Perception du stress métallique (nickel/cobalt) par le système de signalisation transmembranaire Cnr chez Cupriavidus metallidurans CH34

Juliette Trepreau

▶ **To cite this version:**

Juliette Trepreau. Perception du stress métallique (nickel/cobalt) par le système de signalisation transmembranaire Cnr chez Cupriavidus metallidurans CH34. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV061 . tel-00656119

HAL Id: tel-00656119

https://theses.hal.science/tel-00656119

Submitted on 3 Jan 2012

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 DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Juliette Trepreau

Thèse dirigée par **Jacques Covès** et
codirigée par **Antoine Maillard**

préparée au sein de l'**Institut de Biologie Structurale**
Equipe Homéostasie des Métaux et Signalisation
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Perception du stress métallique (nickel/cobalt) par le système de signalisation transmembranaire Cnr chez *Cupriavidus metallidurans* CH34

Thèse soutenue publiquement le **18 novembre 2011**
devant le jury composé de :

Mme Cécile WANDERSMAN
Directeur de Recherche, Institut Pasteur de Paris, Rapporteur
M. Peter FALLER
Professeur, Université Paul Sabatier de Toulouse, Rapporteur
M. Johannes GEISELMANN
Professeur, Université Joseph Fourier de Grenoble, Membre
Mme Agnès RODRIGUE
Maître de Conférence, INSA Université de Lyon-1, Membre

Remerciements

Je remercie le docteur Cécile Wandersman et le professeur Peter Faller pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie le professeur Hans Geiselmann ainsi que le docteur Agnès Rodrigue pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Beaucoup de personnes ont contribué au bon déroulement de ma thèse, je tiens à les remercier pour leur aide précieuse durant ces trois années.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Jacques Covès et Antoine Maillard, mes directeur et co-directeur de thèse qui m'ont accueillie et encadrée avec patience et compétence. Grâce à vous, votre disponibilité et votre aide j'ai pu travailler dans une atmosphère scientifique remarquable, cela a été un grand bonheur scientifique de travailler dans votre équipe pendant ces 3 années.

Ensuite je voudrai remercier pêle-mêle beaucoup de personnes qui autant par leur soutien que leur amitié ont contribué à faire de ma vie au laboratoire et à Grenoble une période heureuse et enrichissante ... Eve pour ses idées lumineuses et ses conseils avisés.... Isa pour son aide au laboratoire au quotidien et pour sa patience avec NccX...Eric pour les discussions scientifiques et amicales productives et son aides sur tous les logiciels trop compliqués...Carole pour la RPE mais surtout pour les excellents moments passés à Vancouver en ta compagnie...Géraldine pour le XAS et ton aide patiente pour me faire comprendre la technique....Anne Imberty pour le décryptage de l'ITC...Aymeric et Catherine pour leur aide au quotidien en ITC...Cécile de la repro du CNRS pour tout le temps que l'on a pris pour faire de beaux posters .... Bien sûr tous les membres de l'ex LPM, en particulier Michel alias Mac Gyver, Céline et Corinne qui ont toujours apporté des réponses à toutes mes questions.... Ieva, Vera, Pankaj, Maria pour les bon moments dans notre bureau multiculturel...ainsi que Franck, Antoine, Lina, et tous les autres...Egalement un grand merci aux membres du ex LCCP pour m'avoir accueillie si gentiment parmi eux, Juan pour ses infos sur les post doc, Patricia pour tous les problèmes d'ordinateurs et son soutien, Christine et Mickael pour votre aide et votre compagnie à Vancouver, Yvain, Marina, les 2 Elodie, Hugo Lydie et Claudine...un grand merci aussi à Monika pour son écoute et ses conseils avisés....Tous les amis de Grenoble anciens comme nouveaux Eric, Julien, Mamé, Lydia, Gael, Vincent, mes collocs Anne-So et Titi et les collocs de la rue des castors qui ont dû me supporter pendant ces dernières semaines Guillaume, Carole et Cécile....Un remerciement très spécial pour Romain avec qui on a bien galéré (surtout à la fin) merci pour ton principal défaut à savoir d'être toujours disponible et de ne pas savoir dire non, à Sarah que j'ai rencontré trop tard mais qui par sa fraîcheur m'a permis de me changer les idées... Un grand merci à Julien Curier, dit le patron, qui a un don pour l'excellence...merci d'être toi !

Et bien sûr un grand merci à ma famille et à tous les amis de Paris, de Lyon ou de Marseille, en particulier ceux qui se sont déplacés pour la soutenance Alice, Mic, Jez, Fanny, Mat, Aude et Chloé...

Pour finir une pensée spéciale pour Richard qui m'a tellement appris et qui était un petit peu comme mon papa de Grenoble...

Table des matières

I Introduction **7**

1 Les métaux en biologie **9**

1.1 Les métaux de transition . . . 9
1.1.1 Définition . . . 9
1.1.2 Géométrie de coordination . . . 10
1.2 Les métaux dans la cellule . . . 10
1.2.1 Rôle des métaux dans la cellule . . . 10
1.2.2 Chimie de coordination des métaux en biologie . . . 11
1.2.3 Affinité des métaux pour les protéines . . . 14
1.2.4 Concentration des métaux dans les cellules . . . 15
1.2.5 Toxicité des ions métalliques . . . 16
1.2.6 Enzymes dépendant du nickel . . . 17
1.2.6.1 Uréase . . . 17
1.2.6.2 [NiFe]-Hydrogénase . . . 18
1.2.6.3 Superoxyde Dismutase . . . 19
1.2.6.4 Carbone monoxyde déshydrogénase . . . 20
1.2.6.5 Méthyl-CoM Réductase . . . 21
1.2.6.6 Glyoxalase I . . . 21
1.2.7 Enzymes dépendant du cobalt . . . 22
1.2.7.1 Vitamine B_{12} . . . 22
1.2.7.2 Protéines à cobalt non-corrine . . . 23
1.2.7.3 Utilisation du cobalt en chimie bio-inorganique . . . 26

2 Homéostasie des métaux lourds **27**

2.1 Qu'est-ce que l'homéostasie des métaux lourds ? . . . 27
2.2 Import des ions métalliques . . . 27
2.2.1 Import dans le périplasme du nickel et du cobalt . . . 28
2.2.2 Import dans le cytoplasme des ions nickel et cobalt : . . . 28
2.2.2.1 Les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) : . . . 28
2.2.2.2 Les perméases NiCoT : . . . 30
2.2.2.3 Les transporteurs d'ions divalents CorA : . . . 31
2.3 Efflux des métaux . . . 32
2.3.1 Systèmes d'efflux de la membrane cytoplasmique . . . 32
2.3.1.1 Les ATPases de type P_{1B} . . . 32
2.3.1.2 Les protéines de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitators) . . . 34

2.3.1.3 Les transporteurs spécifiques du cobalt et du nickel 35
2.3.2 Systèmes d'efflux à travers la membrane cytoplasmique et la membrane périplasmique : les familles RND, MFP et OMF 35
2.4 Les stratégies de défense des bactéries 36
2.4.1 Exclusion du métal par l'imperméabilité de la membrane 36
2.4.2 Séquestration intracellulaire 37
2.4.3 Séquestration extracellulaire 38
2.4.4 Détoxication enzymatique 38
2.4.5 Réduction de la sensibilité les cibles cellulaires 39

3 Régulation de l'homéostasie des métaux de transition 40
3.1 Les métallorégulateurs 41
3.1.1 NikR 41
3.1.2 RcnR 44
3.1.3 NmtR et KmtR 45
3.1.4 Nur 46
3.2 Les systèmes à deux composants 46
3.2.1 Description générale 46
3.2.2 Système PhoP/PhoQ 48
3.2.3 Résistance au fer et au stress oxydatif 49
3.2.3.1 SenRS et HbpS 49
3.2.3.2 Autres systèmes 51
3.3 Systèmes dépendants des facteurs σ_{ECF} 51
3.3.1 Description générale : les facteurs σ_{ECF} 51
3.3.2 Le système σ_E chez *E. coli* 52
3.3.3 La régulation de l'import de fer 53
3.3.3.1 Transport du fer *via* des sidérophores 54
3.3.3.2 Transport du fer *via* des hémophores chez *Serratia marcescens* . . 57

4 Le déterminant *cnr* de *Cupriavidus metallidurans* CH34 59
4.1 *Cupriavidus metallidurans* CH34 59
4.1.1 Description générale 59
4.1.2 Intérêt biotechnologique de *C. metallidurans* CH34 60
4.1.3 Les systèmes de résistance aux métaux lourds 61
4.1.3.1 Déterminants situés sur le chromosome et sur le méga-plasmide . 61
4.1.3.2 Déterminants situés sur le plasmide pMOL30 62
4.1.3.3 Déterminants situés sur le plasmide pMOL28 62
4.2 Le système Cnr 62
4.2.1 Régulation de l'expression de *cnrCBA* 63
4.2.1.1 Le système de régulation CnrYXH 65
4.2.1.2 Induction du système par les métaux 67
4.2.2 La protéine CnrX 68
4.2.2.1 Séquence de CnrX 68
4.2.2.2 Etudes préliminaires sur CnrX 70
4.2.2.3 Caractérisation de la protéine CnrXs 70

II Matériels et méthodes 74

5 Matériels et méthodes 75

5.1 Production et purification des protéines d'intérêts . . . 75
5.1.1 Milieu de culture . . . 75
5.1.2 Souches bactériennes et plasmides . . . 75
5.1.3 Mutagenèse dirigée de CnrXs . . . 76
5.1.4 Clonage de NccXs . . . 77
5.1.4.1 Amplification du gène d'intérêt . . . 77
5.1.4.2 Purification d'ADN et digestion du plasmide et de l'insert . . . 78
5.1.4.3 Ligation de l'ADN . . . 78
5.1.5 Clonage de NccX . . . 79
5.1.6 Transformation . . . 79
5.1.7 Expression et purification des protéines solubles . . . 79
5.1.7.1 Culture et expression . . . 79
5.1.7.2 Lyse cellulaire . . . 80
5.1.7.3 Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions . . . 80
5.1.7.4 Filtration sur gel . . . 81
5.1.8 Purification de NccX . . . 81
5.1.9 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%) Tris-Tricine en présence de SDS . . . 82
5.2 Etude de la production de CnrX chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 par immunodétection . . . 82
5.2.1 Fractionnement des cellules . . . 83
5.2.2 Immunodétection . . . 83
5.3 Microcalorimétrie de titrage isotherme . . . 84
5.3.1 Principe . . . 84
5.3.2 Mode opératoire . . . 86
5.4 Spectroscopie UV-Visible . . . 87
5.4.1 Principe . . . 87
5.4.2 Mode opératoire . . . 87
5.4.2.1 Titrage des protéines suivi par spectroscopie UV-visible . . . 87
5.4.2.2 Titrage en boîte à gants suivi par spectroscopie UV-visible : . . . 88
5.4.2.3 Spectrophotométrie sur les cristaux de CnrXs métallée cobalt . . . 88
5.5 La résonance paramagnétique électronique . . . 88
5.5.1 Principe . . . 88
5.5.2 Mode opératoire . . . 90
5.6 La spectroscopie d'absorption des rayons X . . . 90
5.6.1 Principe . . . 90
5.6.1.1 Caractéristiques d'un spectre . . . 91
5.6.2 Analyses des spectres XANES . . . 93
5.6.3 Analyse des spectres EXAFS . . . 93
5.6.3.1 Extraction des données . . . 93
5.6.3.2 Simulation numérique du spectre EXAFS . . . 94

5.6.4 Mise en oeuvre expérimentale . . . 95
5.7 Cristallographie et cristallogenèse . . . 96
5.7.1 La cristallogenèse . . . 97
5.7.1.1 Les paramètres influençant la solubilité des protéines . . . 97
5.7.1.2 Le diagramme de phases . . . 98
5.7.1.3 Techniques de cristallisation des protéines : la diffusion de vapeur en goutte suspendue ou en goutte assise . . . 98
5.7.1.4 Criblage des conditions de cristallisation . . . 100
5.7.2 La cristallographie aux rayons X . . . 100
5.7.2.1 La cryocristallographie . . . 100
5.7.2.2 Diffraction aux rayons X par les cristaux . . . 101
5.7.2.3 Les critères d'évaluation du modèle . . . 102
5.7.2.4 L'analyse des structures . . . 102
5.7.3 L'enregistrement des données de diffraction . . . 103

III Résultats et Discussions 104

6 Caractérisation de CnrX *in vivo* 105
6.1 Influence des métaux sur la production de CnrX . . . 105
6.2 Quelle est la topologie de CnrX ? . . . 106

7 Etude spectroscopique de la protéine CnrXs 108
7.1 Production et purification de CnrXs . . . 109
7.2 Caractérisation des sites de liaison au métal par spectroscopie UV-visible . . . 109
7.2.1 Spectres d'absorption du nickel et du cuivre . . . 111
7.2.2 Spectres d'absorption du cobalt . . . 113
7.2.2.1 Identification de résidus impliqués dans la liaison au cobalt . . . 113
7.2.2.2 Analyse de l'effet de l'oxygène sur l'absorption du cobalt . . . 116
7.2.3 Le site 2 existe-t-il dans la forme entière de la protéine ? . . . 119
7.3 Etude des deux sites de liaison au métal par RPE . . . 122
7.3.1 Analyse de l'effet de l'oxygène . . . 122
7.3.2 Détermination des caractéristiques structurales des sites F et S par RPE . 124
7.3.2.1 Spectres du cobalt . . . 124
7.3.2.2 Spectres du cuivre . . . 125
7.4 Etude des deux sites de liaison au cobalt par spectroscopie d'absorption X . . . 127
7.4.1 Coordination et état d'oxydation du cobalt dans les sites F et S par l'étude du XANES . . . 128
7.4.2 Caractérisation du site F par l'analyse des spectres EXAFS . . . 129
7.4.3 Caractéristiques du site S par l'étude du XANES et de l'EXAFS . . . 131
7.4.4 Caractéristiques des sites de liaison au cobalt de la protéine CnrXs . . . 133
7.5 Mesure de l'affinité du cobalt pour les sites F et S par ITC . . . 133
7.6 Mesure de l'affinité du zinc pour la protéine . . . 135
7.7 Mesure relative de l'affinité du zinc, du nickel et du cuivre pour CnrXs . . . 136

7.7.1 Compétition entre les ions nickel, cobalt et zinc suivie par spectroscopie UV-visible . . . 136
7.7.2 Compétition entre le cuivre et le cobalt suivie par RPE . . . 136
7.8 Le site S est impliqué dans la stabilisation du dimère de CnrXs . . . 139
7.9 Discussion . . . 141

8 Etude structurale de CnrXs 147
8.1 La protéine apo . . . 148
8.2 Cristallisation des protéines métallées . . . 149
8.3 Description et analyse des structures cristallograhiques . . . 150
8.3.1 Architecture générale de CnrXs : . . . 150
8.3.2 Caractérisation des sites de liaison au métal . . . 152
8.3.2.1 La forme cristalline de CnrXs métallée cobalt ne contient que le site F . . . 152
8.3.2.2 Le site de liaison du nickel et du cobalt . . . 153
8.3.2.3 Les sites de liaison du zinc . . . 153
8.3.2.4 Comparaison des sites de liaison au métal dans CnrXs-E63Q et dans les formes métallées de CnrXs . . . 155
8.3.3 Un réseau dense d'interactions stabilise le protomère et le dimère . . . 155
8.3.3.1 Un réseau d'interactions hydrophobes . . . 155
8.3.3.2 ... complétés par des interactions non-hydrophobes . . . 159
8.3.4 Modifications conformationnelles dépendant du métal : des effets d'ampleur variables selon les métaux . . . 159
8.3.4.1 Différences entre les formes CnrXs-Ni/CnrXs-Co avec la forme CnrXs-Zn . . . 159
8.3.4.2 Différences de conformation des protéines CnrXs-Ni et CnrXs-Co 162
8.4 Discussion . . . 167
8.4.1 A l'état basal, CnrXs est lié au zinc . . . 167
8.4.2 Quelles sont les bases de la sélectivité de CnrXs ? . . . 169
8.4.3 Existent-ils des homologues de CnrXs ? . . . 171
8.4.4 Comment le signal est-il transmis à CnrY ? . . . 172

IV Conclusions et perspectives 176

9 Rôle de Met123 179
9.1 Est-ce que Met123 est un résidu essentiel pour la liaison du métal *in vitro* ? . . . 179
9.1.1 Titrage de CnrXs-H32A-M123A par le cobalt suivi par spectroscopie UV-visible . . . 179
9.1.2 Analyse RPE de la CnrXs-H32A-M123A métallée cobalt . . . 179
9.1.3 Analyse XAS de CnrXs-H32A-M123A métallée cobalt . . . 181
9.1.3.1 Partie XANES . . . 181
9.1.4 Partie EXAFS . . . 181
9.1.5 Analyse de la structure de CnrXs-M123A métallée nickel . . . 182
9.2 Est ce que Met123 est indispensable à la fonction de la protéine *in vivo* ? . . . 185

10 Autres perspectives **186**

Première partie

Introduction

Le but de ma thèse a été de caractériser un senseur de métaux périplasmique appartenant à un système transmembranaire de transduction du signal chez la bactérie *C. metallidurans* CH34. Les ions métalliques inducteurs, le nickel ou le cobalt, sont détectés par cette protéine senseur qui transmet l'information à travers la membrane interne vers le cytoplasme par l'intermédiaire de deux autres protéines. Cela entraine l'expression de gènes de résistance à ces ions métalliques. Une meilleure compréhension de l'interaction entre ce senseur et les métaux sera mise à profit pour améliorer nos connaissances sur ce système de transduction du signal.

L'introduction de ce manuscrit portera sur les métaux retrouvés en biologie et sur leur rôle capital chez les êtres vivants. Les métaux pouvant engendrer une importante toxicité cellulaire, je développerai aussi les différents systèmes mis en oeuvre par les bactéries pour protéger la cellule des carences et des excès. Je me focaliserai plus particulièrement sur les systèmes impliquant le nickel et le cobalt et décrirai notamment les sites métalliques de ces protéines ainsi que les déterminants assurant la spécificité de l'interaction protéine :métal lorsqu'ils sont connus. Cela m'amènera à détailler les différents systèmes de transduction du signal impliqués dans l'homéostasie des métaux, en particulier ceux utilisés par la bactérie *C. metallidurans* CH34 pour résister aux métaux lourds.

Chapitre 1

Les métaux en biologie

1.1 Les métaux de transition

1.1.1 Définition

Le terme métal désigne, avec les metalloïdes et les non métaux, une des trois catégories présente dans le tableau périodique des éléments [Tableau 1.1] (Williams et da Silva, 2006).

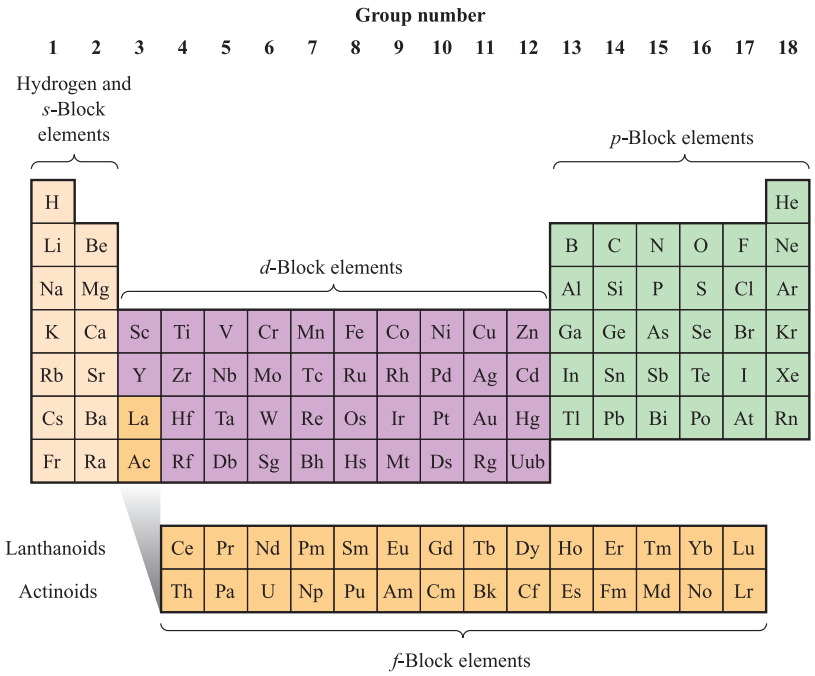


Tableau 1.1 – Tableau périodique des éléments d'après Housecroft et Constable (2006).

Les métaux sont des éléments chimiques qui peuvent perdre des électrons pour former des cations et qui ont des oxydes basiques (Atkins et Jones, 1997). A partir de cette définition, la plupart des éléments peuvent être décrits comme métaux. De ce fait, ils sont subdivisés dans des

classes chimiques différentes, selon leur place dans le tableau périodique (métaux alcalins, métaux alcalino-terreux, métaux de transition, lanthanides etc...). Les métaux de transition regroupent tous les éléments présents dans le bloc *d* du tableau périodique, qui s'étend de la colonne 3 à la colonne 12 (périodes 4 à 7) mais qui n'inclut pas les lanthanides ni les actinides. Les éléments de transition ont tous leur orbitale *s* saturée mais, diffèrent par leur orbitale *d* incomplète. C'est précisément cette orbitale qui, parce qu'elle n'est pas totalement remplie, permet aux métaux de transition de former des complexes avec des ligands non métalliques, comme les chaînes latérales des protéines (Housecroft et Constable, 2006; Pearson, 1966) La formation de ces complexes et les réactions qu'ils catalysent font des métaux de transition des constituants essentiels pour les organismes vivants (Nies, 2007). Bien que le zinc, qui possède une orbitale *d* complète, ne soit pas au sens strict un métal de transition, il partage beaucoup des propriétés bio-inorganiques des métaux de transition et sera considéré comme tel dans la suite de ce manuscrit (Bertini *et al.*, 1994).

1.1.2 Géométrie de coordination

La théorie VSEPR (Valence Shell Electron Pair Repulsion) permet de prédire la géométrie des molécules. Elle est basée sur le fait que les paires d'électrons sont placées le plus loin possible les unes des autres, du fait de leurs charges négatives qui se repoussent (Lewis et Evans, 2006). Le modèle VSEPR est utilisé principalement pour les molécules contenant un atome central du bloc *p*. Kepert a appliqué ce modèle aux molécules ayant un métal du bloc *d* comme atome central. Selon ce modèle, le métal est au centre d'une sphère et les ligands se repoussent de la même manière que les électrons dans la théorie VSEPR. Ils bougent à la surface de cette sphère et le modèle prédit leurs positions relatives en fonction du nombre de ligands présents [Tableau 1.2] (Housecroft et Constable, 2006) .

1.2 Les métaux dans la cellule

Les éléments chimiques essentiels à la vie sont répartis en trois grandes parties : les éléments majoritaires (H, C, N, O, S), les macrominéraux (Na, K, Mg, Ca, Cl...) et les éléments traces dont font partie les métaux de transitions (Fe, Zn, Cu , Mo, Ni, Co, Mn...)(Mertz, 1981).

1.2.1 Rôle des métaux dans la cellule

Bien qu'ils soient utilisés en plus faible quantité que les macrominéraux, les métaux sont essentiels à la vie de tous les organismes. En effet, ce sont ces éléments traces qui confèrent à certaines protéines les propriétés catalytiques et structurales indispensables à leur activité (Mertz, 1981). De nombreuses enzymes agissant dans des processus biologiques fondamentaux comme la

Nombre de ligands	Géométrie de coordinations	Forme
2	Linéaire	
3	Trigonal planaire	
4	Tétraédrique	
	Planaire carrée	
5	Pyramidale carrée	
	Trigonal bipyramidale	
6	Octaédrique	

Tableau 1.2 – Types de géométries de coordination. Pour coordiner quatre ligands, le modèle Kepert favorisera toujours une géométrie tétraédrique au détriment de la géométrie de coordination planaire carrée.

photosynthèse, la respiration et la fixation de l'azote ont des cofacteurs métalliques. Le rôle des ions métalliques dans la catalyse est le plus souvent relié à la stabilisation de charges négatives sur des états de transitions ou des intermédiaires de réaction, à l'activation de substrats grâce à leurs caractéristiques d'acide de Lewis [1] ou à des réactions redox, qui entraînent, dans ce cas, leur association avec des cofacteurs organiques [Figures 1.2.1 et 1.2.2] (Andreini *et al.*, 2008).

Le zinc et le magnésium sont de loin les ions les plus courants parmi les métaux non redox, tandis que le fer est le métal qui prévaut pour les catalyses redox (Andreini *et al.*, 2008). Cependant, d'autres métaux de transition interviennent dans des réactions équivalentes à celles qui impliquent le fer ou le zinc et peuvent parfois les remplacer. Au contraire certaines réactions biologiques requièrent la présence d'un métal très spécifiques qui ne peut être substitué par aucun autre.

Tous les métaux ne sont pas utilisés dans les mêmes proportions dans tous les règnes du vivant. Ainsi, on peut voir sur la figure 1.2.3 que le nickel et le cobalt sont, par exemple, employés par 98% des archeae et 80% des bactéries dont le génome a été séquencé tandis que leur utilisation est plus restreinte chez les eucaryotes (Zhang et Gladyshev, 2009).

1.2.2 Chimie de coordination des métaux en biologie

Les métaux impliqués dans des processus biologiques sont, soit liés directement aux protéines, soit à des cofacteurs (comme les porphyrines ou les cobalamines), soit à des *clusters*, eux-mêmes ligands de protéines. Les principaux atomes ligands des métaux sont l'azote, l'oxygène, le soufre et le carbone (Bertini *et al.*, 1994). Ils peuvent utiliser différentes géométries de coordination.

1. Un acide de Lewis est une entité chimique dont un des atomes possède une lacune électronique qui lui permet d'accepter un doublet d'électron et de créer ainsi une liaison covalente avec une base de Lewis.

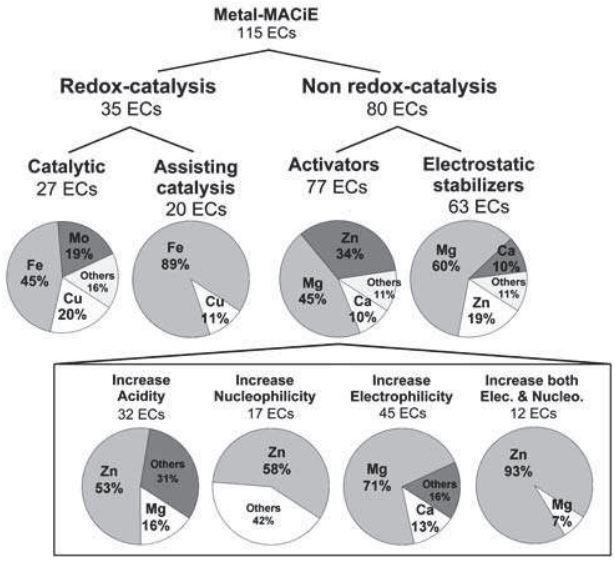


Figure 1.2.1 – Rôle des métaux dans les mécanismes de catalyse enzymatique annotés dans la base de donné Metal-MACiE (Mechanism, Annotation and Classification in Enzymes). Metal-MACiE est une base de donnée des mécanismes de réaction impliquant des métaux (Andreini *et al.*, 2008).

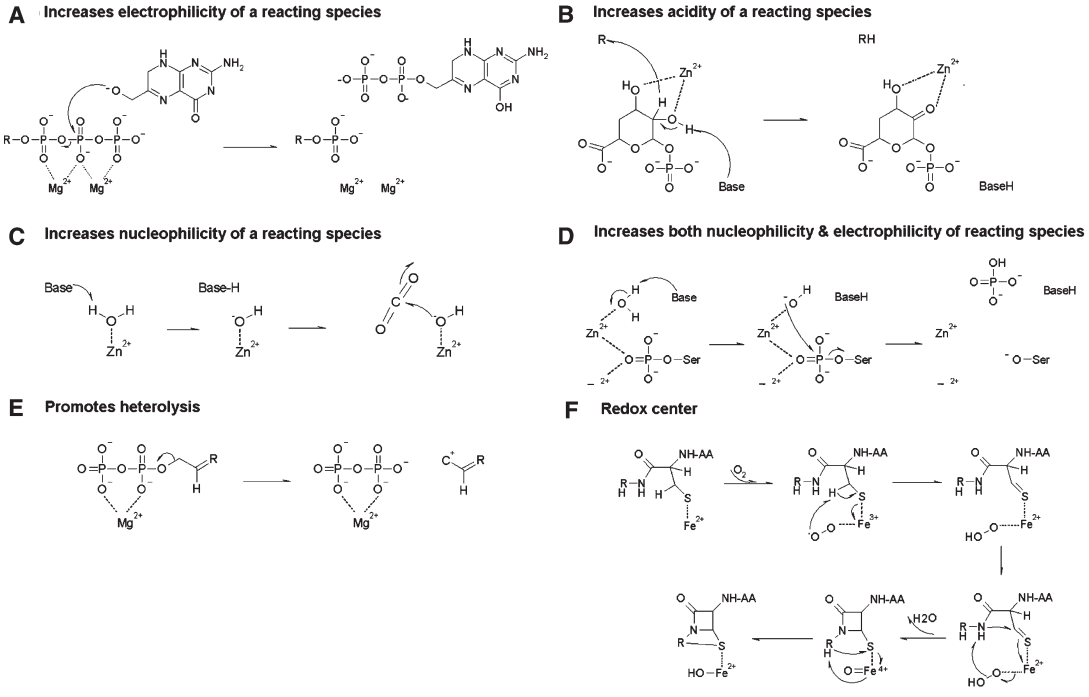


Figure 1.2.2 – Exemples des mécanismes réactionnels dans lesquels sont impliqués les métaux (Andreini *et al.*, 2008).

Nombre de ligands	Géométrie de coordination	Nombre de cas recensés dans la Protein Data Bank			
		Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}
6	Octaédrique	**5**	**5**	**3**	**1**
5	Trigonale bipyramidale	**2**	0	**4**	**6**
	Pyramidale carrée	0	0	0	**1**
4	Tétraédrique	**2**	**4**	**1**	**4**
	Planaire carrée	0	**1**	**3**	**2**
3	Trigonale planaire	0	0	**5**	**1**
2	Linéaire	0	0	**1**	0
Autres		**1**	0	**5**	**1**

Tableau 1.3 – Géométrie de coordination du cobalt, nickel, cuivre et zinc dans les protéines (Rulísek et Vondrásek, 1998).

Nombre de ligands	Géométrie de coordination	Nombre de cas recensés dans la Cambridge Structural Database			
		Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}
≥7		**12**	**7**	**8**	**3**
6		**210**	**415**	**366**	**108**
	dont octaédrique	131	272	214	64
5		**18**	**19**	**499**	**69**
	dont trigonale bipyramidale	0	0	237	18
	dont pyramidale carrée	0	0	19	8
4		**71**	**430**	**523**	**110**
	dont tétraédrique	15	2	0	43
	dont planaire carrée	26	346	388	22
3		**1**	**1**	**4**	**2**
2		**0**	**1**	**0**	**0**

Tableau 1.4 – Géométrie de coordination du cobalt, nickel, cuivre et zinc dans la Cambridge Structural Database (CSD). La CSD regroupe les informations structurales essentielles des molécules organiques et des composés métallo-organiques (Rulísek et Vondrásek, 1998).

