivity in metalloproteins : Zn^{2+} vs Mg^{2+} . *J. Phys. Chem. B.*, 105(19) :4446–4452.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., et Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.*, 103(15) :8577–8593.
- Fahey, R. C., Brown, W. C., Adams, W. B., et Worsham, M. B. (1978). Occurrence of glutathione in bacteria. *J. Bacteriol.*, 133(3) :1126–1129.
- Feller, S. E., Zhang, Y., Pastor, R. W., et Brooks, B. R. (1995). Constant pressure molecular dynamics simulation : the Langevin piston method. *J. Chem. Phys.*, 103(11) :4613–4621.

- Finney, L. A. et O'Halloran, T. V. (2003). Transition metal speciation in the cell : insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science*, 300 :931–936.
- Foloppe, N. et MacKerell, A. D. J. (2000). All-atom empirical force field for nucleic acids : I. parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J. Comput. Chem.*, 21(2) :86–104.
- Fontaine, A. (1993). Interaction of X-rays with matter : X-ray absorption spectroscopy. In Baruchel, J., Hodeau, J.-L., Lehmann, M. S., Regnard, J.-R., et Schlenker, C., editors, *Neutron and synchrotron radiation for condensed matter studies – Hercules Volume I : Theory, instruments and methods*. EDP Sciences - Springer-Verlag.
- Foster, T. J. et Ginnity, F. (1985). Some mercurial resistance plasmids from different incompatibility groups specify *merR* regulatory functions that both repress and induce the *mer* operon of plasmid R100. *J. Bacteriol.*, 162(2) :773–776.
- Fox, B. S. et Walsh, C. T. (1982). Mercuric reductase. Purification and characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *J. Biol. Chem.*, 257(5) :2498–2503.
- Fox, B. S. et Walsh, C. T. (1983). Mercuric reductase : homology to glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase. Iodoacetamide alkylation and sequence of the active site peptide. *Biochemistry*, 22(17) :4082–4088.
- Freedman, J. H., Ciriolo, M. R., et Peisach, J. (1989). The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.*, 264(10) :5598–5605.
- Frishman, D. et Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins*, 23 :566–579.
- Fu, D., Beeler, T. J., et Dunn, T. M. (1995). Sequence, mapping and disruption of *ccc2*, a gene that cross-complements the Ca^{2+} -sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu^{2+} -ATPase subfamily. *Yeast*, 11(3) :238–292.
- Fuchs, J.-F., Nedev, H., Poger, D., , Ferrand, M., Brenner, V., Dognon, J.-P., et Crouzy, S. (2005). New model potentials for sulfur-copper(I) and sulfur-mercury(II) interactions in proteins : from *ab initio* to molecular dynamics. *Soumis*.
- Fujisawa, K., Imai, S., Kitajima, N., et Moro-Oka, Y. (1998). Preparation, spectroscopic characterization, and molecular structure of copper(I) aliphatic thiolate complexes. *Inorg. Chem.*, 37(2) :168–169.
- Fujisawa, K., Imai, S., Suzuki, S., Moro-Oka, Y., Miyashita, Y., Yamada, Y., et Okamoto, K. (2000). M–S vibrational study in three-coordinate thiolato compounds $(\text{NEt}_4)_2[\text{M}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-X})_3]$ and $(\text{NEt}_4)_2[\text{M}_4(\mu\text{-SC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-Cl})_6]$: M=Cu(I) and Ag(I), X=Cl and Br. *J. Inorg. Biochem.*, 82 :229–238.
- Georgatsou, E., Mavrogiannis, L. A., Fragiadakis, G. S., et D., A. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem.*, 272(21) :13786–13792.
- Gerstman, B. S. et Chapagain, P. P. (2005). Self-organization in protein folding and the hydrophobic interaction. *J. Chem. Phys.*, 123(5) :054901.
- Gitschier, J., Moffat, B., Reilly, D., Wood, W. I., et Fairbrother, W. J. (1998). Solution structure of the fourth metal-binding domain from the Menkes copper-transporting ATPase. *Nat. Struct. Biol.*, 5(1) :47–54.