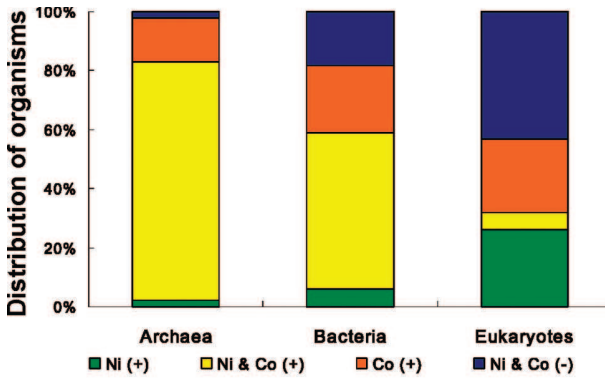


Figure 1.2.3 – Distribution des organismes utilisant le nickel et le cobalt parmi ceux dont le génome a été complètement séquencé. Ils sont classés en quatre groupes : Ni (+), ceux qui n'utilisent que le nickel ; Ni & Co (+), ceux qui utilisent le nickel et le cobalt ; Co(+), ceux qui n'utilisent que le cobalt et Ni & Co (-), ceux qui n'utilisent ni l'un ni l'autre. Code couleur : Ni (+) en vert, Ni & Co (+) en jaune, Co(+) en orange, Ni & Co (-) en bleu (Zhang et Gladyshev, 2009).

Par exemple le nickel et le cobalt adoptent majoritairement des géométries octaédriques dans les protéines (pour chacun, 5 cas recensés sur 10) tandis que le zinc est penta ou tétracoordiné (10 cas sur 13) [Tableau 1.3]. On retrouve la préférence du cobalt pour l'hexacoordination dans une étude des composés métallo-organiques de la Cambridge Structural Database (210 cas sur 247). Dans ces types de complexes, le nickel peut être tétra ou hexacoordiné (845 cas sur 873) tout comme le zinc (218 cas sur 292) [Tableau 1.4]. Bien que ces résultats datent de 1998, il est certain que la nature du métal influe fortement sur le type de coordination qu'il va adopter dans les protéines ou dans les complexes chimiques.

1.2.3 Affinité des métaux pour les protéines

Tout au long de la série des métaux de transition (de Mn^{2+} à Cu^{2+}), la taille des ions diminue, tandis que l'affinité de l'ion métallique pour les électrons augmente (ce qui est inversé pour le zinc). En conséquence, la relative affinité du métal pour les atomes non-métalliques ou les anions, qui peuvent donner ou partager des électrons, augmente. Ainsi la série d'Irving-Williams (Irving et Williams, 1948) classe les métaux en fonction de leur capacité d'interaction avec les ligands (Williams et da Silva, 2006).

$$Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$$

En général, l'affinité des métaux pour les métalloprotéines suit l'ordre défini par cette série. Ainsi, le cuivre et le zinc ont souvent des affinités plus fortes pour la majorité des métalloprotéines que les autres métaux. Ces ions doivent donc être tenus éloignés des sites réservés aux cations de plus faible affinité. Des systèmes de transport et de stockage permettent de maintenir une concentration extrêmement faible de ces ions sous forme libre dans le cytoplasme des cellules (Waldron et Robinson, 2009).

1.2.4 Concentration des métaux dans les cellules

Pour qu'un élément soit utilisé par les cellules, il doit être biodisponible dans le milieu. La composition élémentaire de l'eau de mer sert d'écosystème de référence pour mieux appréhender la disponibilité des différents éléments chimiques dans l'environnement [Tableau 1.5].

Elément	Concentration dans l'eau de mer (Weast, 1984)	Concentration totale[1] mesurée chez *Escherichia coli* (Outten et O'Halloran, 2001)	Concentration minimale inhibitrice[2] chez *E. coli* (Nies, 2007)	Concentration minimale inhibitrice chez *C. metallidurans* CH34 (Mergeay *et al,* 1985)
Sodium	457 mM	236 mM	≥ 50 mM	
Magnésium	55,5 mM	44 mM	≥ 50 mM	
Potassium	9,7 2mM	210 mM	≥ 50 mM	
Calcium	9,98 mM	0,3 mM	≥ 50 mM	
Manganèse	36,4 nM	1,7 µM	20 mM	
Fer	179 nM	180 µM	≥ 50 mM	
Cobalt	4,58 nM	0,5 µM	1 mM	25 mM
Nickel	92,0 nM	5 µM	1 mM	2,5 mM
Cuivre	47,2 nM	18 µM	1 mM	
Zinc	153 nM	270 µM	1 mM	12 mM

[1] La concentration totale représente la somme des ions métalliques libres dans la cellule et des ions liées aux *clusters*/protéines.
[2] Concentration minimale inhibitrice (CMI): la plus faible concentration en métal suffisante pour inhiber *in vitro* la croissance des bactéries

Tableau 1.5 – Biodisponibilité des cations métalliques d'après Nies (2007). Ce tableau présente la concentration des métaux dans l'eau de mer qui sert d'écosystème de référence ainsi que leur concentration totale dans *E. coli.* Ces chiffres sont à comparer avec les concentrations minimales inhibitrices de chaque métaux chez *E. coli* et chez *C. metallidurans* CH34 l'organisme modèle utilisé dans cette thèse et connu pour sa grande résistance aux métaux.

Les éléments trace sont peu biodisponibles, la bactérie doit donc être en mesure de les accumuler à l'intérieur de la cellule grâce à des systèmes d'import [voir section 2.2 page 27 sur l'import des métaux]. Ce transport est finement régulé car : d'une part, l'organisme ne doit acquérir que les cations dont il a besoin et, d'autre part, ces cations essentiels, selon leur nature, ont des effets toxiques lorsqu'ils sont en excès [voir section 1.2.5 page suivante sur la toxicité des métaux]. C'est pour cette dernière raison que les organismes ne survivent pas au delà d'une certaine quantité d'ions métalliques dans l'environnement, appelée concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI pour chaque ion dépend d'un organisme donné. Ainsi, *E. coli* ne se développe pas lorsque les concentrations en nickel, cobalt ou zinc dépasse les 1 mM, tandis que *C. metallidurans* CH34, une bactérie résistante aux métaux lourds peut coloniser des environnements où la concentration de cobalt monte jusqu'à 25 mM [Tableau 1.5]. Cette bactérie contient en effet des moyens de

défense contre les cations plus nombreux et/ou plus efficaces que ceux d'*E. coli* [voir chapitre 4, section 4.1 page 59].

1.2.5 Toxicité des ions métalliques

Les métaux de transition en biologie ont des propriétés ambivalentes. Nous avons décrit leur importance mais, selon les métaux et/ou leur concentration, ils peuvent engendrer une certaine toxicité pour les cellules. On peut les classer en plusieurs catégories en fonction de leur toxicité : les métaux toxiques n'ayant aucun rôle biologique, les métaux qui peuvent être toxiques à fortes concentrations ou les éléments n'ayant pas d'effet toxiques connus [Tableau 1.6]. La base de ces effets toxiques est essentiellement fonction de leur chimie inorganique et bio-inorganique (Hobman *et al.*, 2007).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Unq	Unp	Unh	Uns	Uno	Une	Unn								

Tableau 1.6 – Tableau périodique des métaux et metalloïdes toxiques. Code couleur : cases bleues, les éléments n'ayant pas d'effet toxique ; cases violettes, les éléments qui peuvent être toxiques à forte concentration ; cases rouges, les éléments qui sont toxiques et qui n'ont aucun rôle biologique dans la plupart des organismes. Les lanthanides et les actinides ne sont pas montrés car aucun rôle biologique n'a été décrit pour eux (Summers, 2009).

Les métaux qui ne jouent pas de rôle biologique tel que le mercure, le cadmium, l'arsenic et le plomb sont souvent toxiques car ils rentrent en compétition avec les métaux essentiels. Par exemple, le plomb est capable de se lier à des protéines qui interagissent avec le calcium comme la calmoduline (Godwin, 2001) et, le mercure et le cadmium, qui ont une grande affinité pour les soufres des thiols, peuvent se fixer dans des sites métalliques de protéines contenant des cystéines (Waldron et Robinson, 2009).

Des métaux essentiels vont également engendrer à forte concentration des effet toxiques selon différents mécanismes :

-Des métaux redox comme le fer et le cuivre génèrent, par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss, le radical hydroxyle (HO·) à partir d'espèces oxygénées telles que les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène qui sont produits lors des processus respiratoires cellulaires.

$\text{métal}^{n+} + H_2O_2 \rightarrow \text{métal}^{(n+1)+} + HO^- + HO\cdot$ (Réaction de Fenton)

$\text{métal}^{(n+1)+} + O_2\cdot^- \rightarrow \text{métal}^{n+} + O_2$

$H_2O_2 + O_2\cdot^- \rightarrow O_2 + HO^- + HO\cdot$ (Réaction de Haber-Weiss)

Le radical hydroxyle est très toxique car hautement réactif. Ainsi, il peut causer des cassures de brins d'ADN (Valko *et al.*, 2005) et dégrader les acides gras, ce qui déstabilise les membranes biologiques (Cabiscol *et al.*, 2000). Enfin, il est capable d'oxyder les acides aminés, notamment les chaînes latérales des résidus arginine, cystéine, histidine, lysine et proline et conduire à la fragmentation des protéines ou à la formation de liaisons aspécifiques inter ou intramoléculaires (Stadtman, 1993).

-Les cations métalliques essentiels en excès peuvent aussi interagir avec des protéines dont ils ne sont pas les substrats. Par exemple, il a été montré que dans des protéines qui ont des domaines d'interaction avec le zinc, la présence d'autres ions métalliques en concentration supérieure entraîne le déplacement du zinc de son site habituel ou la formation de complexes mixtes, induisant des effets délétères dans les processus cellulaires (Hartwig, 2001). Un autre exemple explique la toxicité du cobalt à forte concentration par sa faculté à entrer en compétition avec le fer et donc à altérer les voies métaboliques dépendant d'enzymes à fer-soufre en compromettant la biogenèse de ces centres (Ranquet *et al.*, 2007).

1.2.6 Enzymes dépendant du nickel

Les êtres humains n'utilisent pas le nickel et celui-ci est généralement toxique chez les mammifères. Toutefois, c'est un élément trace essentiel chez les champignons et les micro-organismes, ce qui rend les métalloenzymes à nickel attractives pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques (Zhang et Gladyshev, 2009). Dans les enzymes le nickel est, soit sous forme cationique, soit implanté dans des *clusters* multinucléaires pouvant inclure des acides aminés modifiés ou des ligands exogènes (Li et Zamble, 2009). La manière dont ces protéines sont sélectives pour leur métal catalytique n'est pas établie. En revanche nous savons que dans le cas des *clusters,* l'assemblage du métal dans les protéines se fait fréquemment par l'intermédiaire de protéines chaperons comme HypB, HypA et SlyD qui participent à la formation de la [NiFe]-hydrogénase active [section 1.2.6.2] ou comme UreE qui participe à celle de l'uréase [section 1.2.6.1].

1.2.6.1 Uréase

L'uréase fut la première enzyme contenant du nickel à avoir été caractérisée. Elle catalyse l'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniaque (Takishima *et al.*, 1988). Elle est essentielle au métabolisme de l'azote de beaucoup d'organismes et ainsi, participe de façon fondamentale, au cycle globale de l'azote (Carter *et al.*, 2009). C'est également un facteur de virulence chez un certain nombre de micro-organismes pathogènes (Collins et D'Orazio, 1993). Le site actif, qui contient le nickel, est très conservé chez les plantes et les bactéries (Holm *et al.*, 1996). La structure cristallographique de l'uréase révèle un complexe dinucléaire de nickel lié à des histidines, à un aspartate, ainsi qu'à un groupe carboxylate fourni par une lysine carbamylée.

Le site de liaison au métal contient également trois molécules d'eau dont au moins deux sont nécessaires à l'activité catalytique [Figure 1.2.4] (Jabri *et al.*, 1995).

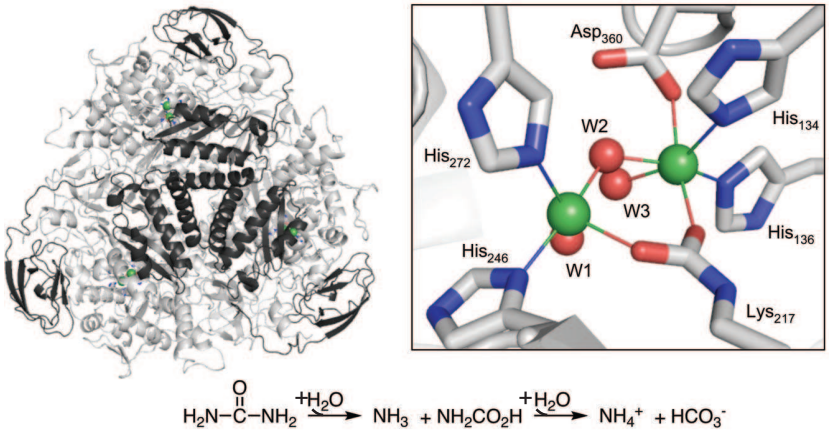


Figure 1.2.4 – Structure de l'uréase de *Klebsiella aerogenes* (à gauche, pdb 1FWJ) et du site actif (à droite). Code couleur : nickel en vert, oxygène en rouge et azote en bleu

1.2.6.2 [NiFe]-Hydrogénase

Les hydrogénases sont des enzymes qui catalysent la formation de l'hydrogène gazeux à partir de protons et d'électrons et/ou la réaction inverse. Ces enzymes sont les composantes centrales du métabolisme énergétique microbien (Fontecilla-Camps, 2009). L'hydrogénase est, par exemple, indispensable à la croissance de *Helicobacter pylori,* un pathogène humain qui utilise l'hydrogène produit par d'autres bactéries présentes dans l'organisme comme source d'énergie (Olson et Maier, 2002). Sur la base du contenu en métal de l'enzyme, trois classes d'hydrogénases ont été définies : la [FeFe]-hydrogénase (Horner *et al.*, 2002), la [NiFe]-hydrogénase (Li *et al.*, 1987) et les hydrogénases qui n'utilisent ni le fer ni le nickel (Vignais et Colbeau, 2004). Les [NiFe]-hydrogénases sont principalement utilisées pour l'oxydation de l'hydrogène. La première structure d'une [NiFe]-hydrogénase a été déterminée en 1995 par l'équipe de Juan Fontecilla-Camps (Volbeda *et al.*, 1995). D'autres homologues ont été caractérisés par la suite dont la structure de la NiFe-hydrogease de *Desulfovibrio fructosovorans* présentée ici (Volbeda *et al.*, 2005). Le site actif, contenant l'ion nickel, est enfoui dans la plus grande des sous-unités de cette protéine hétérodimérique. Le nickel est lié à quatre soufres de quatre cystéines provenant de motifs CXXC. Une des cystéines de chaque motif est également reliée à l'atome de fer [Figure 1.2.5](Vignais et Billoud, 2007).

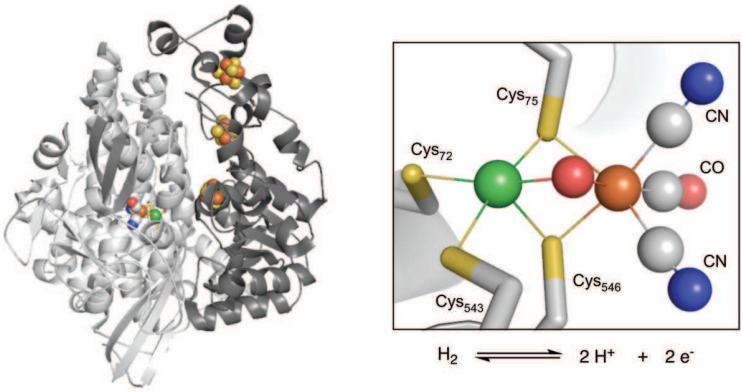


Figure 1.2.5 – Structure de la [NiFe]-hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans* (à gauche, pdb 1YRQ) et du site actif (à droite). La présence et l'identité du ligand qui ponte le nickel et le fer dépend de l'état de l'enzyme. La grande sous-unité est représentée en gris clair et la petite en gris foncé. Code couleur : nickel en vert, fer en orange, oxygène en rouge, azote en bleu et soufre en jaune.

1.2.6.3 Superoxyde Dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène gazeux, afin de protéger la cellule des dégâts liés au stress oxydatif (Cabiscol *et al.*, 2000). Les SOD peuvent utiliser différents métaux, selon les organismes. Les bactéries du sol aérobie de type S*treptomyces* possèdent une SOD à nickel (NiSOD) (Youn *et al.*, 1996). La NiSOD oxydée possède un ion nickel trivalent. Il est coordiné dans une géométrie pyramidale à base carrée par une histidine, deux cystéines et deux atomes d'azote de la chaîne principle localisés dans la partie amino-terminale de la protéine. (Wuerges *et al.*, 2004)[Figure 1.2.6]. La forme réduite contient un ion nickel divalent qui ne lie plus l'azote du noyau imidazole de l'histidine et qui est donc coordinée par une géométrie plan carré (Choudhury *et al.*, 1999).

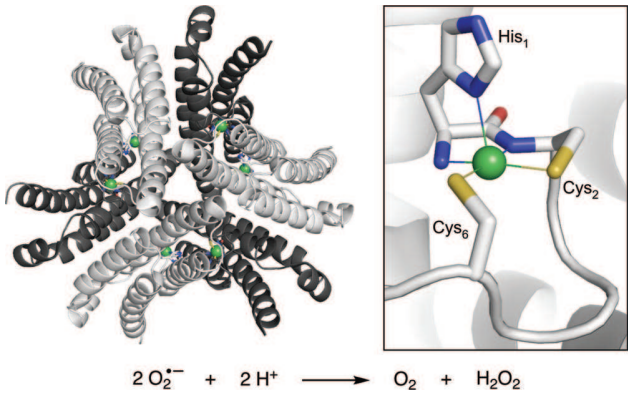


Figure 1.2.6 – Structure de la nickel superoxyde dismutase de *Streptomyces coelicolor* (à gauche, pdb 1T6U) et du site actif (à droite). Code couleur : nickel en vert, oxygène en rouge, azote en bleu et soufre en jaune.

1.2.6.4 Carbone monoxyde déshydrogénase

La carbone monoxyde déshydrogénase (CODH) catalyse la réaction redox qui convertit le monoxyde en dioxyde de carbone. Elle permet ainsi aux organismes qui la produisent d'utiliser le CO comme source de carbone (Drennan *et al.*, 2004). La structure cristalline révèle que les deux sous-unités de la protéine possèdent un total de cinq *clusters* métalliques : trois *clusters* 4Fe-4S et deux *clusters* C qui contiennent en plus du fer et du soufre, un atome de nickel [Figure 1.2.7] (Jeoung et Dobbek, 2007). Les ligands qui pontent le nickel et le fer varient selon les homologues.

Certaines CODH font partie de complexes multi-enzymatiques, où elles sont couplées à l'acétyl-CoA synthase, pour la biosynthèse de l'acétyl-CoA ou à l'acétyl-CoA décarbonylase pour la décarbonylation de l'acétyl-CoA (Lindahl, 2002). Ces réactions chimiques s'effectuent dans le *cluster* A, un centre 4Fe-4S relié à un site métallique binucléaire par l'intermédiaire d'une cystéine (Darnault *et al.*, 2003). Dans ce complexe binucléaire, le métal distal est toujours un ion nickel lié par une géométrie carrée à deux azotes de la chaîne principale et à deux soufres de cystéines. Ces derniers coordinent également le métal proximal qui peut être, selon les organismes, du cuivre, du zinc ou du nickel [Figure 1.2.7] (Darnault *et al.*, 2003).

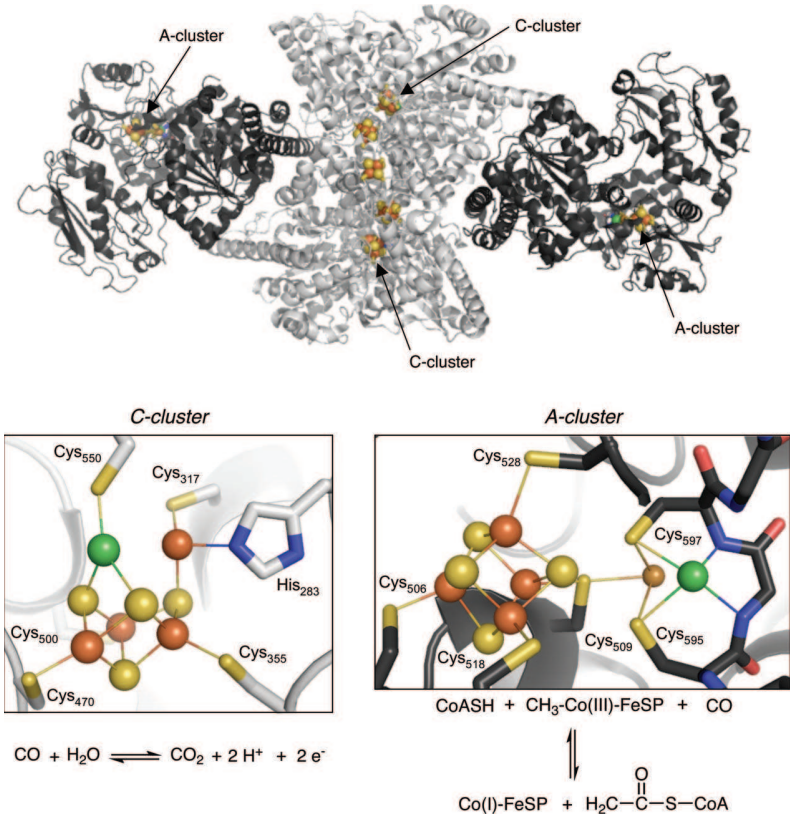


Figure 1.2.7 – Structure de la carbone monoxyde déshydrogénase/acétyl-CoA synthase de *Moorella thermoacetica* (en haut, pdb 2Z8Y), du *cluster* C (en bas à gauche) et du *cluster* A (en bas à droite). Les deux sous-unités de la CODH sont en gris clair, les deux sous-unités de l'acétyl-CoA synthase sont en gris foncé. Code couleur : nickel en vert, fer en orange, oxygène en rouge, azote en bleu et soufre en jaune.

1.2.6.5 Méthyl-CoM Réductase

La Méthyl-CoM Réductase est la dernière enzyme de la biosynthèse du méthane chez certaines archées (Shima et Thauer, 2005). Elle catalyse la réduction du méthyl-coenzyme M, avec l'aide du coenzyme B, en méthane et en CoM-CoB. Le nickel se trouve dans le cofacteur tétrapyrrole F430, lui-même enfoui dans la méthyl-coenzyme M réductase. Le nickel est coordiné par 6 ligands dans une géométrie octaédrique : 4 atomes d'azotes du cofacteur F430 dans le plan carré et en axial un oxygène d'une glutamine de l'enzyme ainsi qu'un soufre provenant du coenzyme M [Figure 1.2.9] (Ermler *et al.*, 1997).

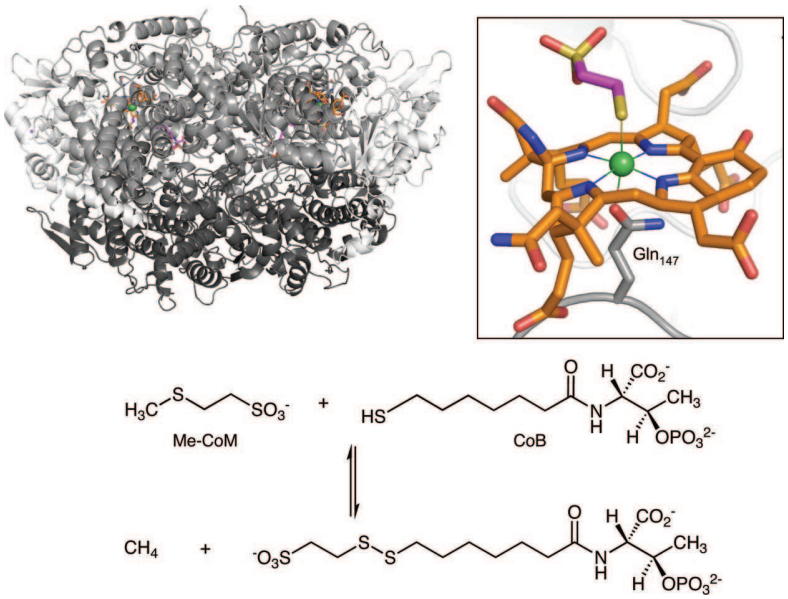


Figure 1.2.8 – Structure de la méthyl-coenzyme M réductase de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (à gauche, pdb 1MRO), et du cofacteur tétrapyrrole représenté en orange (à droite). Code couleur : nickel en vert, oxygène en rouge, azote en bleu et soufre en jaune.

1.2.6.6 Glyoxalase I

La glyoxalase I (GlxI) est une enzyme cytosolique qui contribue à la détoxication du méthylglyoxal et d'autre α-cétoaldéhydes. Ces molécules sont toxiques car, produites pendant différentes étapes du métabolisme, elles entraînent la formation de liaisons entre certains acides aminés et le glucose conduisant à des structures de protéines endommagées. (Thornalley, 2003). Le nickel est coordiné dans l'enzyme par 6 ligands dans une géométrie octaédrique : 2 atomes d'azote de 2 histidines et 4 atomes d'oxygène provenant de 2 glutamates et de 2 molécules d'eau (He *et al.*, 2000).

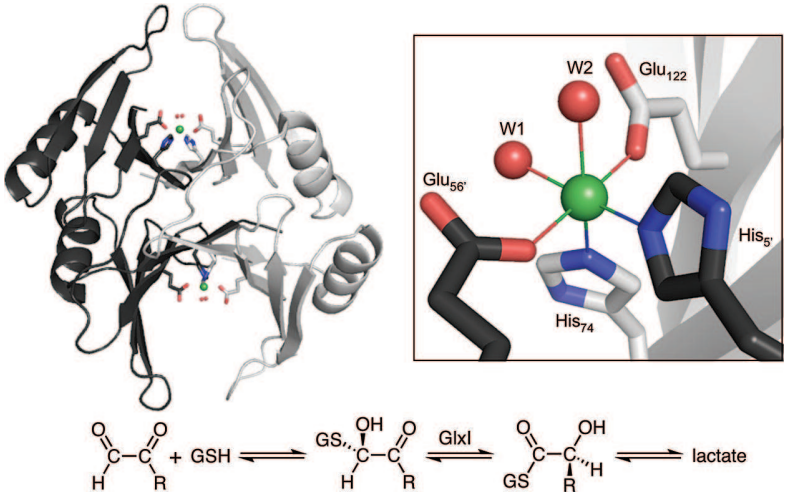


Figure 1.2.9 – Structure de la glyoxalase I de *E. coli* (à gauche, pdb 1F9Z) et du site actif (à droite). Code couleur : nickel en vert, oxygène en rouge et azote en bleu.

1.2.7 Enzymes dépendant du cobalt

Le cobalt est un métal rare en comparaison des autres éléments traces. Sa concentration est de 4,53 nM dans l'eau de mer, l'écosystème de référence [Figure 1.5]. Ce cation métallique est présent dans 1% des protéines dont on connait la structure, il est donc moins fréquent que d'autres métaux de transition comme le manganèse, le fer ou le zinc que l'on trouve respectivement dans 6, 8 et 9% des protéines (Andreini *et al.*, 2008). Il est néanmoins un cofacteur essentiel des enzymes dépendant de la vitamine B_{12} où il est coordiné par un macrocycle corrine. La déficience en vitamine B_{12} peut causer d'importantes maladies, telle que l'anémie pernicieuse chez les humains (Bertini *et al.*, 1994). Le cobalt, sous forme non-corrine, est également de plus en plus étudié, en chimie bio-inorganique comme en biotechnologie car sa polyvalence et son faible coût en font un catalyseur hors pair pour les industries chimiques (Kobayashi et Shimizu, 1999).

1.2.7.1 Vitamine B_{12}

Le terme vitamine B_{12} est généralement utilisé pour décrire les composés du groupe des cobalamines. Il existe plusieurs formes de vitamine B_{12} : les formes naturelles qui comprennent l'adenosylcobalamine (AdoCbl, ou coenzyme B_{12}), la méthylcobalamine (MeCbl), l'hydroxocobalamine et la forme produite par les industries, la cyanocobalamine (CNCbl ou vitamine B_{12}) [Figure 1.2.10](Martens *et al.*, 2002).

Le coenzyme B_{12} et le MeCbl sont les seuls dérivés qui ont une fonction physiologique. Le coenzyme B_{12} participe le plus souvent à des réactions qui permettent l'échange d'un atome d'hydrogène entre deux carbones adjacents (Figure 1.2.11) (Bertini *et al.*, 1994). Le coenzyme B_{12} a une masse moléculaire de 1580 Da et son centre est composé d'un anneau corrine plan composé par quatre unités pyrrole. Le Co(III) est coordiné par une géométrie octaédrique à quatre atomes d'azote de l'anneau corrine ainsi qu'à un azote axial donné par le 5,6-diméthylbenzimidazole.

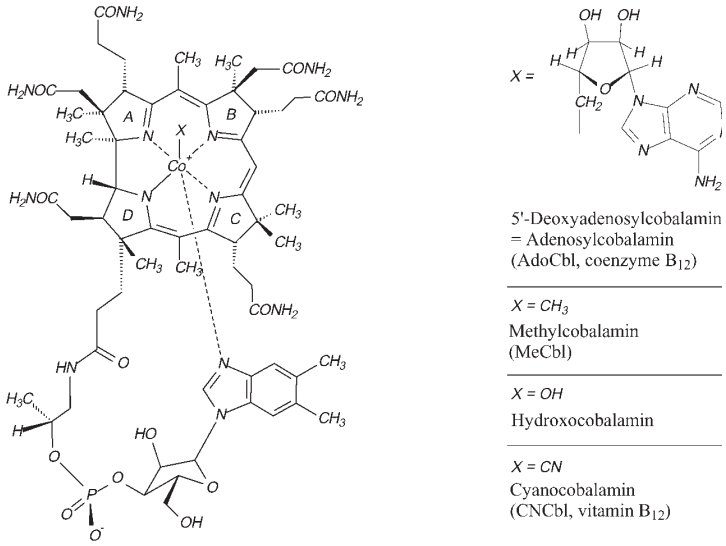


Figure 1.2.10 – Structure de la vitamine B_{12} et ses dérivés (Martens *et al.*, 2002).

L'identité du sixième ligand (X sur la figure 1.2.10) dépend du composé : pour le coenzyme B_{12} la coordination octaédrique est complétée par le carbone 5' de la 5'desoxyadenosyl. Ce lien C-Co correspond à la première liaison métal-carbone décrite dans les molécules biologiques (Martens *et al.*, 2002).

Dans les conditions physiologiques, les dérivés B_{12} existent dans trois états d'oxydation différents Co(III), Co(II), Co(I) et le nombre des coordinations axiales du cobalt dépend de son état d'oxydation. Ainsi deux ligands axiaux sont liés au centre Co(III), un seul au Co(II) et aucun au Co(I). Les réactions de transfert d'électron impliquant le coenzyme B_{12} sont donc accompagnées de changements dans le nombre des ligands axiaux du cobalt (Kräutler, 2005).

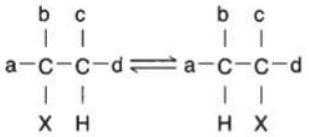


Figure 1.2.11 – Réaction enzymatique catalysée avec l'aide du coenzyme B_{12}.

1.2.7.2 Protéines à cobalt non-corrine

Plusieurs protéines contenant du cobalt sous forme non-corrine ont été isolées (Kobayashi et Shimizu, 1999) et sont listées dans le tableau 1.7. Aucune de ces enzymes n'est toutefois strictement spécifique pour le cobalt et chacune peut utiliser d'autres métaux tels que le fer, le manganèse ou le zinc (Zhang et Gladyshev, 2009). Dans cette partie je ne m'étendrai que sur les quatre enzymes dont des structures de forme métallée par du cobalt ont été déterminées.

Enzyme ou protéine	Source	Contenu du cofacteur	Rôle postulé pour le cobalt	Références
Méthionine amino-peptidase	Animaux, levures, bactéries	2 Co par sous-unité	Hydrolyse	(Kobayashi et Shimizu, 1999)
Nitrile hydratase	Bactéries	1 Co dans chaque sous-unité α	Activation d'H_20, Hydratation de la triple liaison CN et repliement de protéine	
Prolidase	Archaes	1-2 Co par sous-unité	Hydrolyse	
Glucose isomérase	Bactéries	1 Co pour 4 sous-unité	Isomérisation	
Méthylmalonyl-CoA carboxytransférase	Bactéries	1 Co, 1 Zn par sous-unité	Transfert de groupe carboxyl	
Lysine-2,3-aminomutase	Bactéries	0,5-1 Co par sous-unité	Isomérisation	
Bromoperoxydase	Bactéries	0,35 Co par sous-unité	Bromination	
Protéines contenant du cobalt sous forme porphyrine	Bactéries	1 porphyrine à cobalt par protéine	Transport d'électrons	
Transporteur de cobalt	Bactéries et levures		Transport du cobalt	
Nucléotidase	Bactéries	?	Hydrolyse	(Mura et al., 2003) (Proudfoot et al., 2004)
Xylose isomérase	Bactéries	2 Co par monomère	Isomérisation	(Callens et al., 1998) (Zhu et al., 2000)
Phosphotriestérase de type lactonase	Archaes	1 Co par protéine	Hydrolyse	(Elias et al., 2008)

Tableau 1.7 – Protéines à cobalt présentes dans les bactéries et archeae d'après Kobayashi et Shimizu (1999).

Méthionine aminopeptidase : La méthionine aminopeptidase clive la méthionine amino-terminale des chaînes polypeptidiques chez les organismes procaryotes et les eucaryotes. Son site actif, situés entre les brins β antiparallèles, est composé par un centre binucléaire de Co(II) coordiné par un atome d'azote d'un résidu histidine et 4 atomes d'oxygène provenant de 2 résidus glutamine et 2 résidus aspartate [Figure1.2.12] (Roderick et Matthews, 1993).

Nitrile hydratase : La nitrile hydratase (NHase) est une enzyme impliquée dans le métabolisme de composés toxiques, qui catalyse l'hydratation du nitrile en amide. Cette enzyme est utilisée industriellement pour la production d'acrylamide et de nicotinamide à partir des nitriles correspondants. La NHase est une métalloenzyme qui contient du fer ou du cobalt comme centre catalytique (Kobayashi et Shimizu, 1999). Les NHases de type cobalt contiennent un ion cobalt (III) avec six coordinations (Brennan *et al.*, 1996). La structure montre que le cobalt est hexa-coordiné par 3 atomes de soufre de 3 cystéines, un oxygène d'une molécule d'eau et deux azotes provenant d'amides de la chaîne principale. Deux des cystéines sont post-traductionnellement modifiées en acide cystéino-sulfinique et en acide cystéino-sulfénique (Miyanaga *et al.*, 2001).

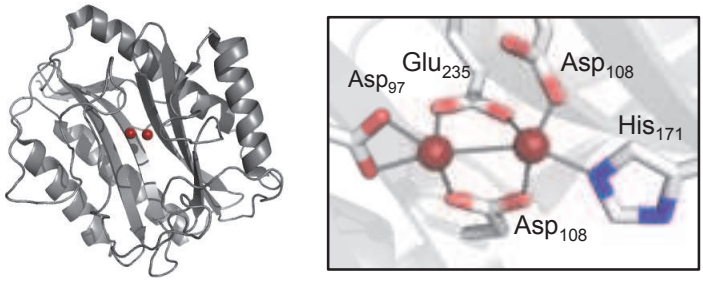


Figure 1.2.12 – Structure de la méthionine aminopeptidase de *E. coli* (à gauche, pdb 1MAT) et du site actif binucléaire (à droite). Code couleur : cobalt en rouge foncé, oxygène en rouge clair et azote en bleu.

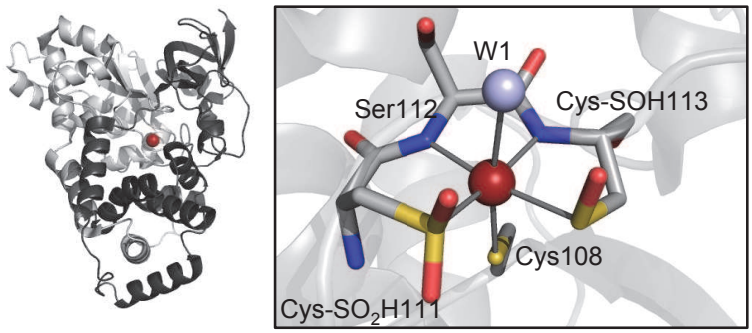


Figure 1.2.13 – Structure de la nitrile hydratase de *Pseudonocardia thermophila* (à gauche, pdb 1IRE) et du site actif (à droite). Code couleur : cobalt en rouge foncé, oxygène en rouge clair, azote en bleu et soufre en jaune.

Xylose isomérase : La xylose isomérase (XyI) intervient chez un grand nombre de bactéries pour catalyser l'isomérisation du D-xylose en D-xylulose *in vivo*. On se réfère souvent à cette enzyme en tant que glucose isomérase car elle est employée en industrie pour sa capacité à isomériser le D-glucose en D-fructose. Cette propriété est utilisée pour la production d'isoglucose, un sucre fabriqué à base de maïs et très utilisé aux États-Unis (Zhu *et al.*, 2000). Il a été montré que l'ajout d'un équivalent de Co^{2+} améliorait la stabilité structurale de cette protéine chez certaines espèces et que l'addition d'un second équivalent était nécessaire à son activité (Callens *et al.*, 1988a). La structure de la XyI de *Streptomyces diastaticus* n°7 souche 1033 présente un site actif contenant deux ions cobalt pontés par un résidu glutamate. Le premier cation recrute, en plus, dans une géométrie tétraédrique 3 atomes d'oxygène provenant d'un autre glutamate et de 2 aspartates. Le deuxième atome de cobalt coordine, en plus du glutamate, 3 oxygènes de 3 aspartates, un atome d'azote provenant d'une histidine et une molécule d'eau dans une géométrie octaédrique (Zhu *et al.*, 2000).

Phosphotriestérase de type lactonase : Les phosphotriestérases (PTE) sont des enzymes catalysant l'hydrolyse d'un large panel de composés avec différentes propriétés chimiques. Leur

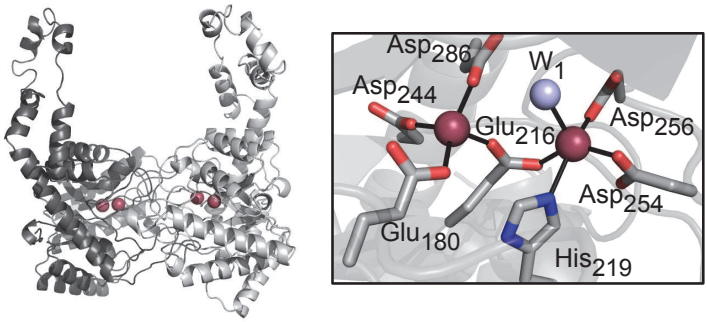


Figure 1.2.14 – Structure de la xylose isomérase de *Streptomyces diastaticus* n°7 souche 1033 (à gauche, pdb 1QT1) et du site actif (à droite). Code couleur : cobalt en rouge foncé, oxygène en rouge clair et azote en bleu.

activité dépend de la présence de cations métalliques et, le cobalt est l'ion qui est nécessaire pour une activité maximale (Elias *et al.*, 2008). La phosphotriestérase de l'archée *Sulfobus Solfatanicus* (*Sso*Pox), dont la structure a été résolue, présente également une activité lactonase qui a incité les auteurs à créer une nouvelle famille d'enzymes appelée les phosphotriesterase de type lactonase (PLL). Le site actif montre un atome de fer et un atome de cobalt liés par une molécule d'eau et par une lysine carboxylée. En plus de ces atomes, le fer est coordiné dans une géométrie trigonale bipyramidale par deux histidines, un aspartate et une lysine, tandis que l'ion cobalt est lié à deux histidines et une molécule d'eau (Elias *et al.*, 2008).

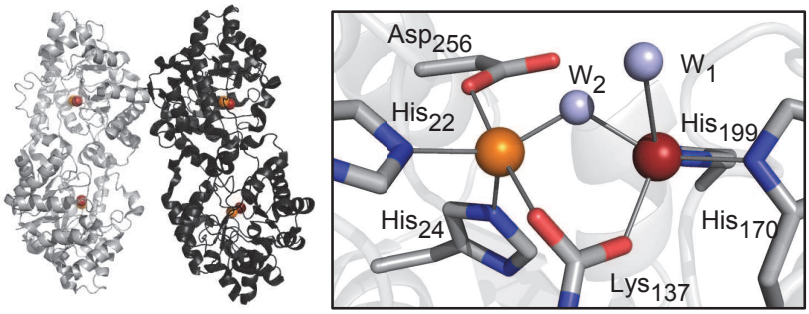


Figure 1.2.15 – Structure de la phosphotriestérase *Sso* Pox (à gauche, pdb 1QT1) et du site actif (à droite). Code couleur : cobalt en rouge foncé, fer en orange, oxygène en rouge clair et azote en bleu.

1.2.7.3 Utilisation du cobalt en chimie bio-inorganique

Le cobalt est souvent utilisé pour substituer le zinc dans les protéines à zinc car les deux ions ont une taille identique et les dérivés à cobalt ont des caractéristiques spectrales bien plus informatives que celle du zinc (Bertini *et al.*, 1994).

Chapitre 2

Homéostasie des métaux lourds

2.1 Qu'est-ce que l'homéostasie des métaux lourds ?

Les ions métalliques sont la cause d'un stress pour la cellule si la concentration d'un ion en particulier est insuffisante, si elle est excessive, ou si un ion toxique est présent dans le cytoplasme. De ce fait, la gamme de concentration intracellulaire idéale pour chaque métal est étroite entre les situations de carence et d'excès qui sont toutes deux nuisibles pour l'organisme (Bertini *et al.*, 1994). Pour fournir les ions nécessaires aux métalloprotéines tout en se protégeant de leurs effets toxiques, les organismes vivants doivent être en mesure de contrôler l'import et/ou d'export les métaux et leur stockage dans le cytoplasme (Hobman *et al.*, 2007). L'homéostasie des métaux regroupe les mécanismes qui permettent aux cellules, d'une part, d'équilibrer les processus d'import et d'export des ions afin de les contenir dans une gamme de concentration viable quelque soit l'environnement et, d'autre part, de réguler les autres stratégies de défense contre leur toxicité potentielle.

2.2 Import des ions métalliques

Pour entrer dans le cytoplasme les métaux doivent traverser la (ou les) membranes cellulaires. Ces membranes ne sont perméables qu'à de petites molécules hydrophobes et empêchent donc les cations métalliques d'entrer de manière passive dans la cellule. Les bactéries utilisent deux types de systèmes pour importer les cations dans le cytoplasme et satisfaire leurs besoins : des systèmes de diffusion passive facilitée non spécifiques, produits de manière constitutifs ou des systèmes de diffusion active très spécifiques non constitutifs et utilisant l'ATP comme source d'énergie (pour revue : Hobman *et al.* 2007).

2.2.1 Import dans le périplasme du nickel et du cobalt

Chez les protéobactéries comme *E. coli* ou *C. metallidurans* CH34, avant d'entrer dans le cytoplasme, les ions métalliques doivent traverser la membrane externe et le périplasme pour atteindre la membrane cytoplasmique.

L'import par diffusion facilitée des cations métalliques dans le périplasme s'effectue par l'intermédiaire de protéines appelées porines (Nikaido et Vaara, 1985). Chez *E. coli,* les porines majoritaires sont PhoE, OmpC et OmpF. Cette dernière est la protéine la plus abondante de la membrane externe (Stenberg *et al.*, 2005). De plus, les protéines OmpC et OmpF transportent plus de cations que d'anions, ce qui suppose leur rôle dans l'approvisionnement du périplasme en ions métalliques (Nies, 2007).

Afin de satisfaire ses besoins en métaux, la bactérie doit être en mesure de concentrer efficacement les ions métalliques dans le cytosol par l'utilisation de systèmes d'import actifs (Outten et O'Halloran, 2001). Il n'y a pas de source d'énergie dans la membrane externe car aucune des protéines présentes ne peut hydrolyser l'ATP et, aucun gradient de protons ne peut être établi à travers la membrane externe. Toutefois, il existe des transporteurs actifs, appelés transporteurs couplés à la protéine Ton-B ou TBDT (*TonB-Dependent Transporter*) qui utilisent une source d'energie différente. En interaction avec le complexe protéique TonB/ExbB/ExbD qui exploite la force proton-motrice de la membrane cytoplasmique, ces transporteurs vont utiliser l'énergie ainsi créée pour le transport de leurs substrats à travers la membrane externe [Figure 2.2.1] (Schauer *et al.*, 2008).

Ces transports actifs, de forte spécificité et affinité, permettent ainsi l'import du cobalt sous forme de vitamine B_{12} par l'intermédiaire du récepteur BtuB chez *E. coli* (Chimento *et al.*, 2003) et, du nickel par le récepteur FrpB4 chez *Helicobacter pylori* (Schauer *et al.*, 2007). Des homologues de FrpB4, absent chez *E. coli,* ont été retrouvés chez d'autres bactéries et constitueraient une voie d'entrée importante des ions nickel dans le cytoplasme.

Il semblerait que le nickel, comme le cobalt, soit importé sous forme d'un complexe avec un ou plusieurs ligands (Schauer *et al.*, 2008).

2.2.2 Import dans le cytoplasme des ions nickel et cobalt :

Plusieurs types de systèmes permettent l'import des ions nickel et cobalt dans le cytoplasme.

2.2.2.1 Les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) :

Le nombre de transporteurs ABC est très différent selon les espèces. Les organismes comme *E. coli* qui doivent s'adapter à des environnements très différents, possèdent un grand nombre de transporteurs ABC (soixante-dix sont codés par le chromosome d'*E. coli*). Les nombreux rôles physiologiques qu'ils jouent reflètent bien la diversité de substrats qu'ils peuvent importer ou

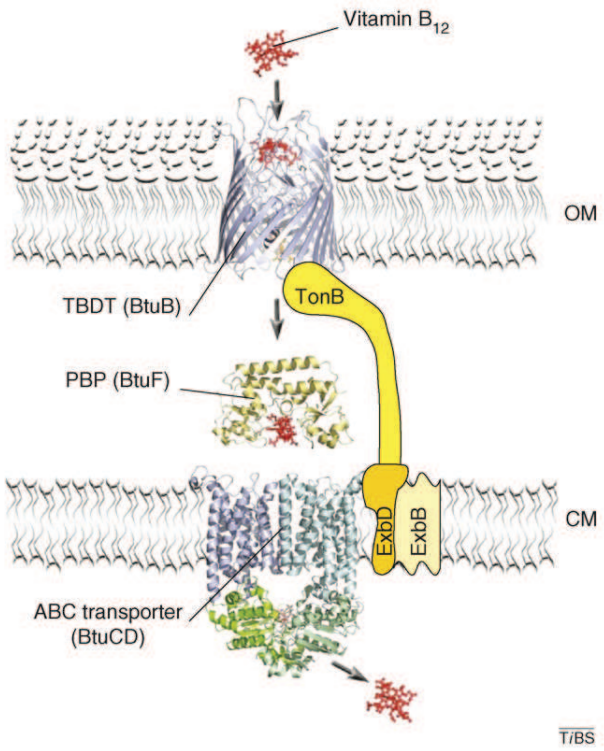


Figure 2.2.1 – Modèle de l'import de la vitamine B_{12}. La vitamine B_{12} (en rouge) se lie de manière spécifique à BtuB, un transporteur TBDT. Le complexe TonB-ExbB-ExbD (en jaune) exploite ensuite la force proton-motrice pour induire des changements conformationels sur BtuB. Cela permet le relargage de la vitamine B_{12} dans le périplasme. Elle est ensuite capturée par la protéine chaperone BtuF qui la transmet au transporteur BtuCD (Schauer *et al.*, 2008).

exporter (nutriments, toxines, antibiotiques, polysaccharides). Le mécanisme de transport des molécules est dépendant de l'hydrolyse de l'ATP qui induit les changements de conformation nécessaires au relargage du substrat dans le périplasme (Higgins, 2001).

Chez *E. coli,* le nickel est importé par le transporteur ABC NikABCDE. Il est formé par deux ATPases cytoplasmiques NikD et NikE, deux protéines transmembranaires NikB et NikC et une protéine périplasmique NikA qui délivre le nickel aux pores NikBC (Navarro *et al.*, 1993). NikA est la protéine la mieux caractérisée de ce système. Contrairement aux enzymes à nickel décrites dans l'introduction qui lient directement le nickel [Voir section 1.2.6 page 17], NikA coordine le cation par l'intermédiaire d'un métallophore (Cherrier *et al.*, 2005). Sa nature n'est toujours pas connue car, si la structure suggère que le nickel soit coordiné par 3 atomes d'oxygène d'un butane-1,2,4-tricarboxylate, aucune donnée physiologique ne le prouve jusqu'à présent (Cherrier *et al.*, 2008). Le seul contact de la protéine avec le nickel se fait par l'intermédiaire d'un azote provenant d'un résidu histidine qui complète la géométrie planaire carrée [Figure 2.2.2] (Cavazza *et al.*, 2011). Ces résultats sont en accord avec le fait que la protéine FrpB4 (voir 2.2.1) ne puisse importer le nickel que sous une forme complexée (Schauer *et al.*, 2008).

D'autres micro-organismes possèdent des transporteurs ABC similaires au système *nik* de *E. coli* : les opérons *cbi/nikMNOPQ* interviennent dans l'import de cobalt et/ou de nickel, et sont

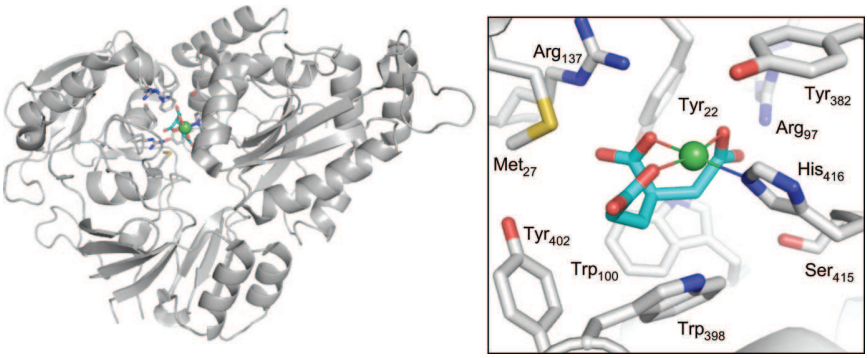


Figure 2.2.2 – Structure de la protéine NikA de *E. coli* (à gauche, pdb 3DP8) et du site de liaison du nickel (à droite). La protéine contient un ion nickel lié à une histidine de la protéine et à un ligand organique qui est modélisé par le butane 1,2-tricarboxylate en cyan d'après Li et Zamble (2009). Code couleur : nickel en vert, oxygène en rouge, azote en bleu et soufre en jaune.

situés respectivement près des gènes de synthèse de la vitamine B_{12} ou de l'uréase (Rodionov *et al.*, 2006). Contrairement au système NikABCDE, aucun gène correspondant à une protéine périplasmique de type NikA n'a été identifié et, il a été montré qu'effectivement aucun homologue de NikA n'est nécessaire pour un transport actif des métaux à travers la membrane. On peut ainsi penser que le mécanisme d'import pourrait être différent dans ces deux systèmes (Rodionov *et al.*, 2006).

2.2.2.2 Les perméases NiCoT :

Les transporteurs NiCoT sont des perméases composées d'une seule protéine qui importe le nickel et le cobalt à travers la membrane cytoplasmique des cellules.(Eitinger *et al.*, 2005).

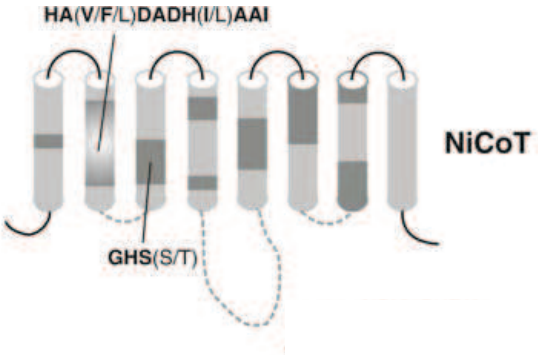


Figure 2.2.3 – Topologie du transporteur NiCoT. Les segments conservés des NiCoT sont en gris foncé. Les lignes en pointillés indiquent les séquences conservées des boucles cytoplasmiques. Le motif présent dans la seconde hélice transmembranaire (séquence HX_4D) est considéré comme la marque de ces transporteurs. Un autre motif est conservé dans la troisième hélice transmembranaire. Les séquences en gras indiquent de fortes conservations (Eitinger *et al.*, 2005).

Ces perméases incluent les protéines HoxN de *Cupriavidus necator* H16 (Eitinger et Friedrich, 1991) et NixA de *Helicobacter pylori* (Mobley *et al.*, 1995). Ce sont des protéines membranaires avec huit hélices transmembranaires dont la structure et l'état d'oligomérisation demeurent inconnus [Figure 2.2.3](Eitinger *et al.*, 2005). Elles ont une affinité pour leur substrat de l'ordre du nanomolaire. La famille des perméases NiCoT est divisée en sous-groupes selon les degrés de préférence des protéines pour les ions nickel ou cobalt (Eitinger *et al.*, 2005). Si la spécificité de chaque transporteur pour le nickel et pour le cobalt est corrélée à la localisation du gène qui le code dans le génome (par exemple, un transporteur sera plus spécifique pour le nickel si son gène est proche de séquences codant pour des enzymes à nickel), le mécanisme de la discrimination entre les 2 cations reste inconnu (Rodionov *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2009a). La manière avec laquelle les protéines de la famille NiCoT transporte préférentiellement le Co(II) et le Ni(II) par rapport aux ions divalents Zn(II) et Cu(II) reste également obscure. Il est possible que les ions nickel et cobalt soient pris en charge par ces transporteurs sous forme de métallophores plutôt que des ions libres(Ma *et al.*, 2009b).

2.2.2.3 Les transporteurs d'ions divalents CorA :

CorA est une famille de transporteurs de cations divalents connue principalement pour transporter le Mg^{2+} et qui est présente chez la plupart des bactéries et des archaea (Kehres et Maguire, 2002).

Des études biochimiques sur la protéine CorA de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Methanococcus jannaschii* et *Haemophilus influenza* ont montré qu'elle était capable de transporter le Mg^{2+}, le Co^{2+} et le Ni^{2+} avec des constantes d'affinités respectives de 15-20, 20-40 et 200-400μM (Snavely *et al.*, 1989). CorA n'est donc pas très sélective pour le magnésium par rapport au cobalt. Toutefois, le cobalt est un élément trace ([Cobalt] = 4,53 nM dans l'eau de mer, tableau 1.5) tandis que le magnésium est un macrominéral ([Magnésium] = 55,5 mM, tableau 1.5). La concentration du cobalt dans des conditions physiologiques est donc trop faible pour qu'il soit transporté par CorA.

Seule CorA de *Thermotoga maritima* (*Tm*CorA) est capable de sélectionner le cobalt par rapport au magnésium comme l'a montré une étude sur la capacité de transport de *Tm*CorA en présence de différents cations divalents (Xia *et al.*, 2011). Les bases moléculaires de cette sélectivité restent inconnues bien que la structure de la protéine métallée ait été déterminée. *Tm*CorA est une protéine pentamérique en forme d'entonnoir, dont chaque protomère contient deux hélices transmembranaires. L'anneau formé par ces hélices crée une cavité interne par laquelle passent les ions [Figure 2.2.4]. Deux sites de liaison aux métaux pouvant être peuplés par du Co^{2+} ou du Mg^{2+}ont été caractérisés. Les cations ne sont pas directement coordinés par des ligands protéiques mais par des molécules d'eau ; il est probable que les ions passent à travers

le tunnel de manière totalement hydratée. Le mécanisme moléculaire exact du transport des ions à travers CorA n'est toujours pas connu (Eshaghi *et al.*, 2006).

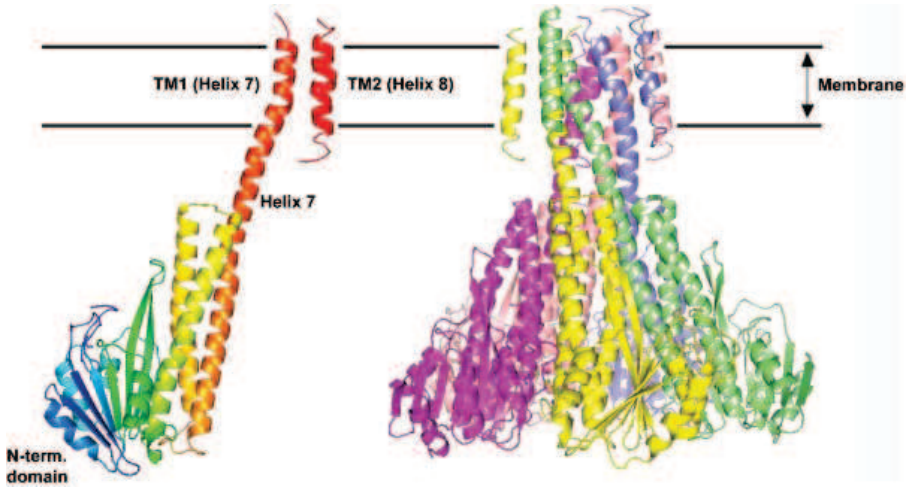


Figure 2.2.4 – Structure cristallographique d'un monomère de *Tm*CorA à gauche et du pentamère à droite (pdb 2IUB) (Eshaghi *et al.*, 2006).

2.3 Efflux des métaux

Afin d'agir sur l'homéostasie des métaux, toutes les cellules ont besoin d'une machinerie de transport pour exporter les métaux essentiels en trop forte concentration et les métaux toxiques (Ma *et al.*, 2009b). Plusieurs systèmes d'export ont été prédits ou démontrés comme étant impliqués dans le transport du nickel et/ou du cobalt hors du cytoplasme (Nies, 2003) ou même du périplasme (pour revue : introduction de Grass *et al.*, 2005), mais ce ne sont pas des transporteurs spécifiques de ces métaux dans la plupart des cas.

2.3.1 Systèmes d'efflux de la membrane cytoplasmique

2.3.1.1 Les ATPases de type P_{1B}

La superfamille des ATPases de type P est présente dans tous les règnes du vivant et se découpe en différents groupes selon les molécules transportées (Nies, 2003). Les ATPases de type P_{1B} constituent un sous-groupe dédié au transport des métaux de transitions à travers les membranes biologiques (pour revue : Argüello *et al.*, 2007). Elles sont composées de six ou huit domaines transmembranaires, d'une boucle A (Actionneur), et de deux domaines de liaison à l'ATP (N et P) [Figure 2.3.1]. La séquence CPC portée par l'hélice transmembranaire 6 est la signature de ce type de protéines et définit une partie du site de liaison au métal transmembranaire.

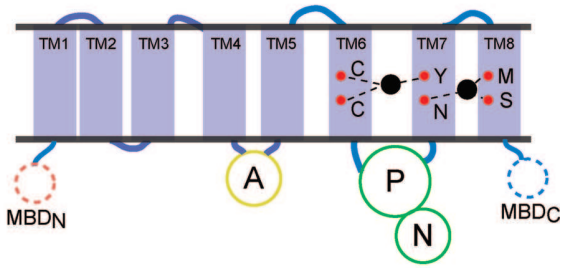


Figure 2.3.1 – Représentation schématique de la topologie d'un transporteur ATPase de type P_{1B}. TM : hélices transmembranaires ; MBD : domaine cytoplasmique de liaison au métal, situé du coté amino-terminal (N) et situé du coté carboxy-terminal (C) ; A : domaine actionneur ; P : domaine de phosphorylation ; N : domaine de liaison au nucléotide. Les sphères rouges signalent les résidus importants pour le transport du Cu(I) dans la protéine CopA de *Archaeoglobus fulgidus* et les sphères noires aux ions métalliques liés dans les sites de liaison des hélices transmembranaires (Ma *et al.*, 2009b).

Le mécanisme catalytique est semblable à celui des ATPases de type P. Il est initié par la phosphorylation d'un aspartate sur la séquence conservée DKTG, localisée sur la boucle entre l'hélice 6 et l'hélice 7, qui induit le changement de conformation nécessaire au passage du substrat de l'autre coté de la membrane.

Par des études spectroscopiques, il a été montré que l'ATPases de type P_{1B} CopA de *Archaeoglobus fulgidus* (*Af*CopA), spécifique du cuivre, lie deux équivalents de Cu(I) sur deux sites transmembranaires. Chaque site adopte une géométrie planaire trigonale : l'un est coordiné par les deux cystéines du motif CPC présents sur la sixième hélice transmembranaire (TM6) et par un résidu tyrosine de TM7, tandis que le second est lié par un résidu asparagine, une méthionine et une sérine conservées et situées entre TM6 et TM7 (González-Guerrero *et al.*, 2008). En plus de ces deux sites transmembranaires, *Af*CopA possède également deux domaines cytoplasmiques de liaison au métal (MBD pour Metal Binding Domain) localisés dans les parties amino-terminales et carboxy-terminales de la protéine (Wu *et al.*, 2008). Les MBD sont des domaines qui présentent un motif de six éléments de structure secondaire avec un enchaînement βαββαβ qui est la signature caractéristique d'un repliement de type ferrédoxine, une protéine fer-soufre.

Les MBD sont proches structuralement des chaperons à Cu(I) comme CopZ (González-Guerrero et Argüello, 2008). La structure de CopZ, résolue en solution par RMN, montre une petite protéine globulaire qui possède un motif de type CxxC liant les ions Cu(I) ou Ag(I) [Figure 2.3.2] (Banci *et al.*, 2001).

Des études biochimiques ont montré que A*f*CopZ transférerait son Cu(I) au MBD amino-terminal de *Af*CopA (González-Guerrero et Argüello, 2008). Mais ce MBD ne serait pas compétent pour transférer le cuivre aux sites transmembranaires. Il aurait plutôt un rôle de régulation, en modulant le taux de transport du cuivre (González-Guerrero et Argüello, 2008).

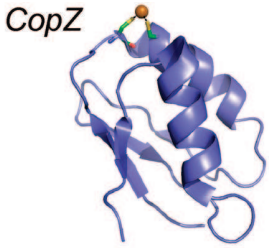


Figure 2.3.2 – Structure de la métallochaperone CopZ de *Bacillus subtilis* d'après Ma *et al.* (2009b).

2.3.1.2 Les protéines de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitators)

Les protéines CDF (Cation Diffusion Facilitators) forment une famille de transporteurs métalliques dont le principal substrat est le Zn(II), mais il peut aussi transporter le Co(II), le Ni(II), le Cd(II), et le Fe(II). L'énergie du transport serait fournie par un couplage à un antiport de protons (Nies, 2003, 2007).

La mieux caractérisée des pompes de ce type est YiiP de *E. coli* qui permet l'export du Zn(II). On trouve parmi ses homologues, CzcD de *Cupriavidus metallidurans* CH34. La structure cristallographique de la protéine métallée YiiP révèle une architecture en dimère avec quatre sites à zinc par monomère. Trois de ces sites sont cytosoliques et un site est placé au niveau des hélices membranaires. Seul ce dernier est nécessaire pour l'efflux du zinc [Figure 2.3.3] (Lu et Fu, 2007). Il a une coordination tétraedrique par la liaison d'une histidine et de trois aspartates.

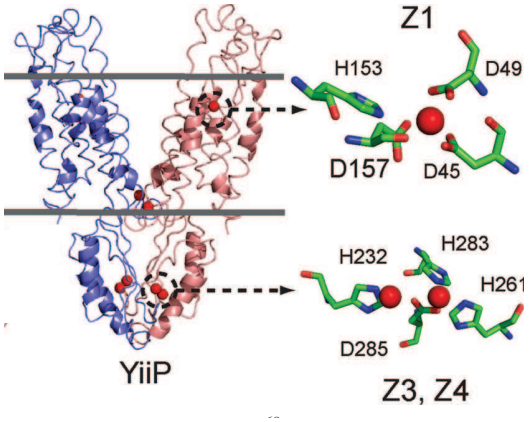


Figure 2.3.3 – Structure de YiiP (à gauche, pdb 2QFI) et de trois des quatre sites de liaison à zinc (à droite), d'après Ma *et al.* (2009b).