- Glerum, D. M., Shtanko, A., et Tzagoloff, A. (1996). Characterization of *cox17*, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.*, 284(24) :14504–14509.
- Håkansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A., et Liljas, A. (1992). Structure of native and apo carbonic anhydrase II and structure of some of its anion-ligand complexes. *J. Mol. Biol.*, 227(4) :1192–1204.
- Håkansson, K. et Wehnert, A. (1992). Structure of cobalt carbonic anhydrase complexed with bicarbonate. *J. Mol. Biol.*, 228(4) :1212–1218.
- Håkansson, K., Wehnert, A., et Liljas, A. (1994). X-ray analysis of metal-substituted human carbonic anhydrase II derivatives. *Acta Crystallogr.*, D50(1) :93–100.
- Halgren, T. A. (1999). MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *J. Comput. Chem.*, 20(7) :730–748.
- Hamlett, N. V., Landale, E. C., Davis, B. H., et Summers, A. O. (1992). Roles of the *Tn21 merT*, *merP*, and *merC* gene products in mercury resistance and mercury binding. *J. Bacteriol.*, 174(20) :6377–6385.
- Hamza, I., Klomp, L. W., Gaedigk, R., White, R. A., et Gitlin, J. D. (2000). Structure, expression, and chromosomal localization of the mouse *atox1* gene. *Genomics*, 63(2) :294–297.
- Harte, W. E. J., Swaminathan, S., et Beveridge, D. L. (1992). Molecular dynamics of HIV-1 protease. *Proteins*, 13 :175–194.
- Hasnain, S. S. (2000). Local structure of metalloproteins at atomic resolution by XAFS. In Fanchon, E., Geissler, E., Hodeau, J.-L., Regnard, J.-R., and Timmins, P. A., editors, *Structure and dynamics of biomolecules – Hercules Volume IV*. Oxford University press, New York.
- Hassett, R. et Kosman, D. J. (1995). Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 270(1) :128–134.
- Heaton, D. N., N., G. G., Garrison, G., et Winge, D. R. (2001). The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex. *Biochemistry*, 40(3) :743–751.
- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S.-J., Cizewski Culotta, V., Peñarrubia, L., et Amasino, R. M. (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *atx1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 117 :1227–1234.
- Hockney, R. W., Goel, S. P., et Eastwood, J. W. (1974). Quiet high-resolution computer models of a plasma. *J. Comput. Phys.*, 14(2) :148–158.
- Hoover, W. G. (1985). Canonical dynamics : Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A*, 31 :1695–1697.
- Hubbard, S. J., Campbell, S. F., et Thornton, J. M. (1991). Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 220(2) :507–530.
- Huffman, D. L. et O'Halloran, T. V. (2000). Energetics of copper trafficking between the Atx1 metallochaperone and the intracellular copper transporter, Ccc2. *J. Biol. Chem.*, 275(25) :18611–18614.

- Hünenberger, P. H., Mark, A. E., et van Gunsteren, W. F. (1995). Fluctuations and cross-correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulation. *J. Mol. Biol.*, 252 :492–503.
- Ichiye, T. et Karplus, M. (1991). Collective motions in proteins : a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. *Proteins*, 11(3) :205–217.
- Inouhe, M., Hiyama, M., Tohoyama, H., Joho, M., et Murayama, T. (1989). Cadmium-binding protein in a cadmium-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 993(1) :51–55.
- Jackson, W. J. et Summers, A. O. (1982a). Biochemical characterization of HgCl₂-inducible polypeptides encoded by the *mer* operon of plasmid R100. *J. Bacteriol.*, 151(2) :962–970.
- Jackson, W. J. et Summers, A. O. (1982b). Polypeptides encoded by the *mer* operon. *J. Bacteriol.*, 149(2) :479–487.
- Jensen, S. et Jernelöv, A. (1969). Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature*, 223(297) :753–754.
- Jimenez, B., Piccioli, M., Moratal, J. M., et Donaire, A. (2003). Backbone dynamics of rusticyanin : the high hydrophobicity and rigidity of this blue copper protein is responsible for its thermodynamic properties. *Biochemistry*, 42(35) :10396–10405.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., et Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79(2) :926–935.
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., et Tirado-Rives, J. (1995). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(45) :11225–11236.
- Jorgensen, W. L. et Rives, J. T. (1988). The OPLS (optimized potential for liquid simulations) potential functions for proteins, energy minimization for crystals of cyclic peptides and crambin. *J. Am. Chem. Soc.*, 110(6) :1657–1666.
- Kabsch, W. et Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure : Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22 :2577–2637.
- Karplus, M. et McCammon, J. A. (1983). Dynamics of proteins : elements and function. *Ann. Rev. Biochem.*, 53 :263–300.
- Kato, N., Nakamura, M., et Uchiyama, T. (1999). ¹H NMR studies of the reactions of copper(I) and copper(II) with D-penicillamine and glutathione. *J. Inorg. Biochem.*, 75(2) :117–121.
- Kau, L.-S., Spira-Solomon, D. J., Penner-Hahn, J. E., Hodgson, K. O., et Solomon, E. I. (1987). X-ray absorption edge determination of the oxidation state and coordination number of copper : application to the type 3 site in *Rhus vernicifera* laccase and its reaction with oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 109(21) :6433–6442.
- Kihlken, M. A., Leech, A. P., et Le Brun, N. E. (2002). Copper-mediated dimerization of CopZ, a predicted copper chaperone from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.*, 368 :729–739.