YiiP est capable de discriminer entre le zinc/cadmium et les autres métaux sur la base de ce faible nombre de ligands (Wei et Fu, 2005). Actuellement nous ne savons pas comment les autres protéines de type CzcD sont capables de discriminer les métaux, puisque beaucoup d'entre elles peuvent également protéger contre la toxicité du Ni(II) et Co(II) (Ma *et al.*, 2009b).

2.3.1.3 Les transporteurs spécifiques du cobalt et du nickel

NreB : La protéine NreB a été caractérisée chez *C. metallidurans* 31A. L'expression de NreB est induite par le nickel et confère la résistance au nickel dans la souche 31A. C'est une pompe qui contient 12 segments transmembranaires et une séquence carboxy-terminale riche en histidine (Nies, 2003; Li et Zamble, 2009).

CnrT : A ce jour, seulement trois protéines semblent être des homologues de la protéines CnrT de *C. metallidurans* CH34. Le gène codant pour *cnrT* chez CH34 est en aval du déterminant *cnr* codant pour la résistance au cobalt et au nickel. Ces protéines ont 12 ou 14 hélices transmembranaires et, comme NreB, possèdent une séquence carboxy-terminale riche en histidines. (Nies, 2003)

RcnA : RcnA est une protéine membranaire qui contribue positivement à la résistance au cobalt et au nickel mais participerait aussi à l'homéostasie du fer chez *E. coli* (Rodrigue *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2007; Iwig *et al.*, 2006). La topologie de RcnA inclut six segments transmembranaires. Etant donnée la faible homologie avec les autres familles de transporteurs, il pourrait s'agir d'une nouvelle classe de système d'efflux (Rodrigue *et al.*, 2005).

2.3.2 Systèmes d'efflux à travers la membrane cytoplasmique et la membrane périplasmique : les familles RND, MFP et OMF

La famille de protéines RND a d'abord été décrite comme une famille impliquée dans la résistance aux métaux, dans la nodulation et dans la division cellulaire (RND pour Resistance Nodulation Division) (Saier Jr *et al.*, 1994). Cette famille inclut des membres spécialisés dans le transport de composés très différents. Dans ce manuscrit nous ne nous intéresserons qu'à la famille RND de type HME (Heavy Metal Efflux), qui est responsable de l'export des ions métalliques. Les gènes qui codent pour les RND sont, dans la plupart des cas, adjacents à un gène codant pour une protéine de la famille des MFP (Membrane Fusion Protein) et à un gène codant pour une OMF (Outer Membrane Factor). Ces trois protéines forment un complexe d'efflux qui exporte le substrat du cytoplasme ou du périplasme directement à l'extérieur de la cellule en utilisant l'énergie provenant du gradient de protons de la membrane interne (Nies, 2007).

Le système le mieux étudié à l'heure actuelle est la pompe CusCBA d'*E. coli*, qui est responsable de l'export des ions Cu(I) et Ag(I). CusA correspond à la protéine RND, elle est accompagnée par les protéines CusB et CusC des familles MPF et OMF [Figure 2.3.4] (Su *et al.*, 2011a). CusA est un homotrimère dont chaque sous-unité consiste en douze hélices transmembranaires accompagnées d'un domaine périplasmique formé de deux boucles. CusA capte les métaux dans le périplasme et dans le cytoplasme. CusB fixe aussi des ions cuivre périplasmiques par son interaction avec la forme métallée de la protéine chaperon CusF. Les ions cuivre sont ensuite

transmis à CusA par l'intermédiaire de paires de résidus méthionines situés dans son domaine periplasmique. C'est également des paires de méthionines localisés sur tout le long de la protéine CusA qui définissent une voie de passage pour les cations jusqu'à CusC où ils sont exportés dans l'environnement [Figure 2.3.5] (Long *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011b).

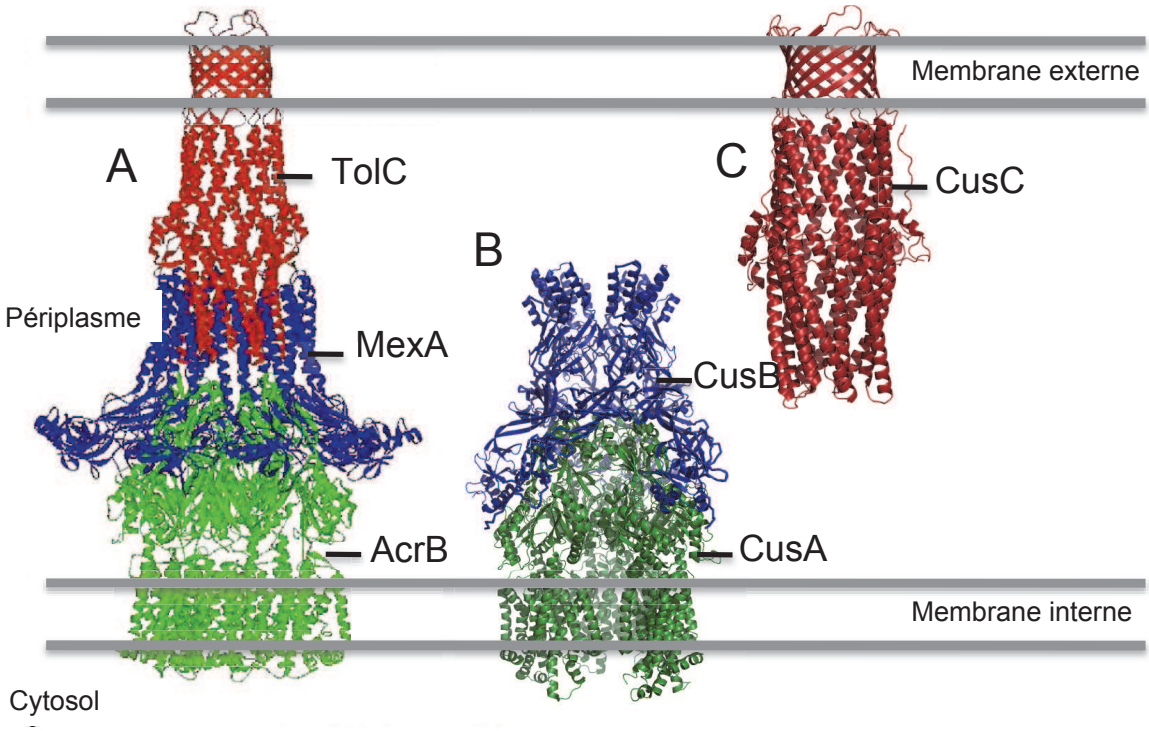


Figure 2.3.4 – Structure d'une pompe d'efflux à trois composants. A : Modèle d'assemblage des trois constituants de la pompe d'efflux : AcrB, de couleur verte, est un transporteur RND de type HAE (Hydrophobic and Amphiphilic Efflux), TolC de couleur rouge est la protéine de type OMF correspondante et la protéine MexA de couleur bleue, est un homologue de AcrA, la protéine MFP partenaire de AcrB/TolC d'après(Eswaran *et al.*, 2004). B : Structure du complexe CusBA d'*E. coli* (pdb 3NE5) . C : Structure de CusC d'*E. coli* (pdb 3PIK).

2.4 Les stratégies de défense des bactéries

En plus des stratégies d'import et d'export utilisées pour réguler la concentration de métaux intracellulaire, les bactéries mettent en place d'autres types de mécanismes qui sont décrits dans cette section (Rouch *et al.*, 1995).

2.4.1 Exclusion du métal par l'imperméabilité de la membrane

Les bactéries limitent l'entrée des métaux en modifiant la production des porines (Lutkenhaus, 1977). Ainsi, il a été montré par des études protéomiques portant sur *E. coli*, qu'un stress par les

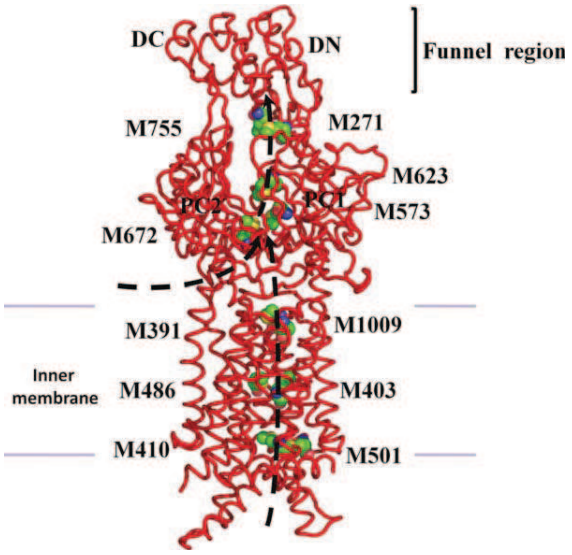


Figure 2.3.5 – La voie de transport du cuivre proposée pour la pompe CusA. Les cinq méthiones forment un chemin pour l'exportation du métal. Ces cinq paires de méthionines sont montrées sous forme de sphères. Les chemins que peuvent emprunter les ions métalliques à travers la fente périplasmique et la région transmembranaire sont illustrés en noir. Code couleur : carbone en vert, oxygène en rouge, azote en bleu et soufre en jaune

ions cadmium provoquait, chez cette bactérie, une diminution de la synthèse de la porine OmpF (Faber *et al.*, 1993). Cette protéine étant supposée jouer un rôle dans l'entrée des métaux, la baisse de sa production aura, de ce fait, un impact sur l'accumulation intracellulaire des ions métalliques.

2.4.2 Séquestration intracellulaire

Ce mécanisme de défense repose sur la production de protéines qui chelatent les excès d'ions métalliques pour d'une part, stocker ces ions et pour d'autre part, protéger les composants essentiels des cellules de leur toxicité potentielle.

L'exemple le mieux caractérisé est la production de métallothionéines (MT) en réponse à un excès de zinc dans la cellule. De nombreuses MT ont été caractérisées chez les eucaryotes, mais ces protéines sont rares chez les bactéries et, on les observe principalement dans des souches de cyanobactéries et de pseudomonas où elles lient et séquestrent le zinc intracellulaire (Robinson *et al.*, 2001). Ce sont de petites protéines très riches en résidus cystéine capables de coordiner une grand nombre d'ions. Par exemple, il a été montré que la MT SmtA, présente dans le genre des *Synechococcus,* pouvait coordiner jusqu'à quatre atomes de zinc dans une seule poche contenant des résidus histidine et cystéine (Robinson *et al.*, 2001). Des homologues de cette protéine existent chez d'autres organismes comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *P. putida,* qui peuvent également lier de nombreux ions zinc.

Certaines protéines sont également spécifiques pour le stockage du nickel. Par exemple, HypB de *Bradyrhizobium japonicum,* impliquée dans la biosynthèse de l'hydrogénase compte 24 histidines dans ses 39 premiers résidus et coordine 18 ions nickel par dimère (Fu *et al.*, 1995) et UreE de *Klebsiella aerogenes,* nécessaire à la maturation de l'uréase, contient 10 histidines dans ses 15 derniers résidus et lie approximativement 6 ions nickel par dimère (Lee *et al.*, 1993).

2.4.3 Séquestration extracellulaire

La résistance aux ions métalliques par séquestration extracellulaire est surtout répandue chez les levures et les champignons mais quelques exemples sont également recensés chez les bactéries. Ainsi, les couches exopolysaccharidiques de *K. aerogenes*, *P. putida* ou encore *Arthrobacter viscosus* sont capables de chélater certains métaux comme le cadmium, les empêchant de pénétrer dans le cytoplasme et augmentant ainsi significativement la résistance des bactéries à ces ions (Scott et Palmer, 1988).

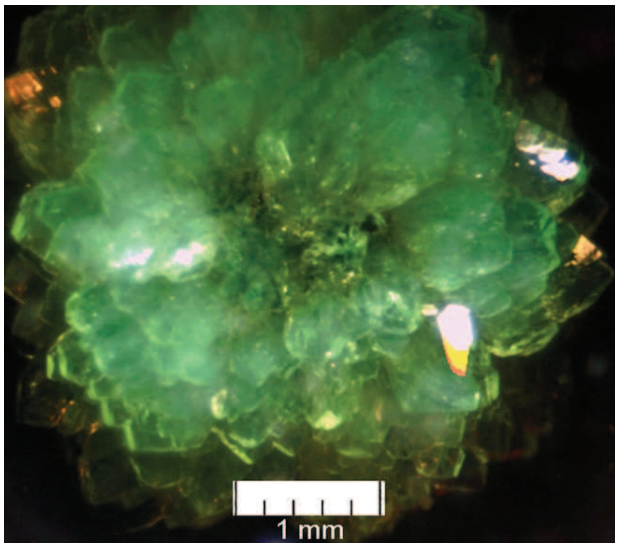


Figure 2.4.1 – Agrégats cristallins de $Ni(NH_4)(PO_4)$ $6H_2O$ produit par *Streptomyces acidiscabies* E13 (Haferburg *et al.*, 2008)

De façon plus originale, la souche de *Streptomyces acidiscabies* E13, isolée dans le sol d'une ancienne mine d'uranium, est naturellement résistante à des concentrations élevées de nickel car ces bactéries sont capables de former des agrégats cristallins de nickel-struvite : $Ni(NH_4)(PO_4)$ $6H_2O$, dans lesquels sont séquestrés les ions Ni^{2+} [Figure 2.4.1] (Haferburg *et al.*, 2008)

2.4.4 Détoxication enzymatique

Une autre voie de résistance est la modification par oxydo-réduction d'un ion métallique toxique en une espèce moins toxique. L'exemple le mieux caractérisé est celui de la résistance au mercure codée par *mer* dont les produits des gènes organisés en régulon réduisent le Hg^{2+}en Hg^0

volatile (Misra, 1992). Deux catégories de déterminants *mer* ont été décrites. Le déterminant à spectre restreint qui confère uniquement la résistance aux sels de mercure inorganiques par la production de l'enzyme MerA, une mercure réductase. Le déterminant à spectre large qui est, en plus, responsable de la résistance aux organo-mercurial comme le méthyl-mercure ou le phenyl-mercure par l'induction de MerA, et de l'enzyme MerB, une lyase qui clive les liaisons C-Hg (Misra, 1992). L'opéron code aussi les protéines de transport MerP et MerT qui internalisent le mercure libre de l'environnement dans le cytoplasme où aura lieu la détoxication et, pour MerR et MerD qui contrôlent la régulation du déterminant (Nascimento et Chartone-Souza, 2003; Champier *et al.*, 2004).

2.4.5 Réduction de la sensibilité les cibles cellulaires

Comme dans les cas de résistances aux antibiotiques, certains micro-organismes s'adaptent à la présence de quantités toxiques de métaux en atténuant la sensibilité de certains composants cellulaires. De la même manière, des mutations ponctuelles vont diminuer la sensibilité des cibles sans altérer leur fonction biologique. Un tel mécanisme d'adaptation a été identifié chez *E. coli*. Il a été montré que, lorsqu'on exposait des cellules ponctuellement à de grandes quantités d'ions Cd^{2+}, elles présentaient un taux important de dommages sur l'ADN. Cependant, après plusieurs sous-cultures successives dans ces mêmes conditions, moins de dégâts étaient observés. Les auteurs suggèrent que les mécanismes de réparation de l'ADN seraient plus efficaces chez les cellules adaptées, et ainsi leur ADN serait moins sensible aux ions Cd^{2+} (Mitra et Bernstein, 1977, 1978).

Chapitre 3

Régulation de l'homéostasie des métaux de transition

Toutes les cellules bactériennes possèdent des pompes, des enzymes et des chaperons, qui interviennent directement dans l'homéostasie des métaux. La production de ces protéines effectrices est directement modulée par la concentration en ions métalliques de milieu, et elle repose sur l'intervention d'un ensemble de protéines régulatrices qui modifient l'expression génétique selon l'environnement de la bactérie (O'Halloran et Walsh, 1987). Par exemple, la transcription du transporteur de nickel FrpB4 [voir section 2.2.1 page 28] est induite lorsque la *Helicobacter pilori* évolue dans un milieu carencé en nickel et, est inhibée lorsque la biodisponibilité de l'ion augmente de concert avec l'activation de la transcription de pompes d'efflux (Ernst *et al.*, 2006). Pour détecter ces fluctuations au sein de la cellule et dans le milieu extérieur, une protéine senseur spécifique d'un ion métallique donné, en formant un complexe avec celui-ci, va induire l'inhibition ou l'activation de l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie de cet ion. La métallorégulation est : soit directe, la protéine senseur modifie elle-même le profil de transcription de l'ADN (pour revue Reyes-Caballero *et al.*, 2011), soit indirecte lors de la détection de modifications environnementales. La protéine senseur localisée dans le périplasme transmet l'information à travers la membrane, dans le cytosol, par des mécanismes communs avec la détection d'autres types de stress bactériens (modification d'interactions protéines :protéines, cascades protéolytiques) (pour revue Mascher *et al.*, 2006; Staroń *et al.*, 2009).

L'objectif de cette thèse porte sur la caractérisation d'un senseur périplasmique d'ions métalliques. Deux questions centrales de ce travail, à savoir : i) la manière dont les senseurs sont capables de discriminer les métaux et ii) la nature du signal transmis à travers la membrane, ont été résolues dans d'autres systèmes de réponse au stress bactérien. C'est pourquoi dans ce chapitre ces deux éléments clés indispensables à l'efficacité des régulations feront l'objet d'une attention particulière.

3.1 Les métallorégulateurs

Les métallorégulateurs sont divisés en deux groupes qui contrôlent l'expression de gènes, soit nécessaires à l'influx de métaux, soit codant des mécanismes d'efflux ou de stockage des ions. En général, les régulateurs qui contrôlent l'import utilisent les ions métalliques comme des corépresseurs, c'est à dire des molécules dont la fixation induit la répression génétique. Au contraire, la liaison du métal comme un activateur sur les protéines régulant l'export, entraîne souvent une diminution de l'affinité pour le promoteur de gènes d'efflux et/ou de séquestration, permettant ainsi l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase (Ma *et al.*, 2009b).

On distingue dix familles de métallorégulateurs dont les principaux représentants sont montrés dans la figure 3.1.1 mais, seules les protéines spécifiques du nickel et du cobalt seront décrites dans cette section.

Tous les métallorégulateurs présents dans un même organisme sont confrontés à des concentrations identiques d'ions métalliques et pourtant ils sont spécifiques pour un, voire pour deux ions particuliers. Plus encore, dans la majorité des cas, tous les membres d'une même famille ne détectent pas les mêmes métaux [Tableau 3.1.1] indiquant que la structure globale de chaque protéine n'est pas associée à la reconnaissance spécifique d'un ion parmi les autres.

La sélectivité ne peut pas reposer uniquement sur l'affinité d'un ion pour une protéine car celle-ci suit souvent l'ordre défini par la série Irving Williams [voir section 1.2.3 page 14]. Un autre élément entre donc en compte, celui de la chimie de coordination [voir section 1.2.2 page 11]. Nous avons déjà signalé les préférences du nickel, du cobalt ou du zinc pour des géométries similaires (nickel/cobalt) ou distinctes (nickel/zinc) dans les protéines. Ce paramètre est l'élément capital qui va jouer sur la sélection d'un métal parmi d'autres par une protéine (voir les exemples de NikR, section 3.1.1 et de NmtR, section 3.1.3]). Ce facteur explique aussi la différence de sélectivité de protéines homologues (voir les exemples de RcnR/CsoR, section3.1.2 et de NmtR/KmtB-CzrA , section 3.1.3).

3.1.1 NikR

Chez *E. coli* l'opéron *nik* code une pompe d'import du nickel (voir 2.2.2.1) et est réprimé directement par la fixation de cet ion sur le régulateur NikR (Wu *et al.*, 1989; De Pina *et al.*, 1999).

NikR est un dimère de dimères avec quatre sites de liaison aux métaux au centre du complexe, entouré par deux domaines entrecroisés qui lient l'ADN [figure 3.1.2] (Schreiter *et al.*, 2003). Le nickel a une très forte affinité pour ces sites métalliques où il est coordiné en plan carré par des résidus conservés (trois histidines et une cystéine) à l'interface de chaque dimère (Wang *et al.*, 2004; Carrington *et al.*, 2003).

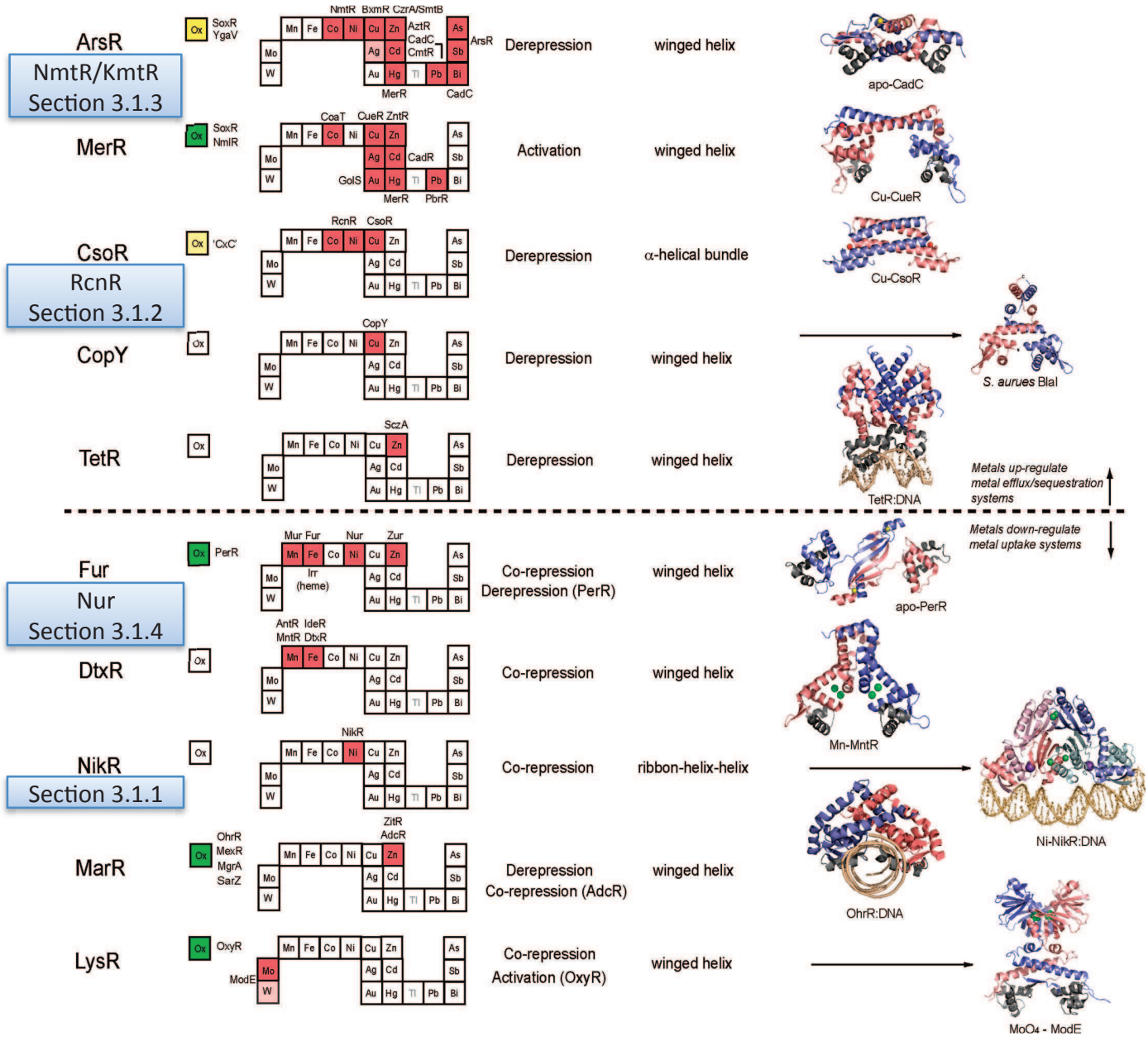


Figure 3.1.1 – Familles structurales des métallorégulateurs. Les cases rouges correspondent aux métaux détectés par chaque famille. Les cases vertes signalent les membres capables de ressentir le stress oxydatif cytosolique. Les cases roses et jaunes indiquent respectivement les senseurs potentiels et les régulateurs de stress oxydatifs qui ne détectent pas d'ions métalliques (Ma *et al.*, 2009b).

Tous les cations peuvent se lier à *Ec*NikR avec une affinité qui suit la série définie par Irving et Williams (Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II), avec la liaison du Cu(II) 1000 fois plus forte que celle du Ni(II)) (Wang *et al.*, 2004). Tous peuvent induire également la liaison de NikR au promoteur *nik* (Bloom et Zamble, 2004) mais seul le nickel peut le réprimer *in vivo* (Leitch *et al.*, 2007). En effet, tous les cations testés ont des sphères de coordinations différentes : géométrie carrée pour Ni(II) et Cu(II), octaédrique pour Co(II), tétraédrique pour Zn(II) et trigonale pour Cu(I) (Leitch

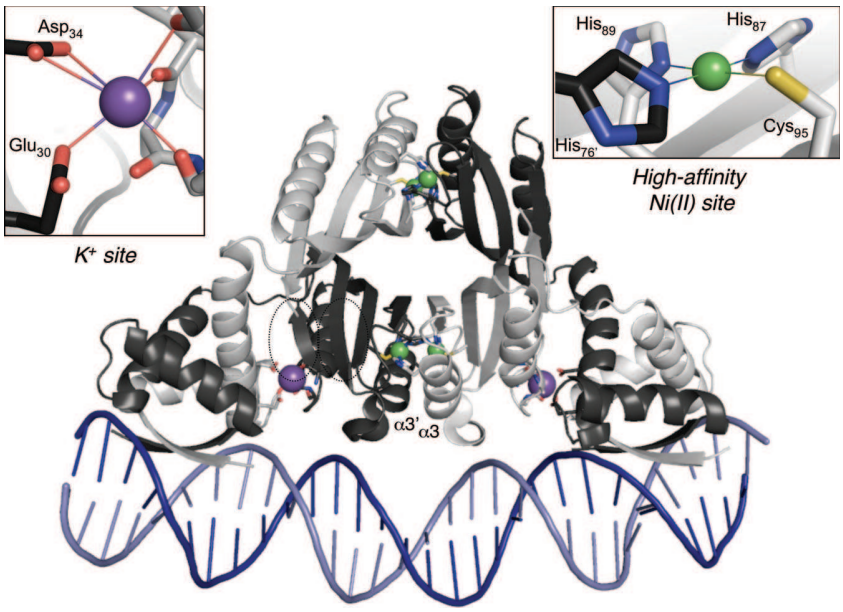


Figure 3.1.2 – Structure de NikR en complexe avec l'ADN. La protéine (pdb 2HZV) est composée de quatre monomères colorés avec différentes nuances de gris. Le site de liaison au nickel de haute affinité est exposé dans l'encart de droite, et celui de basse affinité, occupé par du potassium dans la forme cristalline, dans l'encart de gauche. Code couleur : nickel en vert, potassium en violet, oxygène en rouge, azote en bleu et soufre en jaune.

et al., 2007). Ces différences de géométrie peuvent contraindre la protéine à des changements de conformation qui n'induisent l'activation allostérique de la protéine qu'en présence de nickel. Cette hypothèse a été vérifiée par la comparaison des structures des formes métallése zinc et nickel de NikR qui montrent que seul le nickel induit effectivement une conformation active (Phillips *et al.*, 2008). Le Cu(II) n'entre pas en compétition avec le nickel bien qu'il utilise la même géométrie de coordination car dans les cellules, le cuivre n'est présent que sous forme Cu(I) du fait des conditions réductrices du cytosol (Leitch *et al.*, 2007).

De nombreux homologues de NikR existent dont un des plus étudiés est celui de *Helicobacter pylori* (Chivers et Sauer, 1999). *Hp*NikR a un rôle très important car il régule, en plus du système *nik* la transcription de l'uréase et de l'hydrogénase, enzymes indispensables pour la colonisation par la bactérie des muqueuses gastriques des mammifères [voir sections 1.2.5] (Li et Zamble, 2009). *Hp*NikR partage 30% d'identité et 68% de similarité avec *Ec*NikR (van Vliet *et al.*, 2002). La structure cristallographique montre six sites de liaison aux métaux, organisés par paires, dont tous sont nécessaires pour le bon fonctionnement de la protéine : le site final (F), le site intermédiaire (I) et le site externe (X) [Figure 3.1.3] (Dian *et al.*, 2006). Le site F correspond au site de forte affinité de *Ec*NikR et permet la liaison d'un nickel par une coordination en plan carré (Dian *et al.*, 2006). Sur la base d'une étude structurale, un modèle propose que *Hp*NikR agisse en deux temps : d'abord la liaison du nickel sur le site F entraîne la fixation de la protéine sur certains promoteurs de forte affinité comme celui du gène *frpB4* [voir section 2.2.1 page 28],

ensuite en présence d'une concentration croissante en métal, le nickel va être capable de se fixer sur le site X induisant d'autres modifications permettant la liaison à des promoteurs secondaires (Bahlawane *et al.*, 2010). La fonction du site I qui contient un mélange de ligands provenant des deux autres sites est encore inconnue (Li et Zamble, 2009).

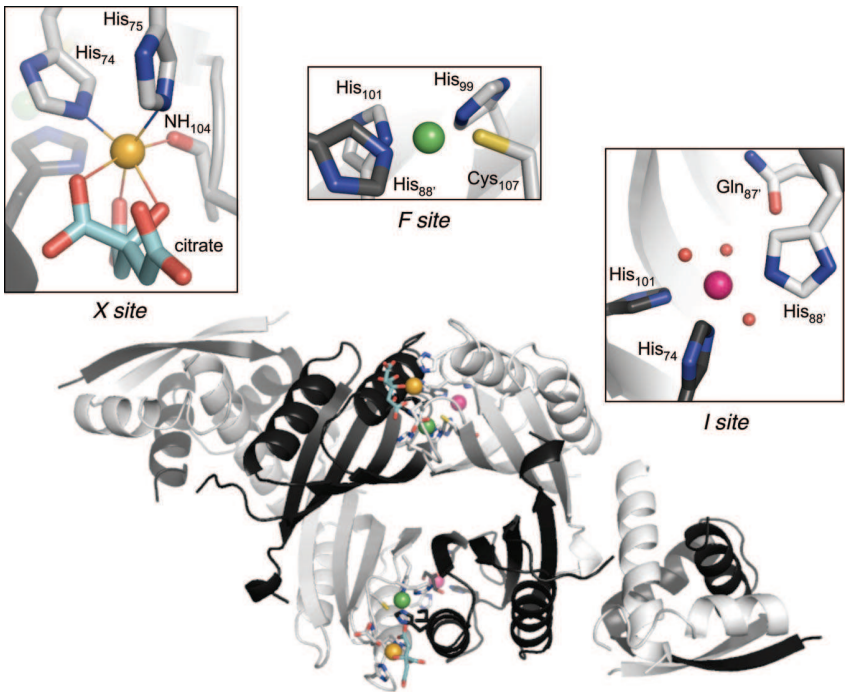


Figure 3.1.3 – Structure de *Hp*NikR. La protéine (pbd 2CAD) est composée de quatre monomères colorés avec différentes nuances de gris. Trois sites de liaison au nickel sont montrés dans les encarts. Le site F (nickel de couleur verte) est observé chez tous les homologues de NikR. Le site X (nickel de couleur orange) contient un citrate qui provient des conditions de cristallisation (bleu clair). Le site I (nickel de couleur rose) est composé par des résidus des deux autres sites. Code couleur : oxygène en rouge, azote en bleu et soufre en jaune.