- Kiyono, M. et Pan-Hou, H. (1999). The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. *J. Bacteriol.*, 181(3) :726–730.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., et Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.*, 5(12) :1084–1089.
- Klomp, L. W., Lin, S. J., Yuan, D. S., Klausner, R. D., Culotta, V. C., et Gitlin, J. D. (1997). Identification and functional expression of *hah1*, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.*, 272(14) :9221–9226.
- Koch, K. A., Peña, M. M., et Thiele, D. J. (1997). Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem. Biol.*, 4(8) :549–560.
- Koch, S. A., Fikar, R., Millar, M., et O’Sullivan, T. (1984). Steric control of metal-thiolate coordination : synthesis and structure of monomeric cobalt(II) and copper(I) thiolate complexes. *Inorg. Chem.*, 23 :121–122.
- Krebs, C., Agar, J. N., Smith, A. D., Frazzon, J., Dean, D. R., Huynh, B. H., et Johnson, M. K. (2001). IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry*, 40(46) :14069–14080.
- Kusano, T., Ji, G. Y., Inoue, C., et S., S. (1990). Constitutive synthesis of a transport function encoded by the *Thiobacillus ferrooxidans merC* gene cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 172(5) :2688–2692.
- Kwok, S. C. et Hodges, R. S. (2003). Clustering of large hydrophobes in the hydrophobic core of two-stranded α -helical coiled-coils controls protein folding and stability. *J. Biol. Chem.*, 278(37) :35248–35254.
- Labbé, S., Zhu, Z., et Thiele, D. J. (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.*, 272(25) :15951–15958.
- Lamb, A. L., Torres, A. S., O’Halloran, T. V., et C., R. A. (2000). Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochemistry*, 39(48) :14720–14727.
- Lamb, A. L., Wernimont, A. K., Pufahl, R. A., Cizewski Culotta, V., O’Halloran, T. V., et Rosenzweig, A. C. (1999). Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat. Struct. Biol.*, 6(8) :724–729.
- Larin, D., Mekios, C., Das, K., Ross, B., Yang, A.-S., et Gilliam, T. C. (1999). Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone Hah1p. *J. Biol. Chem.*, 274(40) :28497–28504.
- Ledwidge, R., Patel, B., Dong, A., Fiedler, D., Falkowski, M., Zelikova, J., Summers, A. O., Pai, E. F., et Miller, S. M. (2005). NmerA, the metal binding domain of mercuric ion reductase, removes Hg^{2+} from proteins, delivers it to the catalytic core, and protects cells under glutathione-depleted conditions. *Biochemistry*, 44(34) :11402–11416.
- Lee, B. et Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures : estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.*, 55(3) :379–400.
- Lengeler, B. et Eisenberger, P. (1980). Extended X-ray absorption fine structure analysis of interatomic distances, coordination numbers, and mean relative displacements in disordered alloys. *Phys. Rev. B*, 21(10) :4507–4520.