3.1.2 RcnR

RcnR contrôle l'expression du gène *rcnA* [voir section 2.3.1.3 page 35] qui code une pompe d'efflux du cobalt et du nickel (Koch *et al.*, 2007). RcnR est un tétramère qui contient quatre sites de liaison au nickel et au cobalt dont la constante d'affinité est de l'ordre du nanomolaire (Iwig *et al.*, 2008). Ces sites ont été caractérisés par des expériences de spectroscopie aux rayons X (SAX) et de mutagenèse. Les deux cations sont coordinés par une géométrie octaédrique avec des ligands identiques, mais les forces d'interactions de chacun des ligands ne sont pas forcément similaires comme l'indique l'importante variation de distance entre le soufre de la cystéine ligand et le métal (Ni-S = 2,54 Å / Co-S = 2,24 Å) (Iwig *et al.*, 2008).

RcnR est un homologue de CsoR, le répresseur d'une pompe d'efflux à cuivre dont la structure a été résolue [Figure 3.1.4] (Iwig *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). L'ion Cu(I) dans CsoR est coordiné avec une géométrie trigonale par deux histidines et une cystéine conservées (Liu *et al.*, 2007).

Les ions Ni(II) et Co(II) lorsqu'ils se fixent à RcnR recrutent, en plus des ligands du Cu(I) de CsoR, d'autres résidus qui ne sont pas présents dans CsoR de manière à être coordinés par une géométrie octaédrique. Dans le cas de ces protéines homologues, la sélectivité est une fois de plus conduite par la chimie de coordination des métaux liés.

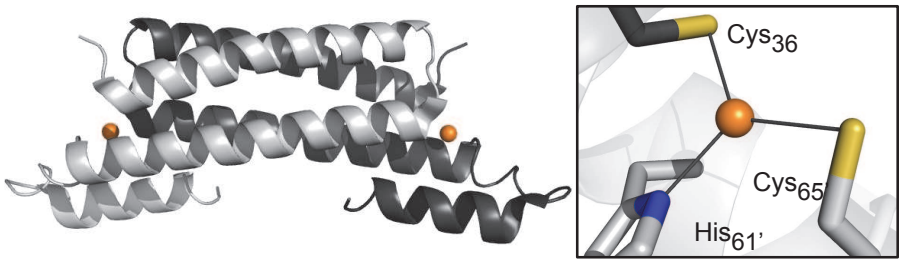


Figure 3.1.4 – Structure de la protéine CsoR de *Mycobacterium tuberculosis* (à gauche, psb 2HH7) et du site métallique (à droite). Code couleur : cuivre en orange, azote en bleu et soufre en jaune.

3.1.3 NmtR et KmtR

La bactérie *Mycobacterium tuberculosis* n'a pas d'homologue de NikR ou de RcnR mais elle exprime les facteurs de transcription, NmtR et KmtR (Cavet *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2007a), qui répondent au nickel et au cobalt et font partie de la famille ArsR/SmtB (Busenlehner *et al.*, 2003; Tottey *et al.*, 2005).

En présence de nickel, NmtR induit la production de NmtA, une pompe ATPase de type P. Ni^{2+} se fixe à NmtR avec une affinité quarante fois plus forte que celle du cobalt mais beaucoup plus faible que celle du zinc *in vitro,* en accord avec la série d'Irving Williams (Pennella *et al.*, 2003; Cavet *et al.*, 2002). La sélectivité de la protéine est dictée par la chimie de coordination des métaux. En effet, le nickel et le cobalt coordinent NmtR par une géométrie octaédrique contraignant la protéine à des modifications conformationnelles qui entraînent une perte d'affinité pour l'ADN. Au contraire le zinc s'associe seulement à quatre ligands et n'induit pas les changements allostériques nécessaires pour la dissociation du complexe promoteur-protéine (Cavet *et al.*, 2002; Pennella *et al.*, 2003).

NmtR est une protéine homologue aux métallorégulateurs de zinc SmtB et CzrA, pour lesquels le zinc a également plus d'affinité que le nickel et le cobalt (VanZile *et al.*, 2000; Pennella *et al.*, 2003). Le changement de sélectivité entre ces 3 homologues provient de différences dans la structure primaire des protéines. En effet, la sélectivité *in vivo* de NmtR en faveur du nickel et du cobalt est obtenue par le recrutement de deux ligands histidine qui proviennent d'une extension carboxy-terminale de la protéine, pour compléter leur sphère de coordination octaédrique. L'absence de cette extension dans CzrA et SmtB implique une sélectivité renforcée pour les ions zinc qui favorisent les géométries tétraédriques (Pennella *et al.*, 2003; VanZile *et al.*, 2000).

KmtR réprime l'expression d'une pompe CDF et a une meilleure affinité pour le nickel et le cobalt que NmtR *in vitro*. Ainsi, ce régulateur détecte de très faibles concentrations de métal et par conséquent, les ions sont rapidement exportés par le transporteur dont la production est induite. NmtR n'est ainsi activé que dans un deuxième temps, lorsque la pompe CDF est surchargée et que le niveau d'accumulation du métal dans la cellule est trop important (Campbell *et al.*, 2007a).

3.1.4 Nur

Streptomyces coelicor produit deux types de SOD [voir section 1.2.6.3 page 19], la NiSOD qui fonctionne avec le nickel et la FeSOD qui est active en présence de fer. Elles sont codées respectivement par *sodN* et *sodF* (Kim *et al.*, 1998) et, en présence de nickel, l'expression de *sodN* est augmentée tandis que celle de *sodF* est diminuée, permettant ainsi un niveau constant de l'activité de la superoxyde dismutase (Chung *et al.*, 1999). En présence de nickel, la protéine régulatrice Nur se fixe en amont de *sodF* pour le réprimer (Ahn *et al.*, 2006). La structure de la protéine montre un dimère avec deux sites de liaison à l'ADN et deux types de sites de liaison au métal qui participent tous deux à l'activité de la protéine. Dans le premier site, appelé site M, le nickel est lié à quatre résidus histidine par une coordination planaire carrée et dans le second, il est coordiné dans une géométrie octaédrique à 3 histidines et à 3 oxygènes qui proviennent de molécules de malonate et d'éthylène glycol présents dans le tampon de cristallisation [Figure 3.1.5] (An *et al.*, 2009).

3.2 Les systèmes à deux composants

3.2.1 Description générale

Les systèmes à deux composants (TCS pour *Two Component System*) sont largement utilisés par les bactéries pour réguler l'expression de gènes en réponse à des changements du milieu extérieur. La diversité des stimuli est importante. Elle est illustrée dans le tableau 3.1.

Tous les génomes bactériens séquencés jusqu'à présent, exceptés ceux des mycoplasmes, possèdent des copies multiples de gènes codant pour des TCS (Mascher *et al.*, 2006). Ceux-ci sont composés d'une protéine histidine kinase (HK) senseur, liée le plus souvent à la membrane, et d'un régulateur de réponse (RR) qui induit l'expression de gènes cibles. Ces deux protéines ont chacune deux domaines distincts dont les phosphorylations successives régulent la transmission de l'information de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule [Figure 3.2.1]. La protéine HK contient un domaine senseur dans sa partie amino-terminale qui, lorsqu'il détecte un stimulus, induit la phosphorylation d'une histidine conservée située sur le domaine transmetteur carboxy-terminal de la protéine. L'information est transmise par transfert de ce phosphate à un aspartate conservé

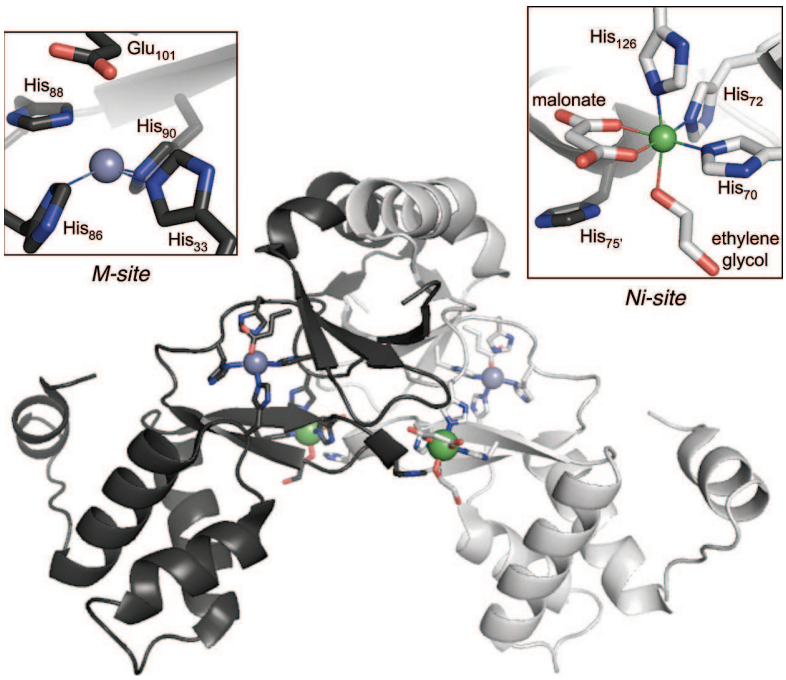


Figure 3.1.5 – Structure de la protéine Nur de *S. coelicor* (pdb 3EYY). Le site M est ici occupé par du zinc. Le nickel peut aussi se fixer au site M avec les mêmes résidus histidines dans une géométrie planaire carrée. Le site Ni est coordiné par trois histidines et trois oxygènes provenant du malonate et de l'éthylène glycol présents dans le tampon de cristallisation . Code couleur : nickel en vert, zinc en violet, oxygène en rouge et azote en bleu.

Système	Fonction	Molécule signal
ArcB/ArcA	Déctection de l'oxygène et des états d'oxydo-reduction	Quinones
CitA/CItB	Transport et métabolisme anaérobique du citrate	Citrate
CheA/CheY	Chimiotaxie	Facteurs chimio-attractants
FixL/FixJ	Fixation de l'azote	NO, CO, O_2
TodS/TodT	Dégradation des dérivés de benzène	Composé monoaromatique
NtrB/NtrC	Utilisation de l'azote	Glutamine, 2-cétoglutarate
KdpD/KdpE	Apport de K^+	K^+
KinB/SpoOF	Sporulation	?
BvgS/BvgA	Virulence	Température, ions sulfate, acide nicotinique
DesR/DesK	Modification des lipides	Température

Tableau 3.1 – Exemples de systèmes à deux composants avec leurs fonctions respectives et la molécule signal correspondante (d'après Krell *et al.* (2010))

sur le domaine receveur du RR. Il peut alors induire la réponse cellulaire appropriée par l'intermédiaire de son domaine effecteur, à travers des interactions protéine :protéine ou ADN :protéine, menant finalement à la régulation de l'expression de gènes spécifiques. La déphosphorylation de l'aspartate par le RR lui-même, par la HK ou par une phosphatase externe permet le retour à l'état basal (Parkinson, 1993; Mascher *et al.*, 2006).

Figure 3.2.1 – Les systèmes à deux composants. Lorsqu'un signal est détecté dans le milieu extérieur, l'information est transmise au travers des différents domaines du senseur et du régulateur par des réactions de phosphorylation.

Les protéines HK membranaires appartiennent à deux groupes différents selon leurs structures. Le premier groupe comprend des HK qui comportent jusqu'à 20 domaines transmembranaires connectés par de courtes boucles intra ou extracellulaires et qui détectent des stimuli associés à l'enveloppe cellulaire comme les stress mécaniques de membrane (Mascher *et al.*, 2003). Le second groupe, qui contient des membres spécialisés dans la détection des métaux, inclut des protéines dotées de deux segments transmembranaires, d'un grand domaine périplasmique ou extracellulaire et d'un domaine transmetteur carboxy-terminal à activité kinase. Ce dernier comprend un résidu histidine conservé, essentiel pour l'autophosphorylation (la "*H box*") (Mascher *et al.*, 2006). La compréhension du mécanisme de signalisation de ces systèmes est l'objet d'un nombre important d'études. Toutefois, jusqu'à aujourd'hui, seules des structures de domaines isolés de HK ont été résolues et aucune forme entière n'a pu être déterminée. D'après ces structures, il semblerait que ces protéines soient des dimères dont les parties transmembranaires s'assemblent pour former des faisceaux de quatre hélices dans la membrane (Krell *et al.*, 2010). Seuls les quelques TCS dont au moins un des *stimuli* d'activation est un métal seront évoqués dans les sections suivantes.

3.2.2 Système PhoP/PhoQ

Le système PhoP/PhoQ régule la transcription d'une quarantaine de gènes intervenant dans différentes activités cellulaires chez plusieurs bactéries à Gram négatif (Groisman, 2001). Il répond à au moins trois signaux : le pH acide (Bearson *et al.*, 1998), certains peptides antimicrobiens (Bader *et al.*, 2005) et la concentration en Mg^{2+} et Ca^{2+} (García Véscovi *et al.*, 1996). Contrairement aux métallorégulateurs qui interviennent uniquement dans la régulation de l'import ou de l'export du métal qui les active, le système PhoP/PhoQ entraîne certes l'induction des gènes de transport de Mg^{2+}mais permet également l'expression de protéines dont la fonction n'est pas directement liée à l'homéostasie du magnésium ou du calcium.

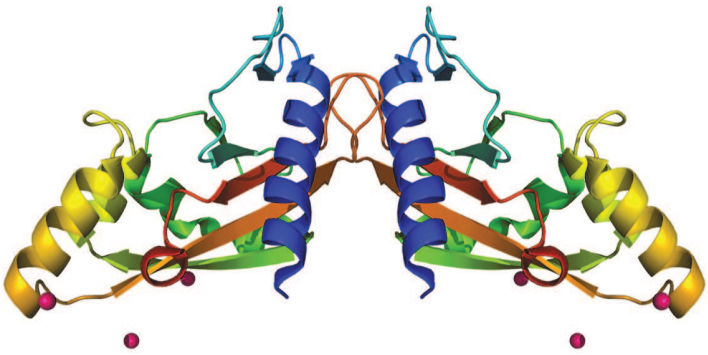


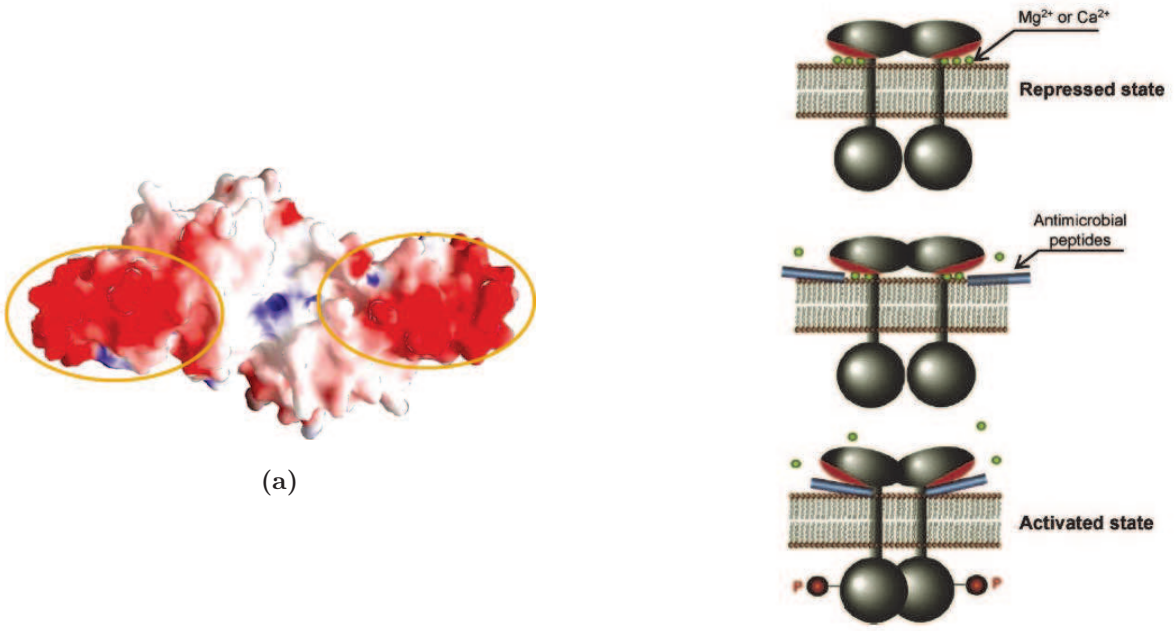
Figure 3.2.2 – Structure dimérique du domaine senseur de PhoQ (pddb 1YAX).

Le système PhoP-PhoQ a été dans un premier temps identifié chez *Salmonella typhimurium* comme facteur de virulence (Miller *et al.*, 1989) et son étude intensive l'a amené à être l'un des opérons les mieux caractérisés des bactéries entériques. De fortes concentrations périplasmiques en magnésium, calcium et manganèse inhibent l'activité kinase de PhoQ. La protéine HK senseur ne peut donc plus phosphoryler PhoP ce qui maintient la répression de la transcription des gènes (García Véscovi *et al.*, 1996). La structure du domaine périplasmique senseur de PhoQ a été résolue chez *S. typhimurium* (Cho *et al.*, 2006) et chez *E. coli* (Cheung *et al.*, 2008). Ce domaine a un repliement de type PDC (PhoQ-DcuS-CitA) caractérisé par une longue hélice amino-terminale et un coeur formé de brins β connectés par de petites hélices, que l'on retrouve dans d'autres protéines HK (Cheung *et al.*, 2008) qui ne sont pas spécifiquement impliquées dans la détection de métaux [Figure 3.2.2] (Mascher *et al.*, 2006). La protéine ne comporte pas de poche ou de cavité spécifique pour lier les ions, mais une surface acide qui fixe jusqu'à trois ions magnésium et qui est en interaction directe avec les phospholipides de la membrane. Ces ions, en formant un pont cationique entre la protéine et les groupes phosphates des phospholipides de la membrane, maintiennent l'état inactif du senseur. Ainsi, lorsqu'ils ne sont plus disponibles dans le milieu ou qu'ils sont déplacés de la protéine, la répulsion entre la surface chargée négativement de PhoQ et la membrane va permettre un changement d'orientation de la protéine membranaire, événement engendrant la transition d'une conformation réprimée à une conformation activée de PhoQ [Figure 3.2.3](Cho *et al.*, 2006).

3.2.3 Résistance au fer et au stress oxydatif

3.2.3.1 SenRS et HbpS

Streptomyces reticuli est une bactérie à Gram positif qui se défend de la toxicité du fer associé à un hème à l'aide d'un système à deux composants SenRS et de la protéine périplasmique HbpS. Selon la concentration en fer à l'extérieur de la cellule, ces protéines régulent l'expression de l'opéron *furS-cpeB* (Ortiz de Orué Lucana *et al.*, 2005). CpeB est une catalase-peroxidase qui utilise H_2O_2 pour oxyder ses substrats et qui protège ainsi la cellule de la toxicité de H_2O_2 en l'éli-



(a)

(b)

Figure 3.2.3 – Structure du domaine périplasmique de PhoQ et modèle du mécanisme de détection des cations et des peptides antimicrobiens. (a) Représentation de la surface électrostatique de PhoQ. Cette vue montre que les domaines qui sont en interaction avec la membrane (cercle orange) sont des surfaces chargées négativement (en rouge sur la figure) (Cho *et al.*, 2006). (b) Modèle montrant la liaison des cations et des peptides antimicrobiens sur PhoQ. Les cations divalents, tels que Mg^{2+} et Ca^{2+}(représentés sous forme de sphères vertes), se lient à la surface acide (en rouge) sur la partie senseur de la protéine et répriment son activité en bloquant ce domaine dans une conformation inactive (en haut). Lorsque les ions liés à la protéines sont déplacés par des peptides antimicrobiens, cela provoque un changement de conformation du domaine détecteur qui entraîne la phosphorylation du domaine transmetteur de PhoQ (en bas) (Mascher *et al.*, 2006)

minant (Zou et Schrempf, 2000). FurS est un régulateur transcriptionel qui réprime l'expression de l'opéron *furS-cpeB* en condition normale, mais qui est inactif sous conditions oxydatives, car la formation d'un pont disulfure interne l'empêche de se lier au promoteur (Ortiz de Orué Lucana *et al.*, 2003). Si le mécanisme de détection du fer hémique par HbpS est aujourd'hui connu, le mécanisme de transduction du signal par SenRS n'est toujours pas totalement compris :

- En absence de fer : la protéine HbpS inhibe SenS (Bogel *et al.*, 2009). SenR est alors sous forme non phosphorylée et réprime l'opéron *furS-CpeB*.

- En présence de fer sous forme d'hème : celui-ci se fixe sur la protéine HbpS qui le dégrade et coordine le fer libéré (Ortiz de Orué Lucana et Groves, 2009; Nagababu et Rifkind, 2004). Contrairement aux métallorégulateurs, ce n'est pas directement la détection du fer par HbpS qui change la conformation de la protéine mais les conditions oxydatives du milieu qui entraînent la formation d'un oligomère de HbpS. Cette forme protéique n'inhibe plus l'activité kinase de SenS, qui va donc phosphoryler SenR, permettant ainsi la transcription de *furS-cpeB* par l'ARN polymérase(Ortiz de Orué Lucana *et al.*, 2009, 2010).

3.2.3.2 Autres systèmes

D'autres TCS impliqués dans l'homéostasie du fer ont été caractérisée car ce sont souvent des facteurs de virulence chez des organismes pathogènes.

- HssRS de *Staphyloccocus aureus* régule la pompe d'efflux codée par les gènes *hrtAB* (Stauff *et al.*, 2007)

- ChrAS de *Corynebacterium diphteriae* induit la transcription du gène *hmuO* qui code une enzyme dégradant les hèmes afin de les utiliser comme source de fer (Schmitt, 1999)

-PmrAB, découvert chez *Salmonella typhimurium* (Wösten *et al.*, 2000), qui est directement activé par l'ion Fe(III), confère la résistance au fer *via* la modification des liposaccharides des parois bactériennes (Lee *et al.*, 2004).

Toutefois, les données biochimiques dont on dispose sont assez modestes et peu de détails sur les mécanismes de détection du fer ou sur la transduction du signal sont connus.

3.3 Systèmes dépendants des facteurs σ_{ECF}

3.3.1 Description générale : les facteurs σ_{ECF}

L'initiation de la transcription chez les bactéries nécessite la liaison de l'ARN polymérase à la sous-unité facultative σ (appelée aussi facteur σ). Cette sous-unité est responsable à la reconnaissance des boîtes -10 et -35 des promoteurs ainsi qu'à la dénaturation de l'ADN, qui permet à la fixation de l'ARN polymérase sur un des brins (Helmann et Chamberlin, 1988; Gruber et Gross, 2003).

Les bactéries possèdent un facteur sigma principal, σ^{70} , qui contrôle la plupart des processus de transcription pendant leur phase de croissance exponentielle et des facteurs σ alternatifs impliqués dans la transcription de régulons spécifiques associés à des changements environnementaux et physiologiques (Helmann et Chamberlin, 1988). Le facteur σ^{70} est composé de quatre domaines nommés de σ_1 à σ_4 (Lonetto *et al.*, 1992). Sur la base de la structure de cette protéine, les facteurs σ alternatifs ont été divisés en quatre groupes (Paget et Helmann, 2003). Le quatrième groupe, celui qui nous intéresse, regroupe les facteurs σ_{ECF} (ExtraCytoplasmic Function) qui régulent l'expression des gènes en fonction des variations de l'environnement extérieur (Lonetto *et al.*, 1994). Les facteurs σ_{ECF} ont été reconnus récemment comme l'un des mécanismes majeurs de transduction du signal chez les bactéries car ils sont largement utilisés et impliqués dans les processus physiologiques fondamentaux tels que les réponses aux stress d'enveloppe, le transport du fer, la sécrétion d'alginate ou la mise en place de mécanismes de résistance aux métaux (Staroń *et al.*, 2009).

Les facteurs σ_{ECF} possèdent une structure simplifiée par rapport aux facteurs σ^{70} car ils sont uniquement composés des domaines σ_2 et σ_4 nécessaires à l'interaction avec l'ARN polymérase et

à la reconnaissance des promoteurs bactériens (Helmann, 2002). Ces protéines partagent quelques caractéristiques communes : (i) dans la majorité des cas, elles agissent sur leur propre régulation (excepté FecI et HasI qui ne sont pas autorégulés [voir section 3.3.3]), (ii) les gènes des facteurs σ_{ECF} sont souvent cotranscrits avec un inhibiteur spécifique, une protéine qu'on appelle facteur anti-σ, (iii) en conditions normales, le facteur anti-σ est lié au facteur σ et le maintient inactif, et (iv) quand un stimulus est détecté, le facteur anti-σ est inactivé par une dégradation ou par des changements de conformation entraînant la libération du facteur σ qui est alors en mesure d'être recruté par l'ARN polymérase (Staroń *et al.*, 2009).

Les protéines CnrYXH impliquées dans la résistance au nickel et au cobalt chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 et qui sont l'objet du travail de cette thèse, forment un système de régulation dépendant du facteur σ_{ECF} CnrH. Pour cette raison, nous allons détailler dans ce chapitre les types de mécanismes employés par ces systèmes en nous focalisant principalement sur ceux impliqués dans l'homéostasie des métaux.

3.3.2 Le système σ_E chez *E. coli*

La protéine σ_E d'*E. coli* entraîne la réponse au stress d'enveloppe induite par le mauvais repliement des protéines de la membrane externe (Mecsas *et al.*, 1993). 69 promoteurs sont contrôlés par σ_E, parmi lesquels ceux qui agissent sur le repliement des protéines d'enveloppe, ainsi que ceux qui codent DegP, une protéase périplasmique, RseP une protéase intramembranaire et σ_E lui-même (Bury-Moné *et al.*, 2009).

σ_E est co-exprimé avec RseA, le facteur anti-sigma qui lui est associé, RseB, une protéine soluble dont l'un des domaines interagit avec RseA et RseC qui ne semble par avoir d'effet direct sur la réponse au stress d'enveloppe (De Las Peñas *et al.*, 1997; Missiakas *et al.*, 1997). Ce système de régulation est l'un des plus étudiés parmi ceux utilisant un facteur σ_{ECF}. Il emploie des mécanismes de protéolyse afin de libérer σ_E, et ainsi permettre la transmission de l'information de part et d'autre de la membrane (Ades, 2004).

La protéase ancrée à la membrane DegS est la protéine senseur du système. Libre, elle est inactive. Son interaction avec la séquence tripeptidique YxF, marqueur du stress d'enveloppe parce qu'elle est exposée par les protéines de la membrane externe mal repliées, stabilise son site actif et induit son activité protéolytique (Wilken *et al.*, 2004). Elle clive alors la partie périplasmique de RseA (Sohn *et al.*, 2007).

RseP est une métalloprotéase à zinc qui clive aussi RseA. A l'état basal, son activité est inhibée par son interaction avec une région périplasmique riche en glutamines de RseA. Lorsque DegS est activée et coupe la partie périplasmique de RseA, cela lève l'inhibition de RseP qui devient active à son tour. RseP coupe alors RseA au niveau de l'hélice membranaire (Kanehara *et al.*, 2002, 2003). RseA, toujours liée à σ_E, est libérée dans le périplasme où elle est prise en charge par la protéine SspB qui la marque pour être le substrat de la protéase ClpXP.

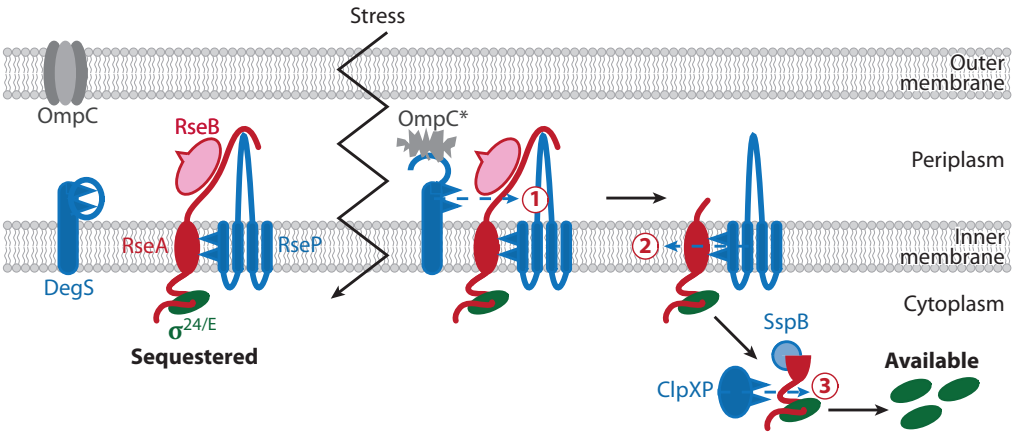


Figure 3.3.1 – Illustration schématique de la cascade protéolytique permettant la libération de σ_E . Les étapes de la protéolyse sont indiquées de 1 à 3. (1) RseA est, dans un premier temps, clivée par DegS dont l'activité protéolytique est induite par la fixation de polypeptides provenant de protéines de la membrane externe et qui sont des marqueurs de la présence de protéines mal repliées (comme OmpC*). (2) L'hélice transmembranaire de RseA est, dans un second temps, protéolysée par RseP. (3) La dernière étape de protéolyse menée par ClpXP dans le cytoplasme conduit, dans un troisième temps, à la libération de σ_E (Osterberg *et al.*, 2011).

ClpXP procède à la dernière étape de protéolyse qui permet la libération finale de σ_E [Figure 3.3.1](Flynn *et al.*, 2004).

Tout ce système est inhibé en amont par RseB qui interagit avec la partie périplasmique de RseA. Cette interaction augmente sa stabilité (Ades *et al.*, 1999) et empêche sa protéolyse par DegS (Cezairliyan et Sauer, 2007). La structure de RseB a mis en evidence une homologie importante entre un de ses domaines et des protéines capables de lier les ancres lipidiques des lipoprotéines (Wollmann et Zeth, 2007).

Deux événements conjoints sont donc indispensables pour activer σ_E : l'activation de DegS par le tripeptide YxF et la levée de l'inhibition de RseB par un signal lipidique (Chaba *et al.*, 2011).

3.3.3 La régulation de l'import de fer

Le métabolisme de la majorité des micro-organismes repose sur le fer qui est présent dans les centres redox des hèmes, dans les protéines fer-soufre et dans des enzymes cytoplasmiques essentielles. L'ion Fe^{3+} est presque totalement insoluble. Le fer est donc très peu biodisponible dans les environnements riches en oxygène où il est présent sous forme trivalente. En conséquence, la bactérie va synthétiser des composés qui séquestrent directement le fer (les sidérophores) ou les hèmes (les hémophores).

L'import de ces composés dans la cellule s'opère par un transporteur de la membrane externe qui, dans certains cas, est également un détecteur capable de signaler la présence de fer assimilable

à la cellule par l'intermédiaire d'un facteur σ_{ECF} à la cellule (Mettrick et Lamont, 2009). Ces systèmes sont d'autant plus étudiés qu'il a été montré chez certaines bactéries pathogènes, qu'ils étaient liés à l'expression de la virulence (Ratledge et Dover, 2000). En effet le fer est l'objet d'une compétition entre les organismes vivants, tous ayant des systèmes plus ou moins sophistiqués pour le solubiliser et le séquestrer. Le succès de l'infection et de la colonisation d'un hôte par un pathogène bactérien dépend donc aussi de l'issue de cette compétition pour le fer. L'étude des mécanismes d'appropriation du fer par les pathogènes bactériens est primordiale pour disséquer des étapes vulnérables du processus infectieux et mettre au point ainsi de nouvelles drogues anti-bactériennes.

3.3.3.1 Transport du fer *via* des sidérophores

Le système Fec chez *E. Coli* : Le système Fec est impliqué dans l'acquisition du fer dicitrate chez *E. coli*. C'est actuellement un des systèmes d'importation du fer le mieux compris chez les bactéries à Gram négatif et il constitue également une des descriptions les plus avancées sur l'induction transcriptionnelle *via* un facteur σ_{ECF} .