- Lesburg, C. A., Huang, C., Christianson, D. W., et Fierke, C. A. (1997). Histidine → carboxamide ligand substitutions in the zinc binding site of carbonic anhydrase II alter metal coordination geometry but retain catalytic activity. *Biochemistry*, 36(50) :15780–15791.
- Liebert, C., Watson, A. L., et Summers, A. O. (2000). The quality of *merC*, a module of the *mer* mosaic. *J. Mol. Evol.*, 51(6) :607–622.
- Lin, S. J. et Culotta, V. C. (1995). The *atx1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92 :3784–3788.
- Lin, S.-J., Pufahl, R. A., Dancis, A., O'Halloran, T. V., et Cizewski Culotta, V. (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae atx1* gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.*, 272(14) :9215–9220.
- Lindahl, E., Hess, B., et van der Spoel, D. (2001). GROMACS 3.0 : A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.*, 7 :306–317.
- Lippard, S. J. (1999). Free copper ions in the cell? *Science*, 284 :748–749.
- Longa, S. D., Ascone, I., Bianconi, A., Bonfigli, A., Castellano, A. C., Zarivi, O., et Miranda, M. (1996). The dinuclear copper site structure of *agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 271(35) :21025–21030.
- Lund, P. A. et Brown, N. L. (1987). Role of the *merT* and *merP* gene products of transposon *Tn501* in the induction and expression of resistance to mercuric ions. *Gene*, 52(2-3) :207–214.
- MacKerell, A. D. J., Bashford, D., Bellott, R. L., Dunbrack, R. L. J., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E. I., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., et Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, 102(18) :3586–3616.
- McCall, K. A. et Fierke, C. A. (2004). Probing determinants of the metal ion selectivity in carbonic anhydrase using mutagenesis. *Biochemistry*, 43(13) :3979–3986.
- McCammon, J. (1984). Protein dynamics. *Rep. Prog. Phys.*, 47 :1–46.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaëys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D., et Wattiez, R. (2003). *Ralstonia metal-lidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals : towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27(2-3) :385–410.
- Merlin, C., Masters, M., McAteer, S., et Coulson, A. (2003). Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.*, 185(21) :6415–6424.
- Mira, H., Martinez-Garcia, F., et Peñarrubia, L. (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J.*, 25(5) :521–528.

- Miras, R., Poger, D., Morin, I., Jacquin, O., Cuillel, M., Den Auwer, C., Ferrand, M., Guillain, F., et Mintz, E. (2005). Cu(I)-glutathionate induced dimerization of Atx1 : a possible mechanism for Cu(I) transfer to Ccc2 in yeast. *Soumis*.
- Morin, I., Cuillel, M., Lowe, J., Crouzy, S., Guillain, F., et Mintz, E. (2005). Cd²⁺- or Hg²⁺-binding proteins can replace the Cu⁺-chaperone Atx1 in delivering Cu⁺ to the secretory pathway in yeast. *FEBS Lett.*, 579(5) :1117–1123.
- Mukhopadhyay, D., Yu, H. R., Nucifora, G., et Misra, T. K. (1991). Purification and functional characterization of MerD. A coregulator of the mercury resistance operon in Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.*, 266(28) :18538–18542.
- Multhaup, G., Strausak, D., Bissig, K. D., et Solioz, M. (2001). Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of *Enterococcus hirae* assessed by surface plasmon resonance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288(1) :172–177.
- Naeve, G. S., Vana, A. M., Eggold, J. R., Kelner, G. S., Maki, R., Desouza, E. B., et Foster, A. C. (1999). Expression profile of the copper homeostasis gene, *rATOX1*, in the rat brain. *Neuroscience*, 93(3) :1179–1187.
- Nanji, M. S. et Cox, D. W. (1999). The copper chaperone Atox1 in canine copper toxicosis in bedlington terriers. *Genomics*, 62(1) :108–112.
- Neria, E., Fischer, S., et Karplus, M. (1996). Simulation of activation free energies in molecular systems. *J. Chem. Phys.*, 105(5) :1902–1921.
- Newton, G. L., Bewley, C. A., Dwyer, T. J., Horn, R., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Faulkner, D. J., et Fahey, R. C. (1995). The structure of U17 isolated from *Streptomyces clavuligerus* and its properties as an antioxidant thiol. *Eur. J. Biochem.*, 230(2) :821–825.
- Odermatt, A. et Solioz, M. (1995). Two *trans*-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.*, 270(9) :4349–4354.
- O'Halloran, T. V. et Culotta, V. C. (2000). Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.*, 275(33) :25057–25060.
- Palumaa, P., Kangur, L., Voronova, A., et Sillard, R. (2004). Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome *c* oxidase. *Biochem. J.*, 382 :307–314.
- Pan-Hou, H. S. et Imura, N. (1981). Role of hydrogen sulfide in mercury resistance determined by plasmid of *Clostridium cochlearium* T-2. *Arch. Microbiol.*, 129(1) :49–52.
- Peña, M. M. O., Lee, J., et Thiele, D. J. (1999). A delicate balance : homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.*, 129(7) :151–160.
- Pearson, R. G. (1963). Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 85(22) :3533–3539.
- Pearson, R. G. (1966). Acids and bases. *Science*, 151 :172–177.
- Pennella, M. A., Shokes, J. E., Cospers, N. J., Scott, R. A., et Giedroc, D. P. (2003). Structural elements of metal selectivity in metal sensor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(7) :3713–3718.

- Poger, D., Fuchs, J.-F., Nedev, H., Ferrand, M., et Crouzy, S. (2005). Molecular dynamics study of the metallochaperone Hah1 in its apo and Cu(I)-loaded states : Role of the conserved residue M10. *FEBS Lett.*, 579(24) :5287–5292.
- Portnoy, M. E., Rosenzweig, A. C., T., R., Huffman, D. L., O'Halloran, T. V., et Cizewski Culotta, V. (1999). Structure-function analyses of the Atx1 metallochaperone. *J. Biol. Chem.*, 274(21) :15041–15045.
- Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S.-J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Cizewski Culotta, V., Penner-Hahn, J. E., et O'Halloran, T. V. (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science*, 278 :853–856.
- Puig, S. et Thiele, D. J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6(2) :171–180.
- Qian, H., Sahlman, L., Eriksson, P. O., Hambræus, C., Edlund, U., et Sethson, I. (1998). NMR solution structure of the oxidized form of MerP, a mercuric ion binding protein involved in bacterial mercuric ion resistance. *Biochemistry*, 37(26) :9316–9322.
- Rae, T., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Cizewski Culotta, V., et O'Halloran, T. V. (1999). Undetectable intracellular free copper : the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284 :805–808.
- Ralle, M., Lutsenko, S., et Blackburn, N. J. (2003). X-Ray absorption spectroscopy of the copper chaperone Hah1 reveals a linear two-coordinate Cu(I) center capable of adduct formation with exogenous thiols and phosphines. *J. Biol. Chem.*, 278(25) :23163–23170.
- Ravel, B. (2004). *Using ARTEMIS, version 0.03*.
- Ravel, B. and Newville, M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS : data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Rad.*, 12(4) :537–541.
- Rehr, J. J. et Albers, R. C. (2000). Theoretical approaches to X-ray absorption fine structure. *Rev. Mod. Phys.*, 72(3) :621–654.
- Remaut, H., Safarov, N., Ciurli, S., et van Beeumen, J. (2001). Structural basis for Ni²⁺ transport and assembly of the urease active site by the metallochaperone UreE from *Bacillus pasteurii*. *J. Biol. Chem.*, 276(52) :49365–49370.
- Rinderle, S. J., Booth, J. E., et Williams, J. W. (1983). Mercuric reductase from R-plasmid NR1 : characterization and mechanistic study. *Biochemistry*, 22(4) :869–876.
- Rosenzweig, A. C. (2001). Copper delivery by metallochaperone proteins. *Acc. Chem. Res.*, 34 :119–128.
- Rosenzweig, A. C., Huffman, D. L., Hou, M. Y., Wernimont, A. K., Pufahl, R. A., et O'Halloran, T. V. (1999). Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure Fold. Des.*, 7(6) :605–617.
- Rosenzweig, A. C. et O'Halloran, T. V. (2000). Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4(2) :140–147.
- Ross, W., Park, S. J., et Summers, A. O. (1989). Genetic analysis of transcriptional activation and repression in the *Tn21 mer* operon. *J. Bacteriol.*, 171(7) :4009–4018.