Le régulon *fec* est composé de sept gènes contigus et de deux promoteurs. En aval de P_{fecA} se trouvent les gènes *fecABCDE* qui interviennent directement dans l'import du fer à partir de l'environnement et, en aval de P_{fecI} se trouvent les gènes *fecI* et *fecR* impliqués dans la régulation du système [Figure 3.3.2].

FecA est le récepteur du fer dicitrate, il est situé dans la membrane externe et transporte son substrat dans le périplasme de manière dépendante de la protéine TonB [voir section 2.2.1 page 28]. FecB est une protéine périplasmique, FecC, FecD et FecE sont des protéines membranaires. Ensemble elles prennent en charge le sidérophore pour le transporter à travers la membrane cytoplasmique jusque dans la cellule [Figure 3.3.2] (Braun, 1997). Parallèlement à son activité de transport, FecA est aussi la protéine senseur, qui en fonction des concentrations de fer dans l'environnement, peut déclencher une cascade de signalisation dont l'objectif est la régulation de l'opéron *fecABCDE* (Härle *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997). En plus de FecA, deux protéines sont nécessaires au mécanisme de signalisation : FecI, le facteur σ_{ECF} et FecR, le facteur anti-σ, une protéine transmembranaire dont l'extrémité amino-terminale est située dans le cytoplasme et la partie carboxy-terminale dans le périplasme (Braun, 1997).

La protéine FecA est composée d'un tonneau de brins β, d'un domaine bouchon dans la lumière de ce tonneau et d'un domaine de signalisation amino-terminal. Ce dernier, flexible et entièrement périplasmique interagit avec FecR. La fixation du fer dicitrate sur cette protéine induit de nombreux changements de conformation qui permettent aux brins de se refermer sur le sidérophore et qui agissent sur la structure du domaine de signalisation [Figure 3.3.2] (Ferguson *et al.*, 2002, 2007). Ces dernières modifications ont été décrites par résonance magnétique nucléaire (RMN), toutefois la manière dont FecR reçoit le signal et la façon dont il le transmet à

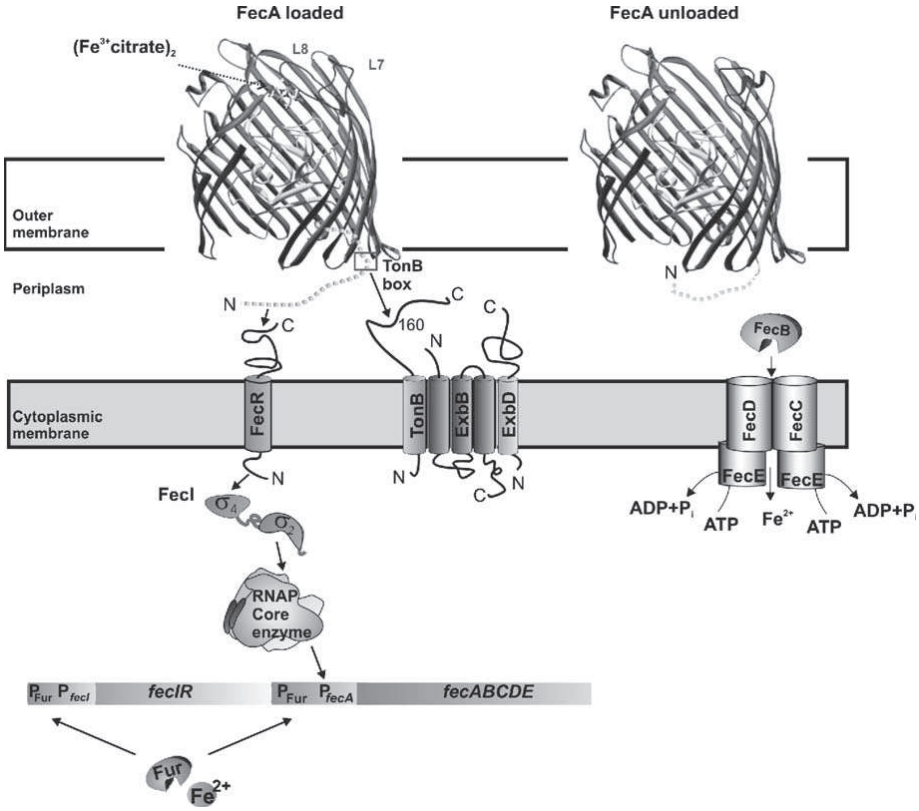


Figure 3.3.2 – Le transport du fer dicitrate et son système de régulation. La protéine FecA et le complexe TonB importent le fer dicitrate dans le périplasme, où il est ensuite pris en charge par FecB, FecC, FecD et FecE, qui le transportent dans le cytoplasme. De plus, par des changements conformationnels, FecA conduit FecR à relâcher FecI, qui peut ensuite se fixer à l'ARN polymérase et activer la transcription de *fecABCDE*. Toutefois, lorsque du fer est déjà présent dans le milieu, Fur réprime *fecIR* et *fecABCDE* (Braun *et al.*, 2006).

FecI n'ont pas été découvertes (Braun *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2007). Contrairement à RseA pour σ_E, la présence de FecR est indispensable pour une activité maximale de FecI. Il est en effet possible que le complexe FecR :FecI :ARN polymérase initie la transcription des gènes et, dans ce cas FecR aurait une fonction définie comme "pro" sigma dans son état actif (Ochs *et al.*, 1995; Mettrick et Lamont, 2009)

Il est intéressant de noter que les gènes de type *fecIR* ne sont pas autorégulés contrairement à d'autres groupes de gènes codants pour des facteurs σ/anti-σ (comme *rseA/rpoE*). Ils sont soumis à l'influence d'un autre régulateur : le métallorégulateur Fur, [un homologue de Nur voir section 3.1.4 page 46] (Angerer et Braun, 1998). C'est un régulateur central de l'homéostasie du fer chez les bactéries à Gram négatif qui, lorsqu'il interagit avec Fe^{2+}, réprime notamment la transcription de *fecIR* (Escolar *et al.*, 1999). De cette façon, même en présence d'une forte concentration extracellulaire de fer dicitrate, il empêche toute mise en place du système d'importation *fecABCDE* (Braun *et al.*, 2006).

Les systèmes d'import de sidérophore chez *Pseudomonas aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa* sécrète deux sidérophores, la pyoverdine et la pyocheline, et peut utiliser de nombreux sidérophores produits par d'autres organismes (Poole et McKay, 2003). Jusqu'à présent, il a été montré que 35 récepteurs dépendants de TonB pouvaient transporter des sidérophores et ils constitueraient donc autant de voies alternatives pour approvisionner la cellule en fer, toutes construites sur le modèle de FecA. Onze des gènes codants pour ces récepteurs sont situés près de gènes qui sont prédits pour coder un facteur σ et un facteur anti-σ. Il est probable que ces séries représentent des systèmes de signalisation transmembranaires, répondant à la présence d'un sidérophore spécifique en induisant l'expression du transporteur approprié (Cornelis *et al.*, 2009; Mettrick et Lamont, 2009).

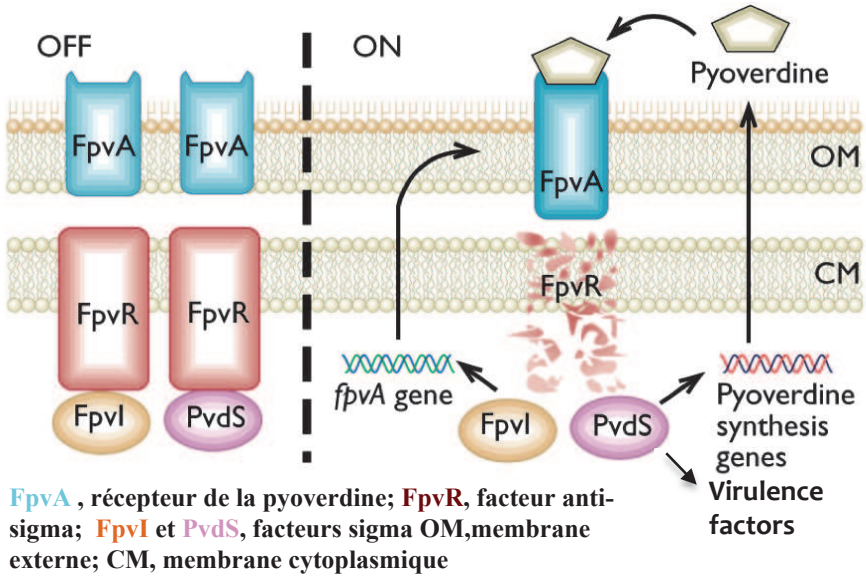


Figure 3.3.3 – Schéma de la cascade de signalisation initiée par la liaison de la pyoverdine à son récepteur. Etat de repos (off) : FpvR est lié aux facteurs σ PvdS et FpvI, et inhibe leur activité. Etat activé (on) : lorsque la pyoverdine se lie au récepteur FpvA, un signal est transmis qui conduirait à la protéolyse de FpvR. Cela libère PvdS et FpvI qui induisent l'expression des gènes codant pour FpvA, et d'autres facteurs de virulence (d'après Iain Lamont, communication personnelle).

L'exemple le mieux connu est FpvA, récepteur de la pyoverdine. Son interaction avec la pyoverdine induit la production de FpvA et de la pyoverdine elle-même. Quatre protéines sont mises en jeux dans cette cascade de signalisation : FpvA, le récepteur de la pyoverdine, FpvR, le facteur anti-σ, FpvI, le facteur σ qui contrôle la transcription de *fpvA* et PvdS un autre facteur σ, qui est un des régulateurs centraux des gènes de virulence de cette bactérie et qui permet la synthèse de la pyoverdine (Beare *et al.*, 2003; Tiburzi *et al.*, 2008). Lorsque la pyoverdine, chargée en fer, est transportée par FpvA, cela pourrait déclencher la protéolyse de FpvR, entraînant la libération des deux facteurs sigma qui lui sont associés, PvdS et FpvI (Imperi *et al.*, 2008). C'est le seul exemple de système de régulation "ramifié" connu jusqu'à présent (Potvin *et al.*, 2008).

Des analyses bioinformatiques couplées à des analyses génétiques ont démontré l'existence d'autres systèmes de ce type chez *Pseudomonas aeruginosa* : les facteurs sigma suivants PA0149, PA1912, PA2050, PA2093, PA4896, PA1912 induisent l'expression de récepteurs dont les gènes sont situés à proximité du locus de régulation (facteurs sigma/anti-sigma). Les récepteurs induits possèdent tous une longue extrémité amino-terminale (Llamas *et al.*, 2008) qui constitue le domaine de signalisation de ce type de protéines (Kim *et al.*, 1997) et une séquence d'interaction avec TonB ("*TonB Box*"). Il est donc probable que ces récepteurs soient impliqués dans des systèmes de signalisation, stimulés par la présence de sidérophores ou du métal approprié (zinc/manganèse) (Llamas *et al.*, 2008).

D'autres systèmes de régulation de récepteurs transportant des sidérophores exogènes ont été caractérisés plus en détail. Le ferrichrome et la ferrioxamine sont deux sidérophores qui appartiennent à la famille des hydroxamates. Chez *Pseudomonas aeruginosa,* le ferrichrome est transporté par le récepteur FiuA et la ferrioxamine l'est par FoxA (Llamas *et al.*, 2006). La boucle de régulation est la même que pour le système *fec* : en présence du sidérophore associé, FoxA et FiuA transmettent un signal aux facteurs anti-σ FoxR et FiuR qui activent à leur tour les facteurs σ FiuI et FoxI dont les rôles sont d'augmenter l'expression des récepteurs (Mettrick et Lamont, 2009). Comme dans le cas de FecR, ils auraient une activité "pro" sigma et il est possible que FiuR et FoxR aient, soit un rôle de chaperon pour FiuI et FoxI, soit qu'elles augmentent l'affinité du facteur σ pour l'ARN polymérase.

3.3.3.2 Transport du fer *via* des hémophores chez *Serratia marcescens*

Serratia marcescens, une enterobactérie, importe le fer non pas sous forme de sidérophore mais d'hémophore (protéine fixant l'hème). Les hémophores aussi appelés HasA forment une nouvelle famille d'hémoprotéines sans homologie avec d'autres protéines connues. Leur rôle biologique est de capter l'hème de différentes hémoprotéines et de le délivrer à un récepteur spécifique HasR (Wandersman et Delepelaire, 2004).

Les gènes du système *has* de *S. marcescens* sont organisés en opéron : *hasRADEB* [Figure 3.3.4]. Cet opéron comprend les gènes qui codent HasR le récepteur, HasA l'hémophore, HasD et HasE deux des trois protéines permettant la sécrétion de l'hémophore et HasB un paralogue de TonB [voir section 2.2.1 page 28](Ghigo *et al.*, 1997). Il est réprimé par Fur en présence de fer. En amont de cet opéron se trouvent deux gènes régulateurs *hasI* et *hasS* localisés dans une autre unité de transcription et codant respectivement pour le facteur σ_{ECF} HasI (30,3% de similarité avec la séquence de FecI) et son facteur anti-σ associé HasS (23,9% de similarité avec FecR). Comme *fecIR*, ils ne sont pas autorégulés mais leur transcription est inhibée par la forme métallée fer de la protéine Fur (Rossi *et al.*, 2003).

Comme pour Fec, le mécanisme détaillé de la transduction du signal reste inconnu. On sait seulement que la fixation de l'hémophore chargé d'hème sur le récepteur HasR inactive l'anti-

sigma et permet à HasI d'initier la transcription de l'opéron *has*. La fixation de l'hème seul sur HasR n'induit pas son expression. Contrairement aux systèmes présentés auparavant, HasS l'anti-sigma est lui-même régulé positivement par HasI et par conséquent soumis à la même cascade d'induction déclenchée par la fixation de l'hémophore chargé par l'hème (holo-HasA) sur son récepteur. Ceci montre que le système Has est régulé positivement et négativement par la présence d'hème. Quand il y a assez d'hème, HasS s'accumule sous une forme inactive (car inhibée par HasR) qui devient instantanément active dès que HasR n'est plus occupé par holo-HasA (Rossi *et al.*, 2003).

Les bases du transfert de l'hème de HasA à HasR sont mieux connues. Lorsque holo-HasA se lie sur HasR, l'hème est spontanément transféré sur le site de liaison de HasR (Izadi-Pruneyre *et al.*, 2006). HasB, paralogue à TonB, fournit l'énergie nécessaire à HasR pour importer l'hème dans le périplasme (Benevides-Matos *et al.*, 2008). Les structures de HasA :HasR et HasA :HasR :hème sont identiques. Elles ne permettent donc pas de conclure sur la nature du signal transmis par HasR à HasS lorsqu'il fixe l'hème. Soit la transduction du signal ne s'effectue pas par un changement conformationnel, soit les structures résolues à 3 Å ne rendent pas compte des changements minimes nécéssaires pour activer HasR, soit enocre HasR passe par d'autres états allostériques, différents de ceux cristallisés (Krieg *et al.*, 2009).

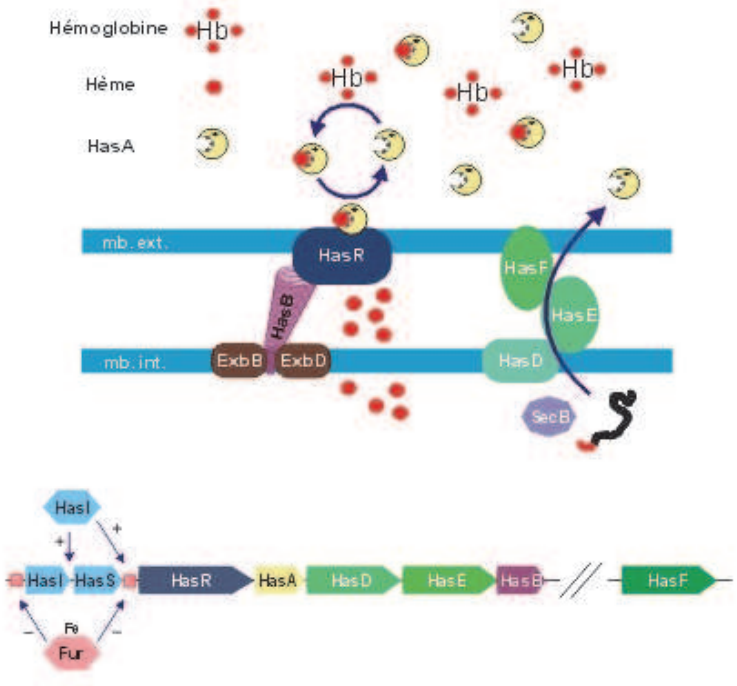


Figure 3.3.4 – Le système Has . En haut : l'hémophore HasA est exporté par les protéines HasD, HasE et HasF dans l'environnement, où il interagit avec les hèmes présents. Il se fixe ensuite sur HasR qui importe l'hème dans le périplasme par un mécanisme qui dépend de HasB. En bas : l'opéron *has* et les régulations auquel il est soumis. (http ://www.pasteur.fr/recherche/unites/Mbbact/recherche-01.html)

Chapitre 4

Le déterminant *cnr* de *Cupriavidus metallidurans* CH34

L'étude de la voie de signalisation CnrYXH impliquée dans la régulation de la résistance au cobalt et au nickel chez *C. metallidurans* CH34 est la principale thématique de recherche de notre équipe. C'est un système original, dont les homologues connus existent principalement chez des protéobactéries de l'environnement [voir section 4.2.2.1 page 68], mais qui représente aussi un archétype des cascades de signalisation utilisant un facteur σ_{ECF}, un des mécanismes majeurs de transduction du signal chez les bactéries (Staroń *et al.*, 2009).

Après avoir fait une description sommaire de CH34 et de ses nombreux systèmes de résistance aux métaux lourds, je décrirai plus particulièrement les recherches menées sur l'opéron *cnr* et sur la protéine CnrX dont la caractérisation spectroscopique et structurale des sites métalliques est l'objectif de mon travail de thèse.

4.1 *Cupriavidus metallidurans* CH34

4.1.1 Description générale

Depuis la révolution industrielle, de nouvelles niches écologiques sont apparues suite au rejet dans l'environnement de déchets toxiques constitués souvent d'un mélange de métaux, de composés organiques et d'hydrocarbures. Ces biotopes sont considérés comme extrêmes vu la présence abondante et chronique de rejets toxiques, les limitations en nutriments organiques et les fluctuations importantes de température et d'hygrométrie. Seuls certains organismes capables d'adaptation peuvent survivre et recoloniser de tels environnements.

Cupriavidus metallidurans souche CH34, d'abord connue sous le nom de *Alcaligenes eutrophus* (Mergeay *et al.*, 1985), *Ralstonia sp.*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans* (Goris *et al.*, 2001), et *Wautersia metallidurans* (Vaneechoutte *et al.*, 2004) a été isolée pour la première fois en 1976 dans les sédiments provenant d'une usine de traitement de métaux non-ferreux près

de Liège (Mergeay *et al.*, 1978). *C. metallidurans* est une bactérie du sol, à Gram négatif, appartenant à la famille des β-protéobactéries et naturellement sélectionnée dans ces environnements industriels fortement pollués (Diels et Mergeay, 1990). Elles comporte un chromosome de 3,9 Mb, un mégaplasmide (ou minichromosome) de 2.6 Mb et deux plasmides : pMOL28 de 177Kb et pMOL30 de 233 Kb (Mergeay *et al.*, 1985). Les cellules ont une forme ovale (0.4 µM de diamètre et 1 à 2 µM de longueur) avec un flagelle et se présentent sous forme simple, par paire ou en courte chaîne [Figure 4.1.1].

Figure 4.1.1 – Cellules de *C. metallidurans* CH34

D'abord caractérisée comme résistante au Zn(II) (les sédiments dans lesquels elle a été découverte avaient une teneur en Zn(II) de l'ordre de 10000 µg/g), au Cd(II) et au Co(II), CH34 a ensuite démontré des résistances au Ni(II), au Cu(II), au CrO_4^{2-}, au Hg(II), au Pb(II) et au Se(IV). Des bactéries privées de leur plasmides ont permis de montrer que les déterminants de la résistance aux métaux pouvaient être situés sur le chromosome bactérien ou dans les deux plasmides pMOL28 ou pMOL30 (Mergeay *et al.*, 1985; Nies *et al.*, 1989; Diels et Mergeay, 1990; Roux *et al.*, 2001).

4.1.2 Intérêt biotechnologique de *C. metallidurans* CH34

Certaines propriétés de cet organisme en font un bon candidat pour des applications environnementales, en effet cette bactérie peut dégrader diverses substances aromatiques telles que le

toluène, le benzène, l'o-xylène ou l'éthylbenzène et pourrait donc être utilisée pour le traitement de sols pollués (Diels *et al.*, 2009). CH34 peut également être exploitée afin de mettre en place des biosenseurs permettant de suivre la concentration en métaux lourds dans les sols (van der Lelie *et al.*, 1994; Tibazarwa *et al.*, 2001).

4.1.3 Les systèmes de résistance aux métaux lourds

Le séquençage du génome complet de *C. metallidurans* CH34 a permis de faire l'inventaire des gènes de résistance aux métaux lourds (Janssen *et al.*, 2010). Comme on peut le voir sur le tableau 4.1 où sont présentés une liste de ces gènes, les déterminants de résistance aux métaux lourds sont principalement situés sur les deux plasmides pMOL28 et pMOL30.

4.1.3.1 Déterminants situés sur le chromosome et sur le méga-plasmide

Le chromosome ne comporte que le groupe de gènes *cupCAR* où *cupA* code un homologue de la protéine CopA d'*E. coli* [voir section 2.3.1.1 page 32] (Monchy *et al.*, 2006), ainsi que les gènes codant pour les protéines CDF FieF et DmeF orthologue de YiiP [voir section 2.3.1.2 page 34] (Munkelt *et al.*, 2004). Le méga-plasmide comprend les gènes c*usCBA*, homologues aux gènes *cus* d'*E. coli* [voir section 2.3.2 page 35], les gènes *zntBCIA* et *copSRABCD* qui codent des protéines impliquées dans l'efflux du zinc et du cuivre (Monchy, 2007).

Emplacement	Opérons	Métaux	Mécanisme de résistance	Références
Chromosome	cup	Cuivre	Efflux	(Monchy *et al*, 2006)
	fieF	Fer/Zinc	Efflux	(Munkelt *et al*, 2004)
	dmeF	Cobalt/Nickel	Efflux	
Mégaplasmide	znt	Zinc	Efflux	(Monchy, 2007)
	cop/cus	Cuivre	Efflux	
pMOL28	cnr	Co^{2+}/Ni^{2+}	Efflux	(Liesegang *et al*, 1993)
	chr	$Cr0_4^{2-}$	Efflux	(Juhnke *et al.*, 2002)
	mer	Hg^{2+}	Réduction	(Mergeay, 2000)
pMOL30	czc	Cobalt/Zinc/Cadmium	Efflux	(Nies, 1995)
	cop	1,7 µM	Efflux	(Mergeay, 2000)
	pbr	180 µM	Efflux	(Borremans *et al*, 2001)
	mer	0,5 µM	Réduction	(Mergeay, 2000)

Tableau 4.1 – Les déterminants de résistance aux métaux de *C. metallidurans* CH34

4.1.3.2 Déterminants situés sur le plasmide pMOL30

Le plasmide pMOL30 comprend le locus *pbrTRABCD* codant pour la résistance au plomb (Borremans *et al.*, 2001), l'opéron *merRTPADE* qui intervient dans la défense contre les ions mercure [voir section 2.4.4 page 38] et l'opéron *copSRABCD* impliqué dans l'efflux des ions cuivre (Mergeay, 2000). Il contient de plus les gènes *czcNICBADRSE* qui codent la pompe CzcCBA, un système d'efflux RND de type HME [voir section 2.3.2 page 35] (Nies, 1995), CzcD une protéine CDF (Anton *et al.*, 1999), CzcRS un système à deux composants régulant la transcription des gènes *czcCBA (Grosse* et al.*, 1999)*, CzcE une protéine périplasmique dont il a été montré qu'elle était spécifique du cuivre (Zoropogui *et al.*, 2008), CzcI et CzcN dont la fonction est inconnue. Adjacent à ce locus, le gène *czcP* code une ATPase de type P (Scherer et Nies, 2009). pMOL30 inclut aussi l'opéron *ncc* impliqué dans la résistance au *n*ickel*, c*obalt et *c*admium. .Il est silencieux dans CH34 par suite d'une mutation introduisant un décalage du cadre de lecture (Nies *et al.*, 2006). silencieux dans la souche CH34. Ce déterminant, qui possède de fortes homologies avec l'opéron *cnr* décrit dans la partie suivante, existe également dans la souche 31A sur le plasmide pTOM9 où il est fonctionnel [voir section 4.2.2.1 page 68] (Schmidt et Schlegel, 1994).

4.1.3.3 Déterminants situés sur le plasmide pMOL28

Le plasmide pMOL28 contient trois groupes de gènes impliqués dans la résistance aux métaux. Le déterminant *merRTPADE* aussi présent sur pMOL30, le groupe de gènes *chrBACEF* qui code la resistance aux ions chromates (Juhnke *et al.*, 2002) et *cnrYXHCBAT* qui fait l'objet d'une présentation détaillée dans la partie suivante.

4.2 Le système Cnr

Le déterminant *cnrYXHCBAT* se situe sur le plasmide pMOL28 et intervient dans la mise en place de la résistance au nickel et au cobalt (Liesegang *et al.*, 1993).

Le tableau 4.2 indique la concentration minimale inhibitrice (CMI) [1] pour le nickel et le cobalt de différentes souches de CH34 (Mergeay *et al.*, 1985; Liesegang *et al.*, 1993). La CMI du nickel est de 2,5 mM et celle du cobalt de 25 mM. Rappelons ici que les concentrations de ces ions dans l'eau de mer, l'environnement de référence, ne sont respectivement que de 92 et 47,2 nM [voir tableau 1.5]. *C. metallidurans* CH34 est donc capable de survivre dans des milieux à assez forte teneur en nickel (27 fois plus élevée que celle du milieu de référence) et en présence de concentrations considérables de cobalt (530 fois plus élevée).

1. Rappel : concentration minimale inhibitrice (CMI), la plus faible concentration en métal suffisante pour inhiber *in vitro* la croissance des bactéries.

Sans plasmide, on ne peut plus considérer CH34 comme résistante à ces métaux et les valeurs de CMI (0,6 mM pour le nickel et 0,07 mM pour le cobalt) sont en deçà de celles d'*E. coli* (1 mM) [voir tableau 1.5]. Les déterminants de résistance sont donc placés sur l'un ou/et l'autre des plasmides.

La souche qui ne comporte que pMOL30, n'est pas capable de survivre en présence d'excès de nickel (CMI de 0,6 mM), tandis que sa capacité à résister au cobalt est restaurée à 80%. En effet si pMOL30 ne contient pas de déterminant de résistance au nickel, il comprend l'opéron *czc* qui code des protéines impliquées dans l'efflux du cobalt/zinc/cadmium [Tableau 4.1, section 4.1.3.2 page précédente].

Les souches qui ne possèdent que pMOL28 ou uniquement le déterminant *cnr* porté par un plasmide produit par génie génétique, ont des CMI identiques. Elles ont recouvré leur capacité totale à résister au nickel et partielle au cobalt (20%). *cnr,* localisé sur pMOL28, est donc l'unique déterminant qui confère à CH34 l'aptitude de survivre en présence de fortes concentrations de nickel. La résistance au cobalt, toutefois, est assurée de concert par *cnr* et *czc* localisés sur les deux plasmides.

Souche	Nickel (mM)	Cobalt (mM)
CH34	2.5	25
AE104 (CH34 sans plasmides)	0.6	0.07
AE104+pMOL30	0.6	20
AE104+pMOL28	2.5	5
AE104 + *cnr*	2.5	5

Tableau 4.2 – Concentration minimale inhibitrice de nickel et de cobalt pour différentes souches de *C. metallidurans* CH34 (d'après Mergeay *et al.* (1985); Liesegang *et al.* (1993)).

Le déterminant *cnr* est composé de deux unités transcriptionnelles : (i) les gènes de résistance *cnrCBAT* qui codent un système d'efflux RND de type HME [voir section 2.3.2 page 35] et une pompe CDF et (ii) les gènes de régulation *cnrYXH* qui codent un système de régulation dépendant d'un facteur σ_{ECF} . La transcription du déterminant *cnr* est initiée au niveau des deux promoteurs *CnrYp* en amont de *cnrYXH* et *CnrCp* en amont de *cnrCBA* résultant en un ou deux transcrits polycistroniques [Figure 4.2.2] (Grass *et al.*, 2000).

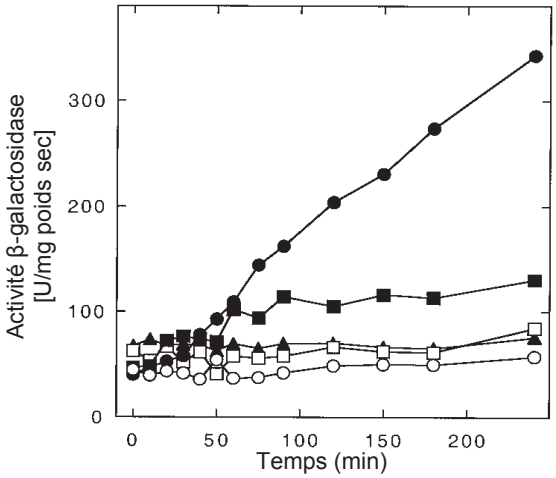
Depuis sa découverte, diverses études en génétique et en microbiologie ont exploré le fonctionnement de la régulation de *cnrCBA* par CnrYXH.

4.2.1 Régulation de l'expression de *cnrCBA*

L'expression de la pompe d'efflux n'est pas constitutive, elle est induite par la présence de certains métaux spécifiques dans le milieu extérieur.

La figure 4.2.1 montre les résultats d'une expérience de mesure de l'activité β-galactosidase d'une souche CH34 recombinante contenant la fusion *cnrCBA-lacZ* en présence de différents

métaux. Lorsque la bactérie est cultivée en absence de métaux, on mesure une activité β-galactosidase basale (≈ 60 U/mg) qui ne fluctue pas en fonction du temps. En présence de zinc ou de chromate l'activité est peu modifiée (≈ 80-90 U/mg) et reste similaire pendant toute la durée de l'expérience. En présence de 0,5 mM de cobalt, elle augmente légèrement entre 50 et 100 min puis se stabilise aux alentours de 120 U/mg. Le nickel à 0,5 mM engendre une augmentation considérable de l'activité β-galactosidase (jusqu'à 350 U/mg) et cette activité n'est toujours pas stabilisée à la fin de l'expérience (250 minutes). L'ion nickel est donc le meilleur inducteur de *cnrCBA* avant le cobalt qui est, rappelons-le, aussi pris en charge par les protéines codées par le déterminant *czc*. Le zinc et les ions chromates n'ont aucun effet sur l'expression de la pompe [Figure 4.2.1] (Grass *et al.*, 2000).



Les bactéries sont cultivées en absence de métaux (○), ou en présence de 0,5mM Ni^{2+} (●), de 0,5mM de Co^{2+} (■), de 0,3mM de Zn^{2+} (□) ou 0,1mM de potassium de chromate (▲).

Figure 4.2.1 – Induction de l'expression de *cnrCBA*. *C. metallidurans* CH34, ne contenant que le plamide pMOL28-1 [Figure 4.2.2], est cultivée dans les différentes conditions précisées sur la figure. Les métaux sont ajoutés dans le milieu après 4h de culture (Grass *et al.*, 2000).

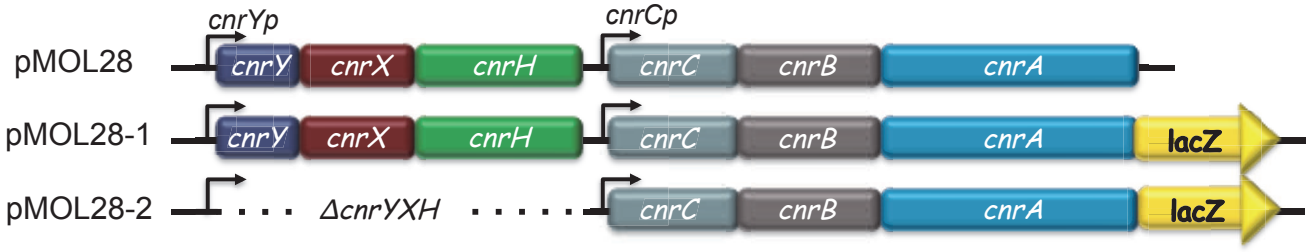


Figure 4.2.2 – Carte des plasmides utilisés dans les expériences de cette section

4.2.1.1 Le système de régulation CnrYXH

Une expérience du même type que celle de la section précédente a été réalisée avec une souche de CH34 contenant *cnrCBA-lacZ* et délétée des gènes *cnrYXH* [Figure 4.2.3] (Grass *et al.*, 2000). Cette souche a été complémentée par une combinaison d'un ou plusieurs des gènes *cnrYXH* et l'activité β-galactosidase résultante est mesurée en absence et en présence de nickel.

Sans *cnrYXH*, l'activité β-galactosidase basale est deux fois plus faible (28 U/mg) que dans le contrôle sans la délétion (62 U/mg). La présence de nickel n'induit pas d'activité supplémentaire. L'expression de *cnrCBA* n'est donc pas constitutive et dépend des protéines CnrYXH

La présence des trois gènes est nécessaire pour restaurer un taux d'activité presque normal et l'inductibilité par le nickel.

L'expression individuelle ou couplée de *cnrX* et de *cnrY* dans la souche $\Delta cnrYXH$ conduit à une faible activité basale de la β-galactosidase ($\approx$ 35 U/mg) et l'ajout de nickel n'induit aucune activité supplémentaire. Au contraire *cnrH*, seul ou en présence de *cnrX* ou de *cnrY,* entraîne une forte production de la β-galactosidase (activité multipliée par 60 par rapport au contrôle) mais cette activitée n'est pas augmentée en présence de nickel. CnrH est donc un activateur constitutif de l'expression de la pompe.

La régulation de l'expression des gènes *cnrCBA* nécessite donc l'expression simultanée des trois protéines CnrY, CnrX et CnrH.

Ce sont ces travaux de génétique qui ont permis d'établir un modèle pour le fonctionnement de CnrYXH.

CnrH est une protéine de 21kDa (191 résidus) qui appartient à la famille des σ_{ECF} et comme eux, elle ne possède que deux des quatre régions (σ_2 et σ_4) caractéristiques des facteurs σ [voir 3.3.1]. Sa capacité à se lier sur les promoteurs *cnrYp* et *cnrCp* à été démontrée *in vivo* grâce à l'utilisation d'un gène rapporteur en aval des promoteurs présumés. (Grass *et al.*, 2005).

CnrY est une protéine de 10kDa (95 résidus). Elle contient un domaine cytoplasmique amino-terminal (45 acides aminé, aa) qui précède un domaine transmembranaire (20 aa) et un domaine périplasmique dans sa partie carboxy-terminale (30 aa). Sans homologue connu, elle se comporte comme le facteur anti-σ de CnrH car certains de ses mutants agissent comme des activateurs constitutifs de l'expression de la pompe (Grass *et al.*, 2000; Liesegang *et al.*, 1993).

CnrX est une protéine de 13kDa (148 résidus). Elle possède un domaine soluble carboxy-terminal (113 aa), localisé dans le périplasme, qui est précédé par un domaine transmembranaire (23 aa) dans sa partie amino-terminale. Elle serait la protéine senseur du système qui détecterait la présence des métaux grâce à certains de ses résidus histidines localisés sur son grand domaine périplamique (Grass *et al.*, 2000, 2005). Nous décrirons en détail les recherches menées sur cette protéine dans une section entièrement dévolue à CnrX [section 4.2.2 page 68].

Le mécanisme détaillé de la transduction du signal reste inconnu. Comme pour les autres voies de régulation impliquant un facteur σ_{ECF}, il est probable qu'en absence de stress CnrH

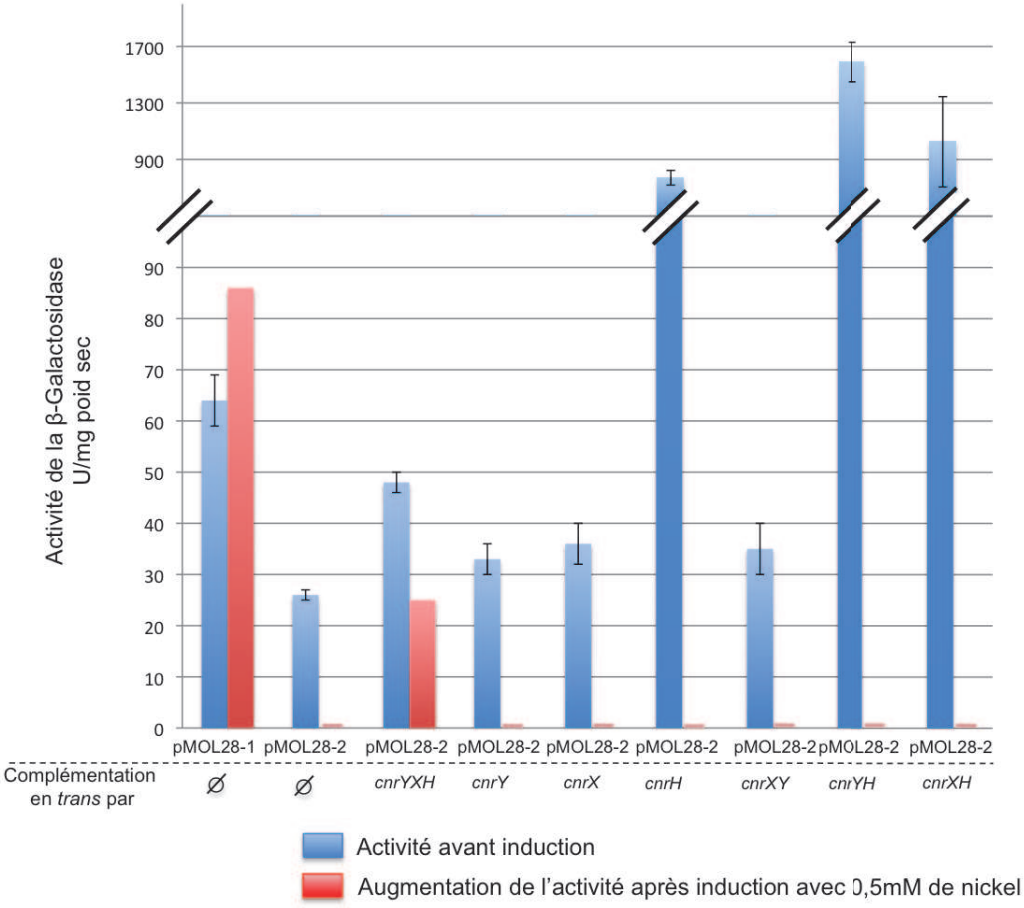


Figure 4.2.3 – Expression de *cnrCBA-lacZ* dans différentes souches mutantes de CH34 (souche AE104 [voir tableau 4.2] + pMOL28-2 [Figure 4.2.2]). Les barres de couleur bleue représentent l'activité β-galactosidase mesurée à t=0 avant l'ajout de métal. Le nickel est ajouté dans le milieu de culture au moment de la phase exponentielle précoce. Les barres de couleur rouge correspondent à la valeur de l'augmentation de cette activité mesurée pendant 3 heures après l'ajout de nickel, d'après Grass *et al.* (2000).

soit séquestré par le complexe membranaire CnrYX. La fixation du métal sur CnrX va, selon toute vraisemblance, conduire CnrY à relâcher CnrH qui s'associe alors à l'ARN polymérase. Le complexe se fixe ensuite à *cnrYp* et *cnrCp* et transcrit les gènes de la pompe et les gènes de régulation [Figure 4.2.4] (Grass *et al.*, 2000; Tibazarwa *et al.*, 2000).

La description de ce système de régulation est limitée et quand ce travail de thèse a débuté, aucun travail de caractérisation approfondie *in vitro* n'avait été publié sur le système Cnr. S'agit-il d'une voie de signalisation de type σ_E ou FpvI pour lesquelles l'information est transmise *via* un ou plusieurs événements protéolytiques ? Ou plutôt un mécanisme de type Fec qui met en jeux des changements de conformation ? Ou encore CnrYXH définit-il un nouveau modèle de transduction du signal ? Un début de réponse portant sur la nature du signal déclenché par la détection des métaux, sera apportée par ce travail de thèse.

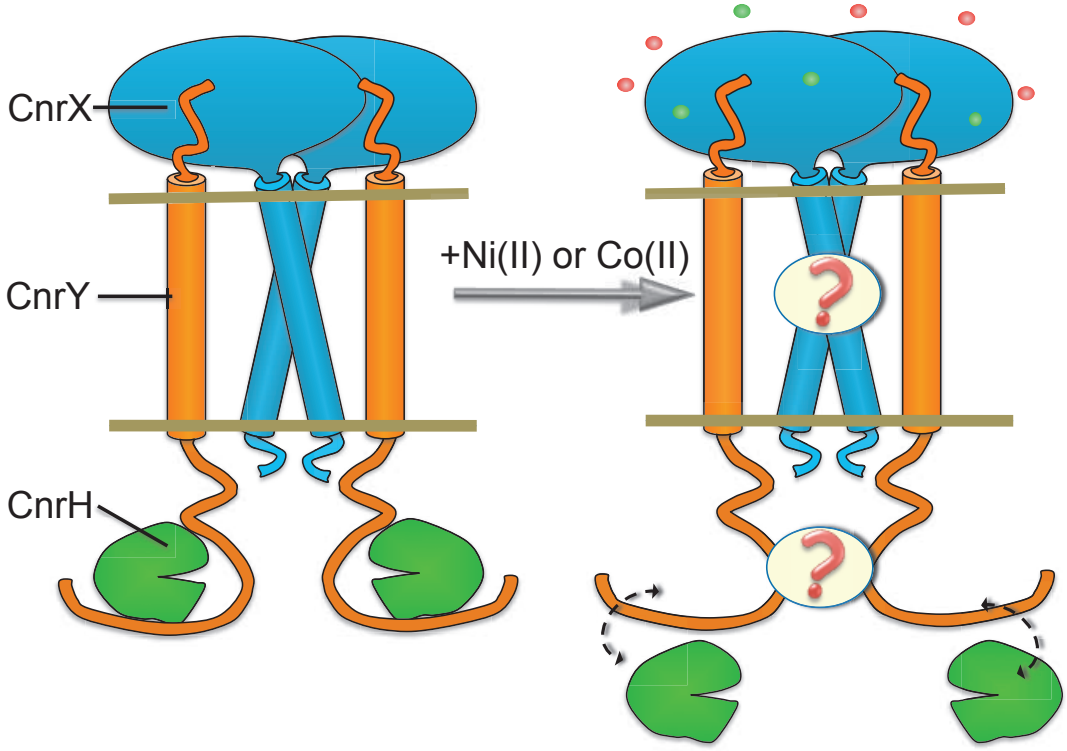


Figure 4.2.4 – Représentation schématique du complexe CnrYXH au repos et dans son état activé. Au repos, CnrY emprisonne CnrH du coté cytoplasmique de la membrane interne. La présence de nickel ou de cobalt va être détecté par CnrX qui, par un mécanisme inconnu, va conduire CnrY à relâcher CnrH.

4.2.1.2 Induction du système par les métaux

Des expériences de transcriptomique ont été menées pour mesurer le taux d'induction des gènes de l'opéron en fonction de la présence de différents métaux dans le milieu de culture [Tableau 4.3].

Tous les gènes de l'opéron *cnr* sont surexprimés lorsque CH34 est cultivée en présence de cadmium, de cuivre et de nickel. Au contraire, le mercure, le zinc et le cobalt ne sont pas des métaux inducteurs dans cette étude. Les résultats concernant le cobalt sont toutefois ambigus puisque 2 gènes sur 6 (*cnrB* et *cnrA)* sont fortement surexprimés et que ces données sont en opposition avec les études décrites précédemment qui (i) ont identifiées *cnr* et *czc* comme des déterminants de résistance au cobalt [voir section 4.2 page 62] et, (ii) qui ont montré que le cobalt était un ion inducteur de *cnr* [4.2.1 page 63].

On peut comparer les données sur *cnrH* de cette étude avec des expériences de qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) sur l'induction de *cnrH* en fonction des différents métaux [Tableau 4.4] (Grosse *et al.*, 2007). *cnrH* est induit en présence de nickel, de cobalt, de cuivre, de cadmium mais pas de zinc. Les résultats sont donc similaires à ceux de Monchy *et al.* (2007) exceptés pour le cobalt , un métal inducteur dans ce travail de transcriptomique, ce qui confirme son implication dans la régulation de *cnr*.

Gène	Taux d'expression des gènes						
	Zn	Cd	Cu	Ni	Pb	Hg	Co
cnrY	1,3	4,8	6,6	12,2	1,9	1,3	-1,1
cnrX	1,4	4,0	6,8	10,2	2,0	1,2	1,7
cnrH	2,4	3,9	8,3	3,7	NA	1,6	1,1
cnrC	1,2	NA	6,7	2,2	1,6	1,2	-1,3
cnrB	1,5	2,3	7,3	5,9	2,3	1,3	5,2
cnrA	-1,4	4,8	7,4	7,3	2,3	1,3	5,5

Tableau 4.3 – Analyse de l'expression des gènes *cnr*. Les métaux sont ajoutés au milieu pendant la phase exponentielle précoce aux concentrations suivantes : 0,4mM Pb(II), 0,6 mM Cd(II), 2 mM Co(II), 0,8 mM Zn(II), 5μM Hg(II) et 0,1 mM Cu(II). Après 30 minutes, les bactéries sont centrifugées, leur ARN est extrait et analysé par RT-PCR et puce à ADN. Les valeurs notées en rouge correspondent à des gènes surexprimés plus de deux fois (Monchy *et al.*, 2007).

Gène	Zn(II)	Cu(II)	Cd(II)	Co(II)	Ni(II)
CnrH	0,9±0,4	6,6±3,9	4,6±1,8	5,8±2,0	14,5±9,9

Tableau 4.4 – Transcription du gène *cnrH* après induction par certains métaux. *C. metallidurans* CH34 est traité pendant 10 min avec ou sans métal (concentration : 0,3 mM). L'ARN est isolé et analysé par des expériences de qRT-PCR. Les résultats sont présentés sous la forme du quotient de la quantité d'ARN en conditions induites par rapport aux conditions non induites (Grosse *et al.*, 2007).

4.2.2 La protéine CnrX

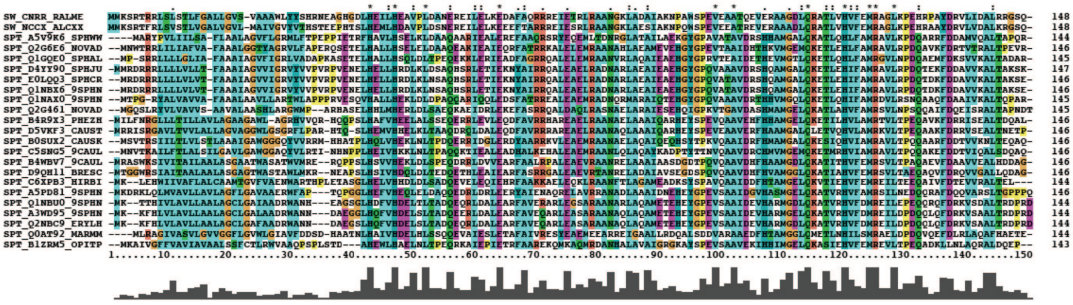
L'objectif principal de notre équipe est de comprendre les événements qui modulent la séquestration de CnrH par CnrXY et, plus spécifiquement comment la fixation des métaux sur CnX entraîne la libération de CnrH par CnrY. Dans le cadre de cette thèse nous avons caractérisé l'étape initiale de la signalisation ; à savoir, les bases moléculaires de la perception du stress métallique par le domaine senseur de CnrX.

4.2.2.1 Séquence de CnrX

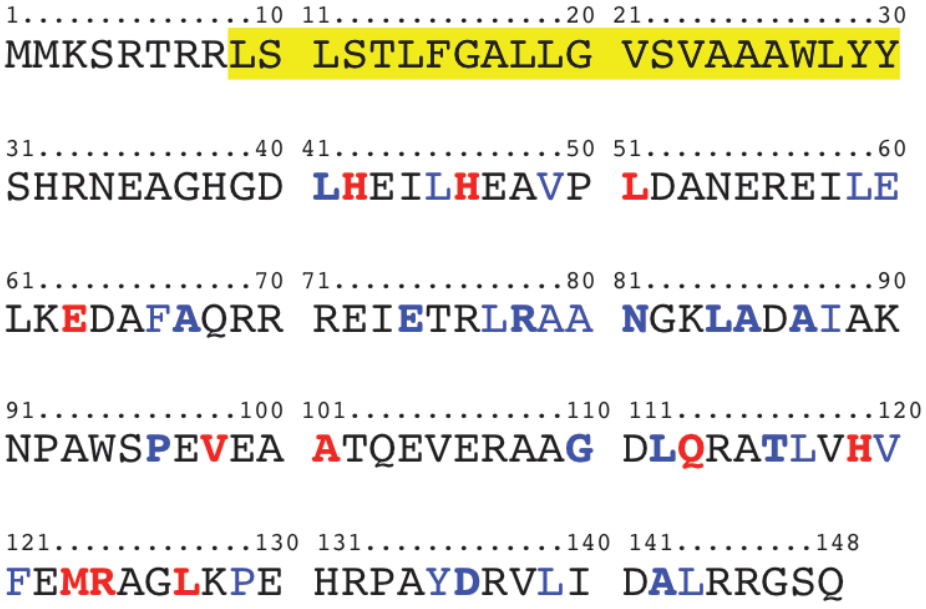
D'après les outils de prédiction de topologie, CnrX serait une protéine composée d'un grand domaine périplasmique et d'une hélice transmembranaire qui l'ancre dans la membrane cytoplasmique [pour plus de détails, voir section 6.2 page 106].

En recherchant dans les bases de données de séquences (http ://bips.u-strasbg.fr/PipeAlign/), on trouve 22 protéines homologues à CnrX dont NccX de *C. metallidurans 31A* [voir section 4.1.3.2 page 62]. Les 21 autres protéines ne sont pas caractérisées mais proviennent toutes, comme CnrX, de protéobactéries de l'environnement [Figure 4.2.2.1].

CnrX est un senseur de métal, mais elle ne possède aucune cystéine contrairement à la majorité des enzymes et des métallorégulateurs que nous avons décrits ([NiFe]-hydrogenase, SOD, CODH, NHase, NikR et RcnR). Toutefois, une méthionine est présente et fait partie avec 10 autres résidus des acides aminés strictement conservés dans les 23 séquences. Parmi eux, on compte 3 résidus histidine (His42, His46 et His119) sur 6 présents dans la séquence de CnrX. On sait que les histidines sont fréquemment utilisées comme ligands par les ions métalliques dans les protéines. Cette conservation indiquerait que CnrX est le membre fondateur d'une nouvelle famille de senseur de métaux (Pompidor *et al.*, 2008).



(a)



(b)

Figure 4.2.5 – Séquence de CnrX. (a) Alignement de séquence des 23 protéines apparentées à CnrX (dont CnrX) produit par PipeAlign (Plewniak *et al.*, 2003). Les protéines sont identifiées par leur code SwissProt sur la gauche. L'alignement est mis en forme par le programme ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). (b) Analyse de la séquence de CnrX d'après l'alignement présenté dans la sous-figure (a). Les 11 résidus strictements conservés sont identifiés en rouge. Les résidus en bleus ont un fort degré de conservation dans les 23 séquences, ceux en gras ont plus de 90% d'identité (pas plus de 2 différences dans les 23 séquences). La séquence surlignée en jaune est prédite pour former une hélice transmembranaire par le logiciel TMHMM [voir section 6.2 page 106]

Un motif HExxH (résidus 42 à 46) est présent dans cette séquence. Il est la signature d'un type de protéases à zinc qui sont impliquées dans différents mécanismes de régulation. Elles sont ainsi connues pour leur capacité à protéolyser le domaine intra-membranaire des facteurs anti-σ permettant ainsi la libération des facteurs σ (Gomis-Rüth, 2003; Heinrich et Wiegert, 2009) . Ce motif n'est pas totalement conservé chez tous les homologues.

La protéine comporte également dans sa partie transmembranaire la séquence consensus GxxxG, connue pour intervenir dans les interactions entre des hélices transmembranaires (Senes *et al.*, 2004) et qui pourrait permettre à la protéine CnrX de former un dimère. Ce motif n'est conservé que dans la séquence de NccX.

4.2.2.2 Etudes préliminaires sur CnrX

Le rôle des 6 histidines de la séquence de CnrX a été caractérisé *in vivo* par des expérience de mutagenèse. Les résultats sont présentés dans la figure 4.2.6.

Une expérience du même type que celle de la section 4.2.1a été réalisée avec une souche de CH34 contenant *cnrCBA-lacZ* et délétée des gènes *cnrYXH.* Cette souche a été complémentée par les gènes *cnrYXH* contenant différentes mutations sur *cnrX* et, l'activité β-galactosidase résultante a été mesurée en absence et en présence de nickel [Figure 4.2.6] (Grass *et al.*, 2005). L'activité β-galactosidase et donc le taux d'induction de *cnrCBA* diminue lorsque les histidines H42/H46 et H119/H131 sont mutées. Au contraire, la mutation en arginines des histidines H32 et H38 non conservées augmente l'expression basale de l'opéron mais n'altère pas le niveau d'induction. Ces résultats sont confirmés par la mesure des CMI qui est drastiquement diminuée par les doubles mutations H42R/H46R et H119R/H131R mais n'est pas modifiée par H32R/H38R. Sur les 6 histidines de CnrX, il y en a donc quatre, dont 3 strictement conservées chez tous les homologues (His42, His46 et His119), qui sont essentielles pour l'induction de *cnr* et donc potentiellement pour la détection du métal.

4.2.2.3 Caractérisation de la protéine CnrXs

Avant mon arrivée, une forme soluble de la protéine ne comportant que le domaine senseur de métaux périplasmique, appelée CnrXs, avait été produite chez *E. coli*, purifiée et cristallisée afin d'en obtenir la structure tridimensionnelle (Pompidor *et al.*, 2009).

La protéine est dimérique et forme un enchevêtrement d'épingles à cheveux entièrement constituées d'hélices [Figure 4.2.7]. Les premières préparations de CnrXs étaient contaminées par une quantité négligeable de cuivre. Sur les quatre dimères présents dans l'unité asymétrique, un représente la forme nue (apo) et trois représentent des formes métallées dont les sites ne sont que partiellement occupés par le Cu^{2+} contaminant. Cela a permis de caractériser un site métallique composé de 3 résidus histidine (His42, His46 et His119) et d'un résidu glutamate (Glu63) accompagnés par un ligand axial inattendu à savoir le soufre du thioéther de la méthionine (Met123)

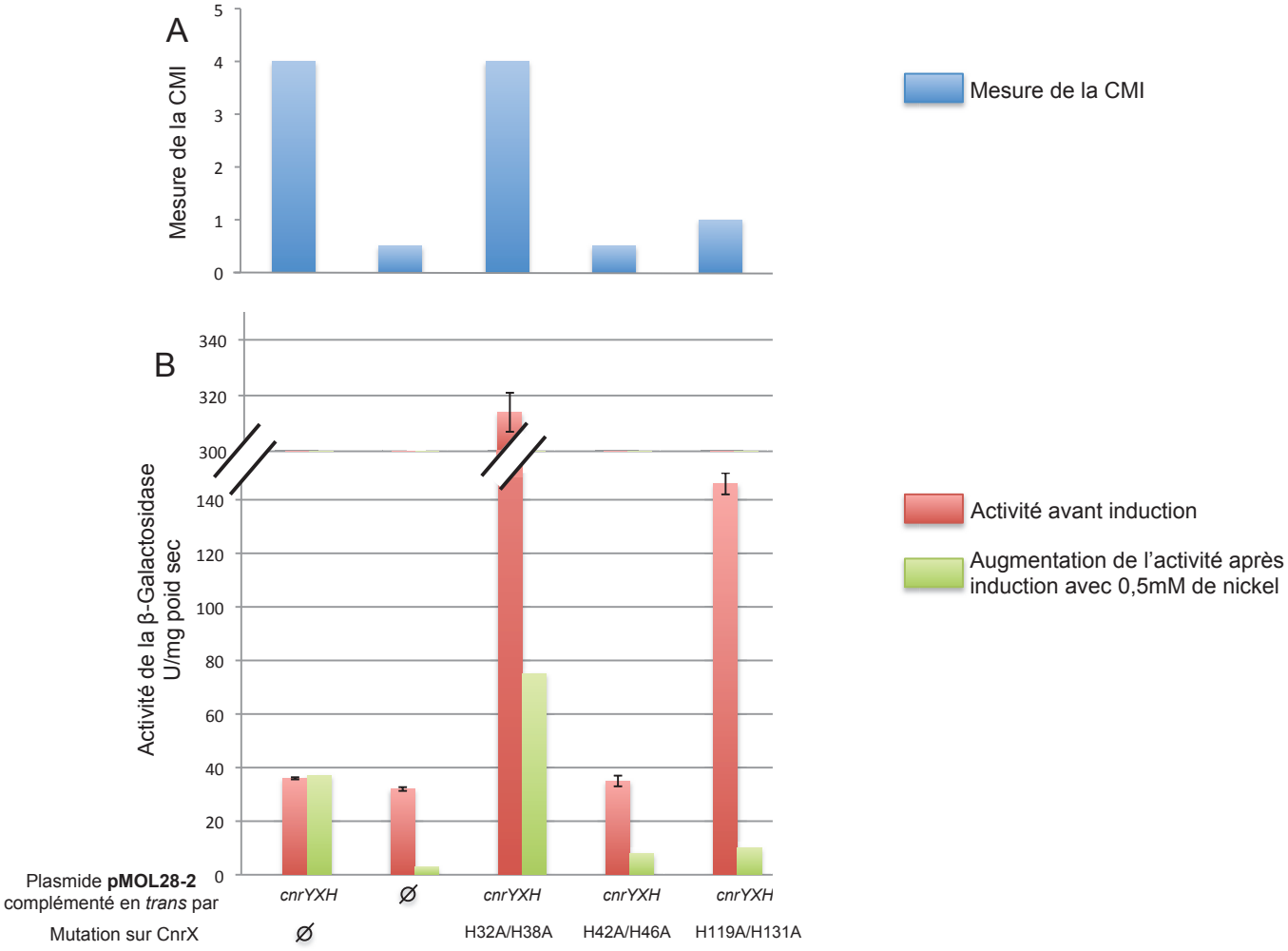
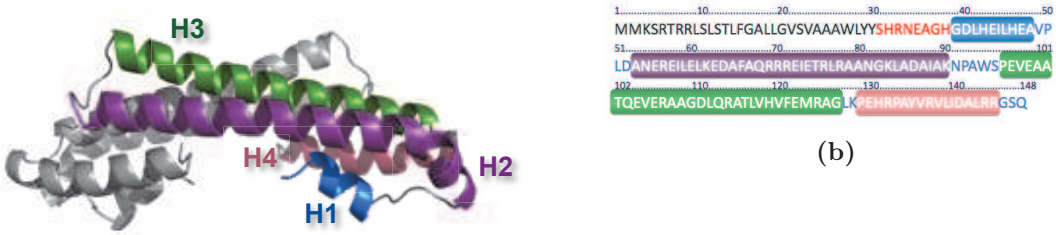


Figure 4.2.6 – Expression de *cnrCBA-lacZ* dans différentes souches mutantes de DN190 (souche AE104 [voir tableau 4.2] + pMOL28-2). (A) Mesure de la CMI déterminée sur milieu solide. (B) Les barres de couleur rouge représentent l'activité β-galactosidase mesurée à t=0 avant l'ajout de métal. Le nickel est ajouté au milieu de culture au moment de la phase exponentielle précoce. Les barres de couleur verte correspondent à la valeur de l'augmentation de cette activité mesurée pendant 3 heures après l'ajout de nickel, d'après Grass *et al.* (2000).



(a) (b)

Figure 4.2.7 – Structure et séquence de CnrXs. (a) Structure de CnrXs. (b) Séquence de CnrXs : la protéine a été exprimée à partir de la sérine 31. Code couleur : H1 en bleu, H2 en violet, H3 en vert et H4 en rouge. Les résidus en rouge n'apparaissent pas sur la structure.

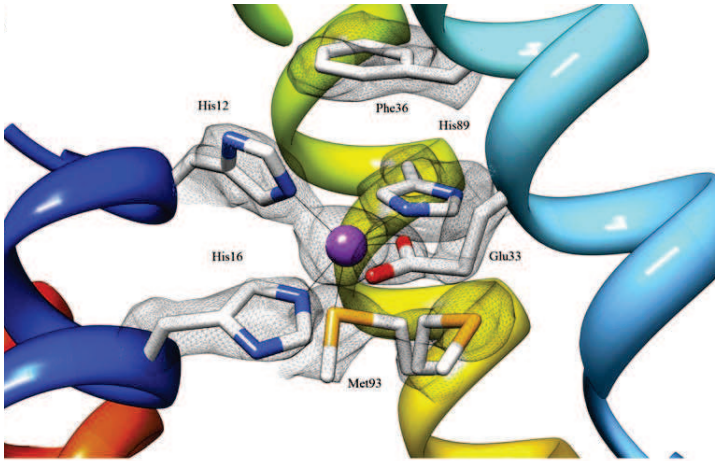


Figure 4.2.8 – Site de liaison au metal de CnrXs. L'ion cuivre est en violet, H1, H2 et H3 sont colorées respectivement en bleu, cyan et jaune (Pompidor *et al.*, 2008)

[Figure 4.2.8]. Ces 3 histidines ligands avait été démontrées comme indispensables à la régulation de *cnr* par les expériences de Grass *et al.* (2005). Tous les acides aminés ligands du métal sont strictement conservés chez les 22 homologues de CnrXs, attestant une fois de plus que CnrX pourrait être le prototype structural d'une nouvelle famille de senseur de métaux.

En résumé, le site métallique semble préformé dans la forme sans métal (apo) et il ne semble pas y avoir de modification conformationnelle associées à la métallation de CnrXs par le cuivre. Après la détermination de ces structure, le mécanisme de détection du stress métallique par CnrX ainsi que la nature du signal transmis était toujours inconnus. [Figure 4.2.9] (Pompidor *et al.*, 2008).

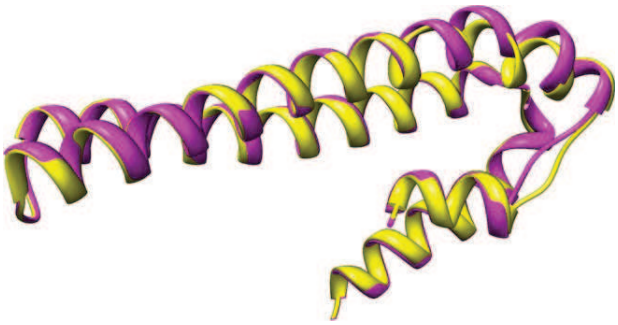


Figure 4.2.9 – Superposition de CnrXs-apo (jaune) et de CnrXs liée au cuivre (magenta) .

Deuxième partie

Matériels et méthodes

Chapitre 5

Matériels et méthodes

5.1 Production et purification des protéines d'intérêts

5.1.1 Milieu de culture

Le milieu complet LB (Luria-Bertani) est utilisé pour la culture d'*E. coli*. Il est composé de 10 g.L^{-1} de NaCl ; 10 g.L^{-1} de bacto-tryptone ; 5 g.L^{-1}d'extraits de levures. Il peut être utilisé sous forme liquide ou solide après ajout de 15% d'agar. Les antibiotiques sont ajoutés, s'il y a lieu, aux concentrations finales suivantes : ampicilline (100 µg.mL^{-1}), kanamycine (50 µg.mL^{-1}) et chloramphénicol (34 µg.mL^{-1}).