- Rossy, E., Champier, L., Bersch, B., Brutscher, B., Blackledge, M., et Coves, J. (2004). Biophysical characterization of the MerP-like amino-terminal extension of the mercuric reductase from *Ralstonia metallidurans* CH34. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 9(1) :49–58.
- Roux, B. (1996). The molecular basis of the valence selectivity of the gramicidin channel : a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophys. J.*, 71(16) :3177–3185.
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., et Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints : molecular dynamics of *n*-alkanes. *J. Comput. Phys.*, 23(3) :327–341.
- Sahlman, L., Wong, W., et Powlowski, J. (1997). A mercuric ion uptake role for the integral inner membrane protein, MerC, involved in bacterial mercuric ion resistance. *J. Biol. Chem.*, 272(47) :29518–29522.
- Sambongi, Y., Wakabayashi, T., Yoshimizu, T., Omote, H., Oka, T., et Futai, M. (1997). *Caenorhabditis elegans* cDNA for a Menkes/Wilson disease gene homologue and its function in a yeast *ccc2* gene deletion mutant. *J. Biochem. (Tokyo)*, 121(6) :1169–1175.
- Sayers, D. E., Stern, E. A., et Lytle, F. W. (1971). New technique for investigating noncrystalline structures : Fourier analysis of the extended X-ray absorption fine structure. *Phys. Rev. Lett.*, 27 :1204–1207.
- Schmidt, P. J., Rae, T. D., Pufahl, R. A., Hamma, T., Strain, J., O'Halloran, T. V., et Culotta, V. C. (1999). Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 274(34) :23719–23725.
- Serre, L., Rossy, E., Pebay-Peroula, E., Cohen-Addad, C., et Covès, J. (2004). Crystal structure of the oxidized form of the periplasmic mercury-binding protein MerP from *Ralstonia metallidurans* CH34. *J. Mol. Biol.*, 339(1) :161–171.
- Shewchuk, L. M., Helmann, J. D., Ross, W., Park, S. J., Summers, A. O., et Walsh, C. T. (1989). Transcriptional switching by the MerR protein : activation and repression mutants implicate distinct DNA and mercury(II) binding domains. *Biochemistry*, 28(5) :2340–2344.
- Siciliano, S. D. et Lean, D. R. (2002). Methyltransferase : an enzyme assay for microbial methylmercury formation in acidic soils and sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(6) :1184–1190.
- Smith, T., Pitts, K., McGarvey, J. A., et Summers, A. O. (1998). Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg(0). *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(4) :1328–1333.
- Solioz, M. et Stoyanov, J. V. (2003). Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27(2-3) :183–195.
- Solioz, M. et Vulpe, C. (1996). CPx-type ATPases : a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.*, 21(7) :237–241.
- Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., et Than, M. E. (2000). Structure and mechanism of the aberrant *ba₃*-cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.*, 19(8) :1766–1776.

- Spies, H. S. et Steenkamp, D. J. (1994). Thiols of intracellular pathogens. Identification of ovothiol A in *Leishmania donovani* and structural analysis of a novel thiol from *Mycobacterium bovis*. *Eur. J. Biochem.*, 224(1) :203–213.
- Srinivasan, C., Posewitz, M. C., George, G. N., et Winge, D. R. (1998). Characterization of the copper chaperone Cox17 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 37(20) :7572–7577.
- Steele, R. A. et Opella, S. J. (1997). Structures of the reduced and mercury-bound forms of MerP, the periplasmic protein from the bacterial mercury detoxification system. *Biochemistry*, 36(1) :6885–6895.
- Steenkamp, D. J. et Spies, H. S. (1994). Identification of a major low-molecular-mass thiol of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata* as ovothiol A. Facile isolation and structural analysis of the bimane derivative. *Eur. J. Biochem.*, 223(2) :43–50.
- Steinbach, P. J. et Brooks, B. R. (1994). New spherical-cutoff methods for long-range forces in macromolecular simulation. *J. Comput. Chem.*, 15(7) :667–683.
- Steinebach, O. M. et Wolterbeek, H. T. (1994). Effects of copper on rat hepatoma HTC cells and primary cultured rat hepatocytes. *J. Inorg. Biochem.*, 53(1) :27–48.
- Stergioudis, G. A., Kokkou, S. C., Rentzeperis, P. J., et Karagiannidis, P. (1987). Structures of the isomorphous compounds dimeric tris[2(1*H*)-pyridine-2-thione]copper(I) chloride and tris[2(1*H*)-pyridine-2-thione]copper(I) bromide. *Acta Crystallogr.*, C43 :1685–1688.
- Stickle, D., Presta, L. G., Dill, K. A., et Rose, G. D. (1992). Hydrogen bonding in globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 226 :1143–1159.
- Straatsma, T. P., Berendsen, H. J. C., et Stam, A. J. (1986). Estimation of statistical errors in molecular simulation calculations. *Mol. Phys.*, 57 :89–95.
- Strausak, D., Howie, M. K., Firth, S. D., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Multhaup, G., et Mercer, J. F. B. (2003). Kinetic analysis of the interaction of the copper chaperone Atox1 with the metal-binding sites of the Menkes protein. *J. Biol. Chem.*, 278(6) :20821–20827.
- Suarez Covarrubias, A., Larsson, A. M., Hogbom, M., Lindberg, J., Bergfors, T., Bjorkelid, C., Mowbray, S. L., Unge, T., et Jones, T. A. (2005). Structure and function of carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 280(19) :18782–18789.
- Swaminathan, S., Harte, W. E., et Beveridge, D. L. (1991). Investigation of domain structure via molecular dynamics simulation : application to HIV-1 protease dimer. *J. Am. Chem. Soc.*, 113 :2717–2721.
- Tanchou, V., Gas, F., Urvoas, A., Cougouluègne, F., Ruat, S., Averseng, O., et Quémeneur, E. (2004). Copper-mediated homo-dimerisation for the Hah1 metallo-chaperone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325(2) :388–394.
- Totter, S., Rondet, S. A. M., Borrelly, G. P. M., Robinson, P. J., Rich, P. R., et Robinson, N. J. (2002). A copper metallochaperone for photosynthesis and respiration reveals metal-specific targets, interaction with an importer, and alternative sites for copper acquisition. *J. Biol. Chem.*, 277(7) :5490–5497.

- Tzagoloff, A., Capitanio, N., Nobrega, M. P., et Gatti, D. (1990). Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of Cox11, a homolog of the *P. denitrificans* protein encoded by *orf3*. *EMBO J.*, 9 :2759–2764.
- Urvoas, A., Moutiez, M., Estienne, C., Couprie, J., Mintz, E., et Le Clainche, L. (2004). Metal-binding stoichiometry and selectivity of the copper chaperone CopZ from *Enterococcus hirae*. *Eur. J. Biochem.*, 271(5) :993–1003.
- Valentine, J. S. et Gralla, E. B. (1997). Delivering copper inside yeast and human cells. *Science*, 278 :817–818.
- Verlet, L. (1967). Computer “experiments” on classical fluids. I. thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Phys. Rev.*, 159(1) :98–103.
- Vortisch, V., Kroneck, P., et Hemmerich, P. (1976). Model studies on the coordination of copper in enzymes. IV. Structure and stability of cuprous complexes with sulfur-containing ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, 98(10) :2821–2826.
- Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S., et Gitschier, J. (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat. Genet.*, 3(1) :7–13.
- Waggoner, D. J., Bartnikas, T. B., et Gitlin, J. D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.*, 6(4) :221–230.
- Wakabayashi, T., Nakamura, N., Sambongi, Y., Wada, Y., Oka, T., et Futai, M. (1998). Identification of the copper chaperone, CUC-1, in *Caenorhabditis elegans* : tissue specific co-expression with the copper transporting ATPase, CUA-1. *FEBS Lett.*, 440(1-2) :141–146.
- Walsh, C. T., Distefano, M. D., Moore, M. J., Shewchuk, L. M., et Verdine, G. L. (1988). Molecular basis of bacterial resistance to organomercurial and inorganic mercuric salts. *FASEB J.*, 2(2) :124–130.
- Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. J., et Weiner, P. (1984). A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106(3) :765–778.
- Wernimont, A. K., Huffman, D. L., Lamb, A. L., O’Halloran, T. V., et Rosenzweig, A. C. (2000). Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nat. Struct. Biol.*, 7(9) :766–771.
- Wilmot, C. M. et Thornton, J. M. (1990). β -Turns and their distortions : a proposed new nomenclature. *Protein Eng.*, 3 :479–493.
- Wimmer, R., Herrmann, T., Solioz, M., et Wüthrich, K. (1999). NMR structure and metal interactions of the CopZ copper chaperone. *J. Biol. Chem.*, 274(32) :22597–22603.
- Wintz, H. et Vulpe, C. (2002). Plant copper chaperones. *Biochem. Soc. Trans.*, 30(4) :732–735.
- Xiao, Z., Loughlin, F., George, G. N., Howlett, G. J., et Wedd, A. G. (2004). C-terminal domain of the membrane copper transporter Ctr1 from *Saccharomyces cerevisiae* binds four Cu(I) ions as a cuprous-thiolate polynuclear cluster : sub-femtomolar Cu(I) affinity of three proteins involved in copper trafficking. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 :3081–3090.

Xiao, Z. et Wedd, A. G. (2002). A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 6 :588–589.

Yuan, D. S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., et Klausner, R. D. (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(7) :2632–2636.

Résumé

Les métallochaperones à cuivre assurent l'acheminement des ions $\text{Cu}^{(I)}$ vers des protéines cibles dans la cellule. Les métallochaperones de la famille d'Atx1 présentent une forte homologie de séquence et le même repliement. MerP, une métallochaperone à mercure, partage ces mêmes caractéristiques de séquence et de structure.

Cette thèse vise à mettre en évidence des propriétés dynamiques et structurales responsables de la sélectivité des métallochaperones pour le $\text{Cu}^{(I)}$ ou le $\text{Hg}^{(II)}$.

Des simulations de dynamique moléculaire des métallochaperones à cuivre, Atx1 et Hah1, et de MerP, dans leurs formes apo, et liées au $\text{Cu}^{(I)}$ ou au $\text{Hg}^{(II)}$, ont révélé des caractéristiques dynamiques et énergétiques communes aux trois métallochaperones quand elles chélatent leur métal natif. Un réseau d'interactions entre la boucle du site de chélation du métal et deux autres boucles situées autour de ce site, a été identifié et varie d'un état métallé à l'autre. Il pourrait ainsi définir une éventuelle sélectivité pour les métaux. La boucle du site de chélation montre une grande structuration en présence de métal, accompagnée d'une rigidification si ce métal est le métal natif.

Les expériences d'absorption de rayons X du $\text{Cu}^{(I)}$ chélaté par Atx1 ont montré que le $\text{Cu}^{(I)}$ possède toujours une géométrie trigonale dont les ligands sont les deux cystéines du site de chélation, et un ligand endogène ou exogène. Atx1 présente donc au $\text{Cu}^{(I)}$ une géométrie qui lui est préférentielle. Cette propriété est un déterminant de la sélectivité au $\text{Cu}^{(I)}$ par rapport à d'autres métaux.

En présence de glutathion, le complexe Atx1- $\text{Cu}^{(I)}$ forme un homodimère binucléaire associé à deux molécules de glutathion. L'implication de ce ligand exogène est proposée comme un facteur de sélectivité *in vivo* d'Atx1 pour le $\text{Cu}^{(I)}$, et pourrait favoriser la reconnaissance par Atx1 de sa protéine cible.

Abstract

Copper metallochaperones ensure delivery of $\text{Cu}^{(I)}$ ions towards target proteins in the cell. Metallochaperones of the Atx1 family exhibit a high sequence homology and the same fold. MerP, a mercury metallochaperone, share the same feature of sequence and structure.

This thesis aims at underlining some dynamical and structural properties responsible for selectivity of metallochaperones for $\text{Cu}^{(I)}$ and $\text{Hg}^{(II)}$.

Molecular dynamics simulations of copper metallochaperones, Atx1 and Hah1, and of MerP, in their apo forms, and bound to $\text{Cu}^{(I)}$ or $\text{Hg}^{(II)}$, revealed dynamical and energetic features common to the three metallochaperones when they chelate their native metal. An interaction network between the metal-binding site loop and two other loops around the site, was identified and varies from a metalated state to another. Thus, it could define a probable selectivity for metals. The loop of the chelation site shows a great structuration in presence of metal, accompanied by a rigidifying effect if this metal is native.

X-ray absorption experiments of $\text{Cu}^{(I)}$ bound by Atx1 showed that $\text{Cu}^{(I)}$ always has a trigonal geometry whose ligands are the cysteines of the metal-binding site, and an endogenous or exogenous ligand. So Atx1 always offers $\text{Cu}^{(I)}$ its preferential geometry. This property is a determinant of the selectivity of $\text{Cu}^{(I)}$ with respect to other metals.

In presence of glutathione, the Atx1- $\text{Cu}^{(I)}$ complex forms a binuclear homodimer associated to two glutathione molecules. Involvement of the exogenous ligand is suggested as an *in vivo* selectivity factor of Atx1 for $\text{Cu}^{(I)}$, and could favor the recognition by Atx1 of its target protein.