Le milieu M9 est utilisé pour la production de protéines contenant des sélénométhionines. Pour 940 mL d'eau, on ajoute 6,78 g de Na_2HPO_4, 3 g de KH_2PO_4, 0,5 g de NaCl, et 1 g de NH_4Cl. Cette solution de sels est ensuite additionnée par 2 mL de $MgSO_4$ (1 M), 20 mL de glucose 20%, 100 μL de $CaCl_2$ (1 M) et 40 mL de thiamine (5 mg.mL^{-1}).

Les cellules de *C. metallidurans* CH34 sont cultivées dans un milieu de culture minimum appelé milieu 284 où la source de carbone est le gluconate (Mergeay, 1995; Monchy, 2007). Sa composition est donnée dans le tableau 5.1. Le milieu est ajusté à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique, puis autoclavé. Les solutions stériles d'ions métalliques sont ajoutées au milieu de culture aux concentrations adéquates.

5.1.2 Souches bactériennes et plasmides

La protéine CnrXs et ses mutants sont produits à partir de gènes clonés dans le plasmide pET30-b (Novagen). Le plasmide pET30-b confère la résistance à la kanamycine. L'expression des gènes clonés dans le site de clonage multiple (MCS) est régulée par un promoteur du phage T7 qui est inhibé par le répresseur LacI. L'ajout d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) dans le milieu de culture permet de lever l'inhibition et de transcrire les gènes du MCS.

Les souches d'*E. coli* XL10 Gold (Agilent) sont utilisées pour les étapes de clonage.

Tris	50 mM
NaCl	80 mM
KCl	20 mM
NH_4Cl	20 mM
Na_2SO_4	3 mM
$MgCl_2.6H_20$	1 mM
$CaCl_2.6H_20$	0,2 mM
$Na_2HPO_4.6H_20$	0,4% (v/v)
$Fe(III)NH_4$citrate	1%(v/v)
Eléments traces	
HCl	10 µM
$ZnSO_4.7H_2O$	0,5 µM
$MnCl_2.4H_2O$	0,5 µM
H_3BO_3	1 µM
$CoCl_2.6H_2O$	0,8 µM
$CuCl_2.2H_2O$	0,1 µM
$NiCl_2.6H_2O$	0,1 µM
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,15 µM

Tableau 5.1 – Composition du milileu de culture 284

Les souches d'*E. coli* BL21(DE3) sont utilisées pour l'expression des protéines recombinantes.

5.1.3 Mutagenèse dirigée de CnrXs

CnrXs est la partie périplasmique de la protéine CnrX. Son clonage dans le vecteur d'expression pET30b a été réalisé à partir de l'ADN plasmidique de cette bactérie (Pompidor *et al.*, 2009).

Les mutations H32A, H42A, E63Q, M123A et H131A ont été réalisées en utilisant le kit de mutagenèse dirigée QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent). Le double mutant CnrXs H32A/H123A a été obtenu par deux mutagenèses dirigées successives.

Mélange des composants pour la réaction de polymérisation en chaîne : L'amplification d'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) est réalisée avec le mélange suivant :

- 2 µL de chaque oligonucléotide [Tableau 5.2] dilué à 100 ng/µL dans de l'eau distillée stérile
- 4 µL de plasmide matrice à 5 ng/µL
- 1 µL de dNTP
- 5 µL de QuikChange Lightning Buffer
- 1,5 µL de QuikSolution
- qsp 50 µL d'eau distillée stérile

Protocole d'amplification de l'ADN :

Dénaturation : 95°C, 30 sec

Mutation		Amorces
CnrXs-E63Q	Sens	5' GC GAG ATT CTT GAG TTG AAA CAA GAT GCC TTT GCG C 3'
	Anti-sens	5' G CGC AAA GGC ATC TTG TTT CAA CTC AAG AAT CTC GC 3'
CnrXs-H42A	Sens	5' GCC GGA CAT GGT GAC TTG GCT GAA ATC CTG CAC GAA GC 3'
	Anti-sens	5' GC TTC GTG CAG GAT TTC AGC CAA GTC ACC ATG TCC GGC 3'
CnrXs-H131A	Sens	5' G GGC CTG AAG CCG GAA GCT CGA CCT GCT TAC 3'
	Anti-sens	5' GTA AGC AGG TCG AGC TTC CGG CTT CAG GCC C 3'
CnrXs-M123A	Sens	5' GAC CTT GGT TCA CGT GTT TGA AGC GCG TGC GGG CC 3'
	Anti-sens	5' GG CCC GCA CGC GCT TCA AAC ACG TGA ACC AAG GTC 3'
CnrXs-H32A	Sens	5' A GGA GAT ATA CAT ATG TCG GCT CGG AAT GAA GCC GGA CAT 3'
	Anti-sens	5' ATG TCC GGC TTC ATT CCG AGC CGA CAT ATG TAT ATC TCC T 3'

Tableau 5.2 – Séquence des oligonucléotides utilisés pour générer les mutants de CnrXs. Les bases mutées sont soulignées.

Dénaturation : 95°C, 30 sec
Hybridation : 55°C, 1 min 18 cycles
Elongation : 68°C, 10 min

Elongation : 68°C, 10 min

Digestion La matrice d'ADN obtenue est digérée 1 heure à 37°C par 2 µL de l'enzyme de restriction Dpn1. On utilise ensuite le mélange pour transformer des cellules compétentes XL10 Gold (Agilent) selon un protocole décrit dans la section 5.1.6.

5.1.4 Clonage de NccXs

5.1.4.1 Amplification du gène d'intérêt

L'ADN plasmidique de *C. metallidurans* 31A sert de matrice pour l'amplification par PCR du gène *nccXs* à partir des amorces oligonucléotidiques suivantes :

5' -CGG *CAT ATG* ACC CAT TCG ACG GAG GAA CCC CAC ACA AGT CTT CAC G-3'
NdeI

5' -CCC *GGA TCC* TCA CTG CGA GCC ACG TTT GAG AGC GTC CAC CAG AAC -3'
BamHI

On réalise l'amplification d'ADN par PCR avec le mélange suivant :
– 3 µl de chaque oligonucléotide dilué à 100 ng/µL dans de l'eau distillée stérile

- 1 µl de plasmide matrice à 5 ng/µL
- 1 µL de dNTP à 10 mM
- 10 µL de tampon de Pfu polymérase 10X (Stratagène)
- 2 µl de Pfu polymérase à 2,5 U/µl (Stratagène)
- qsp 50 µl d'eau distillée stérile

Le protocole d'amplification de l'ADN est :

Dénaturation : 95°C, 3 min

Dénaturation : 95°C, 45 sec	
Hybridation : 50°C, 1 min	30 cycles
Elongation : 72°C, 1 min 15 sec	

Elongation : 72°C, 3 min

5.1.4.2 Purification d'ADN et digestion du plasmide et de l'insert

Les produits de PCR sont purifiés au moyen du kit «QIAquick PCR Purification» (Qiagen). L'élution est faite avec 25 µL d'eau distillée stérile.

Le plasmide de destination (pET-30b) et le produit de la PCR sont ensuite digérés séparément avec les enzymes de restriction BamHI et NdeI dans les proportions suivantes :

- 10 µL de plasmide pET-30b ou 50 µL du produit PCR purifié
- 2 µL de chaque enzyme BamHI ou NdeI à 10 U/µL (Fermentas)
- 6 µL de tampon de digestion BamHI
- qsp 60 µL d'eau distillée stérile

Les deux mélanges sont incubés 4 h à 37°C puis chaque échantillon est purifié sur colonne avec le « QIAquick PCR Purification » (Qiagen). L'élution est faite par 25 µL d'eau distillée stérile.

5.1.4.3 Ligation de l'ADN

Le gène d'intérêt est finalement inséré dans le plasmide avec le « Rapid ligation kit » de Fermentas. Après quantification relative des espèces à ligaturer, le mélange réactionnel a été composé comme suit :

- 8 µL de vecteur
- 2 µL d'insert
- 4 µL de Tampon de DNA ligase 5X
- 5 µL d'eau distillée stérile
- 1 µl de T4 DNA ligase à 5 U/µL (Fermentas)

Le mélange est incubé 1 h à température ambiante avant d'être utilisé pour transformer des cellules compétentes XL10 Gold (Stratagen®) par un protocole décrit dans la section 5.1.6. Les

plasmides des transformants selectionnés sur un milieu additionné d'antibiotiques sont purifiés et chaque mutation est validée par séquençage.

5.1.5 Clonage de NccX

Comme pour NccXs, le fragment d'ADN codant pour NccX est amplifié par PCR. Ce fragment contient également des sites de restriction qui seront utilisés pour le sous-clonage dans le vecteur d'expression pET30b. Les deux amorces figurent dans le tableau 5.3.

	Amorces
Sens	5' GGGCATATG*ATGAAATCCCGCACGTTTCGTCTGTCGGTGTCGACGCTGG* 3'
Anti-sens	5' CCCGGATCCTCACTGCGAGCCACGTTTGAGAGCGTCCACCAGAAC 3'

Tableau 5.3 – Amorces utilisées pour le clonage de NccX. Sur l'amorce sens, les nucléotides en italique codent pour la séquence aminoterminale native du gène. La séquence soulignée porte le codon initiateur et peut être coupée par l'enzyme de restriction NdeI. L'amorce anti-sens comporte un site de restriction BamHI et un codon stop.

La PCR, la purification du plasmide, les digestions du plasmide et du vecteur et la ligation sont effectuées comme expliqué dans le paragraphe 5.1.4.

5.1.6 Transformation

Que ce soit dans le cas des mutagenèses dirigées ou des clonages, les plasmides d'intérêt purifiés sont introduits dans les différentes souches bactériennes décrites ci-dessus. Un aliquote d'environ 70 µl d'*E.coli* (XL-10 Gold ou BL21(DE3)) est transformé avec 1 µl de plasmide pET-30b contenant le gène d'intérêt. Le mélange est incubé pendant 30 min dans la glace avant d'être soumis à un choc thermique d'1 minute à 42 °C. On ajoute ensuite 200 µl de milieu LB puis on incube le mélange pendant 1 h à 37°C. Le contenu du tube est ensuite étalé sur deux boîtes de Pétri additionnées en kanamycine (50 µg/ml). Les bactéries sont incubées à 37°C toute la nuit.

5.1.7 Expression et purification des protéines solubles

Toutes les cultures sont effectuées à 37°C et sous agitation à 220 rpm. Tous les dérivés de CnrXs sont purifiés selon le même protocole.

5.1.7.1 Culture et expression

Un clone d'*E.coli* (BL21(DE3)) transformé par le plasmide pET-30b contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt est mis en culture dans 30 mL de milieu LB enrichi en kanamycine (kn) pendant une nuit. Le lendemain, cette culture permet d'inoculer 1 L de milieu LB/kn. La croissance des bactéries est suivie par l'absorbance à 600 nm. Lorsque A_{600} atteint 0,4-0,6

l'expression de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG (0,4 mM). Les bactéries sont centrifugées après 3 h de culture pendant 20 min à 6000 rpm à 4°C. Les culots sont lavés avec 20 ml de 50 mM d'HEPES pH8, 100 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA et centrifugés à 4800 rpm pendant 20 min. Les culots peuvent être conservés à -80 °C.

Production de CnrXs sélénométhionylée : Les cellules issues d'une préculture de *E. coli* transformées avec le plasmide pET-30b-CnrXs sont centrifugées pendant 15 minutes à 4°C. Elles sont ensuite resuspendues dans 50 mL de milieu M9/kn et cultivées pendant une journée et une nuit à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 15 minutes à 4°C, puis resuspendues et ensemencées dans un litre de milieu M9/kn. Lorsque $A_{600nm} = 0{,}6$, le milieu est additionné par 20 mL de Lys/Phe/Thr à 5 mg/mL, de 10 mL de Ile/Leu/Val à 5 mg/mL et de 100 mg de Se-Met (Van Duyne *et al.*, 1993). Après une heure de culture, l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (0,5 mM). Les bactéries sont ensuite cultivées pendant toute la nuit avant d'être récoltées de la même façon que dans le paragraphe précédent.

5.1.7.2 Lyse cellulaire

Chaque culot issu d'une culture de 1 L est décongelé et resuspendu dans 20 mL de tampon de lyse (50 mM d'HEPES pH 8, 100 mM de NaCl , 2 mM d'EDTA, anti-protéases (Complete, Roche, 1 tablette/50 mL)). Les cellules sont lysées par sonication (3 min efficaces : 5 secondes de sonication active / 15 secondes de refroidissement ; amplitude 40%) et centrifugées à 45 000 rpm (rotor TI70 - Beckman) pendant 90 min à 4°C. Le surnageant est incubé avec 2% de sulfate de streptomycine pendant une heure sous agitation à 4 °C pour précipiter les acides nucléiques avant de centrifuger 20 min à 10 000 rpm à 4°C (rotor F0850 - Beckman). Les protéines sont ensuite précipitées par 80% de sulfate d'ammonium pendant 1 h sous agitation à 4°C. Après centrifugation de 20 min à 10 000 rpm à 4 °C (rotor F0850 - Beckman), le culot peut être stocké à -80 °C.

5.1.7.3 Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions

Le culot obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium est repris dans 5 mL de tampon A (50mM d'Hepes pH 8, 2 mM d'EDTA) puis dialysé contre du tampon A sur 18 heures (limite : 3 500 Da) afin d'éliminer le sulfate d'ammonium. Le volume de dialyse est 100 fois supérieur au volume de l'échantillon. Le bain de dialyse est changé 3 fois, au bout de 3h minimum.

La première étape de purification utilise la chromatographie par échange d'anions pour séparer les protéines produites par *E. coli* : l'échantillon est injecté (0,5 $mL.min^{-1}$) sur une colonne Q sepharose (HiTrap-HP, 5 mL, GE Healthcare) préalablement équilibrée en tampon A. La colonne est lavée par 5 volumes de colonne (Column Volume : CV) de tampon A à 1 $mL.min^{-1}$. La protéine est éluée par un gradient linéaire de 0 à 10% de tampon B (50 mM d'Hepes pH 8, 2 mM d'EDTA

, 1 M de NaCl). Les fractions à retenir sont choisies d'après les chromatogrammes (absorbance à 280 nm) et les analyses électrophorétiques en conditions dénaturantes. Les fractions retenues sont concentrées jusqu'à un volume final de 2 mL par ultrafiltration sur cellule Diaflo équipée d'une membrane YM-10 (limite de taille 10kDa, Amicon).

5.1.7.4 Filtration sur gel

La seconde et dernière étape de purification consiste à injecter l'extrait de protéine (2 mL) sur une colonne de tamisage moléculaire Superdex 75 (XK26/60, 120 mL, GE Healthcare) préalablement équilibrée en 50 mM de Hepes pH 8, 100 mM de NaCl . Les protéines sont éluées dans ce même tampon à un débit de 0,8 mL.min^{-1} et les fractions éluées sont vérifiées par l'absorbance à 280 nm et analysées sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Les fractions sont concentrées par ultrafiltration comme précédemment jusqu'à obtenir un volume final de 1 à 2 mL. La protéine est stockée à -80 °C.

5.1.8 Purification de NccX

Le culot des bactéries ayant produit NccX est resuspendu dans un tampon A composé de 50 mM d'Hepes pH 7,5, de 500 mM de NaCl , de 10 mM de $MgCl_2$, d'un mélange d'antiprotéases (Complete, Roche, 1 tablette/50 mL) et d'une petite quantité de DNAse avant d'être lysé par sonication. Les cellules intactes et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 20 minutes à 4000 rpm et les membranes sont isolées en centrifugeant le surnageant pendant 90 min à 45 000 rpm dans un rotor TI70 (Beckman). La fraction membranaire est lavée deux fois dans un tampon A sans inhibiteur de protéases et sans DNase. Le dernier culot est resuspendu dans un volume de tampon B correspondant à 7 mL par litre de culture (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) et stocké à -80°C.

Les préparations de membrane sont diluées 10 fois dans le tampon C (50 mM d'Hepes pH 7,5, 500 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA et 0.1% m/v de Fos-choline-12 (Anagrade, Affymetrix)) avant d'être homogénéisé par le dispositif Dounce. L'homogénéisation est achevée par le passage du mélange au travers du microfluidizer M110-P (Microfluidics) à 1000 psi. L'extrait membranaire est ensuite incubé pendant 3 h dans la glace. Les éléments insolubles sont enlevés par centrifugation pendant 30 min à 20 000 rpm et le surnageant est concentré jusqu'à 4 mL en utilisant une cellule Diaflo équipée d'une membrane YM-10 (limite de taille 10 kDa, Amicon). Les protéines solubilisées sont injectées sur une colonne Superdex-200 (GE-Healthcare) qui a été au préalable équilibrée avec le tampon C. L'élution est conduite à 0,8 mL.min^{-1} et des fractions de 1 mL sont collectées. Les fractions retenues sont vérifiées par spectrophotométrie (absorbance à 280 nm) et analysées sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Les fractions qui contiennent NccX sont rassemblées et concentrées jusqu'à 2 mL par centrifugation dans un micro-concentrateur Vivaspin-6 (limite 30 kDa, Vivascience).

La solution de protéine est diluée 10 fois dans le tampon D (50 mM d'Hepes pH 7,5, 0.1% m/v Fos-choline-12) et chargée sur une colonne Q Hi-trap (GE Healthcare) pour séparer les protéines sur chromatographie par échange d'anions. Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de NaCl dans le tampon D. Les fractions qui contiennent NccX sont éluées autour de 100 mM de NaCl, elles sont rassemblées et concentrées jusqu'à 15 mg/mL par centrifugation dans un micro-concentrateur Vivaspin-6. Les protéines sont aliquotées et stockées à -80°C. A cette étape, NccX est pure sur gel d'électrophorèse. Le rendement de cette purification est de 0,5 -1 mg de NccX pure pour 1 L de milieu LB.

5.1.9 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%) Tris-Tricine en présence de SDS

Les gels à 15% de polyacrylamide sont coulés en deux temps : d'abord un gel de séparation (préparé en tampon Tris-HCl 3 M à pH 8,45 en présence de 0,1% de SDS et de 10% de glycérol) puis un gel de concentration (3,8% de polyacrylamide préparé en tampon Tris-HCl 3 M à pH 8,45 en présence de 0,1% de SDS) dans lequel un peigne est inséré.

Avant le dépôt, les échantillons protéiques sont chauffés 5 min à 95°C (sauf mention contraire), en présence d'un tampon de dénaturation (0,1 M Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 33% de glycérol, 0,2 M de DTT, 0,2 mg/mL de bleu de Comassie G-250). Le DTT réduit les ponts disulfures entre les cystéines et, le SDS rompt les interactions hydrophobes intra- et inter-protéiques tout en chargeant les molécules négativement. Les fractions ainsi dénaturées sont déposées sur le gel de polyacrylamide. Les peptides chargés migrent dans le gel grâce à un courant électrique de 150 V (durée : 35 min) dans un tampon Tris-Tricine (tampon haut : Tris 0,1 M, Tricine 0,1 M et SDS 1%, tampon bas : Tris 0,2 M, pH 8,9).

5.2 Etude de la production de CnrX chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 par immunodétection

La première partie de l'expérience, à savoir la culture des bactéries en présence de métaux est effectuée par le laboratoire de Max Mergeay et Nathalie Leys, SCK-CEN, Mol, Belgique.

C. metallidurans CH34 est cultivée à 30°C dans le milieu 284 [Tableau 5.1], jusqu'à atteindre A_{600nm}=1. Chacune de ces précultures est utilisée pour inoculer une flasque contenant 1 L de milieu. Les bactéries sont ensuite cultivées dans le noir à 30°C et 150 rpm jusqu'à atteindre A_{600nm} = 0,5. C'est à ce stade que les sels de métaux sont ajoutés dans le milieu de culture, à des concentrations identiques à celles utilisées dans les expériences déjà publiées par Monchy *et al* (2007) : 2 mM $CoCl_2$/10 mM $CoCl_2$/2 mM $CoSO_4$, 0,6 mM $NiCl_2$/1 mM $NiSO_4$, 0,1 mM $CuSO_4$/0,1 mM $Cu(NO_3)_2$ ou 0,8 mM $ZnCl_2$/2 mM $ZnSO_4$. Des cultures contrôles (sans ajout

de métal) sont également incubées en parallèle. Après 2 heures, les cellules sont récoltées par centrifugation et les culots sont congelés et envoyés à notre laboratoire.

5.2.1 Fractionnement des cellules

La fraction membranaire et la fraction soluble (cytosolique et périplasmique) des cellules de CH34 sont séparées par des centrifugations successives. A partir d'un culot bactérien provenant d'un litre de culture, on ajoute 10 mL de tampon d'extraction (Hepes pH8 50 mM, MgCl2 10 mM, 1/2 tablette d'antiprotéases et une point de spatule de DNase) avant de soniquer l'échantillon (amplitude de 50% - 3 minutes efficaces - par tranche de 20 sec). On centrifuge ensuite à 5000 rpm pendant 20 min à 4°C et le surnageant obtenu est ultracentrifugé pendant 1 h à 4°C à 35000 rpm. Le surnageant obtenu après cette centrifugation représente la fraction cytosolique et périplasmique de la cellule. On resuspend ensuite le culot dans 10 mL de 50 mM Hepes, 500 mM NaCl et d'1/2 tablette d'antiprotéase et le mélange est homogénéisé par broyage mécanique avant d'être centrifugé une première fois à basse vitesse (20 min à 5000 rpm à 4°C). Le surnageant obtenu est ultracentrifugé 1 h à 35000 rpm. Le culot qui représente la fraction membranaire est repris dans 1 mL de 50 mM d'Hepes et 100mM de NaCl. Les aliquots sont conservés à -80°C.

5.2.2 Immunodétection

Les protéines totales des culots bactériens ou les extraits membranaires et solubles sont ensuite séparés par SDS-PAGE. Le transfert des protéines depuis le gel de polyacrylamide vers la membrane de PVDF (PolyVinyliDene Fluoride) se fait sur l'appareil "Trans-Blot Cell" (Bio-Rad). Au préalable la membrane doit être trempée dans du méthanol 100% afin de la rendre perméable. Le montage est réalisé comme sur la figure 5.2.1, avec la membrane PVDF côté anode et le gel de polyacrylamide côté cathode. Le transfert des protéines chargées négativement par le SDS se fait de la cathode vers l'anode.

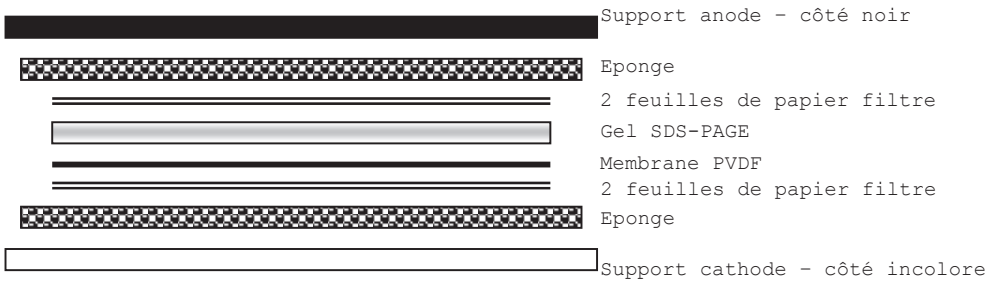


Figure 5.2.1 – Montage effectué pour transférer des protéines contenues dans un gel de poylacrylamide sur la membrane PVDF grâce à l'appareil "Trans-Blot Cell" (Bio-Rad).

La migration s'effectue à 100 V et 350 mA pendant 40 min dans le tampon de transfert (0,03 M Tris, 0,2 M Glycine, 20% de méthanol). Elle est ensuite saturée dans du PBS-T (Phosphate

Buffer Saline-Tween : PBS 1X, Tween 20 à 0,1%) contenant 5% de lait, pendant 30 min à température ambiante. Après plusieurs lavages de la membrane en tampon PBS-T, elle est incubée pendant 45 minutes en présence d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre CnrXs (dilution au $1/2000^{ème}$ dans du PBS-T). L'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages en PBS-T. Les anticorps secondaires, anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase (dilution au $1/5000^{ème}$ en PBS-T), sont incubés avec la membrane pendant 45 min. L'excès est éliminé par 3 lavages. On révèle la présence de CnrX sur la membrane à l'aide du kit ECL (Amersham, GE Healthcare). Les solutions du kit contiennent du luminol dont l'oxydation par la peroxydase liée à l'anticorps secondaire induit une émission lumineuse qui est détectée par l'exposition d'un film radiographique sur la membrane PVDF.

5.3 Microcalorimétrie de titrage isotherme

5.3.1 Principe

La technique de microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC) a été utilisée dans notre projet pour caractériser les différents paramètres d'interaction entre CnrXs (sauvage ou mutant) et certains métaux. Ainsi nous pouvons obtenir en une seule expérience la constante d'affinité (K_a), la stœchiométrie d'interaction (n) ainsi que les contributions enthalpiques (ΔH) et entropiques ($T\Delta S$).

Le microcalorimètre contient deux cellules (une cellule de référence et une cellule de mesure) isolées de l'environnement externe par une enceinte adiabatique et maintenues à température constante pendant le temps du titrage [Figure 5.3.1]. La cellule de référence contient de l'eau et la cellule de mesure contient la solution de protéine. Les cellules sont d'abord équilibrées à la température de l'étude (25°C), puis le métal est ajouté dans la cellule de mesure par petites injections successives. La seringue d'injection est munie d'une pale qui permet une agitation dans la cellule de mesure. A chaque injection, l'interaction entre les deux molécules s'accompagne d'un dégagement ou d'une absorption de chaleur (réaction exothermique ou endothermique) qui entraîne une variation de la température de la cellule de mesure. Dans le but de rétablir la même température entre les deux cellules, l'appareil applique un courant électrique qui est mesuré par le calorimètre.

La puissance fournie (µcal/sec) est mesurée en fonction du temps et reportée sous la forme d'un thermogramme [Figure 5.3.2, A]. Au début du titrage, des quantités importantes de chaleur sont dégagées, indiquant la formation du complexe protéine-ligand. Par contre, vers la fin du titrage tous les sites de liaisons étant désormais occupés, chaque ajout de ligand a comme seule conséquence sa dilution dans la cellule de mesure [Figure 5.3.2, A].

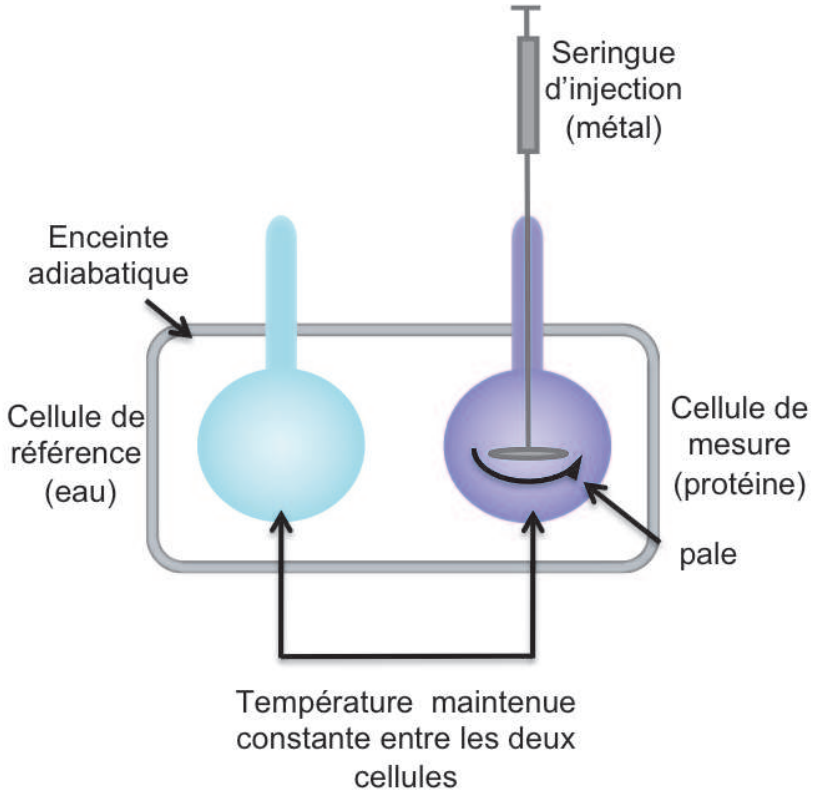


Figure 5.3.1 – Schéma du dispositif d'ITC

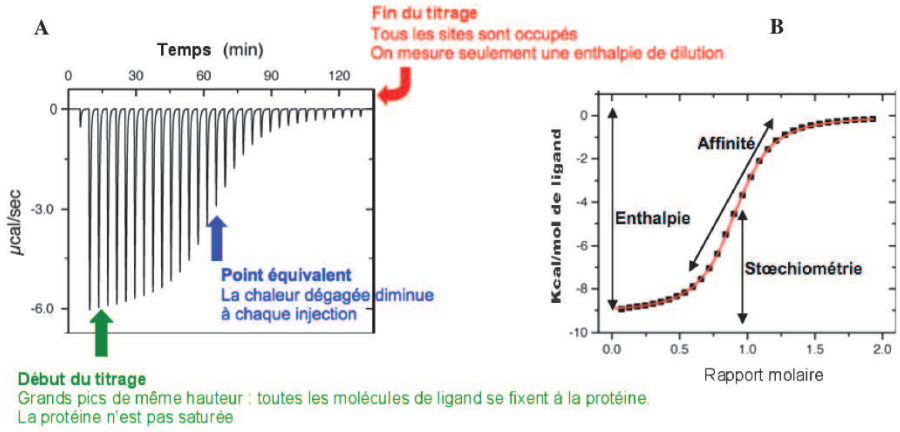


Figure 5.3.2 – Données microcalorimétriques brutes (A). Ces données sont intégrées puis ajustées à la courbe sigmoïde théorique qui représente la meilleure simulation pour un modèle de protéine à un ou plusieurs sites de liaisons (B)

Les données obtenues sont ensuite intégrées et ajustées de manière non-linéaire au modèle approprié (Wiseman *et al.*, 1989). Pour un modèle d'interaction dans lequel chaque site est indépendant, l'équation utilisée est la suivante :

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

où $[X]_t$ et $[M]_t$ sont les concentrations respectives totales du ligand et de la protéine, V_o est le volume effectif de la cellule de mesure et dQ est la variation de la quantité de chaleur échangée, calculée à chaque point de la courbe de titrage.

La variation d'enthalpie ΔH° influence directement l'amplitude de la courbe, la constante d'association K_a agit sur la pente de la courbe tandis que la position du point d'inflexion donne la stœchiométrie n [Figure 5.3.2, B]. Leur valeur permet de déduire tous les autres paramètres thermodynamiques car la variation d'énergie libre ΔG° et la contribution entropique $T\Delta S^\circ$ dépendent de l'équation suivante :

$$\Delta G^\circ = -RTlnK_a = \Delta H - T\Delta S^\circ$$

où T est la température (exprimée en K) et R = 8.314 J.mol^{-1}.K^{-1}

La forme générale de la courbe dépend du paramètre de Wiseman c défini comme :

$$c = n[M_0]K_a$$

où $n[M_0]$ représente la concentration initiale de sites de liaisons en solution. La courbe doit se rapprocher de la forme sigmoïdale afin de déterminer au mieux les paramètres thermodynamiques. En pratique, c doit être compris entre 10 et 100 car des valeurs supérieures ou inférieures génèrent des courbes dont les pentes trop élevées ou trop faibles ne permettent pas une mesure fiable de K_a.

5.3.2 Mode opératoire

Les expériences ont été effectuées dans le laboratoire de glycobiologie moléculaire (CERMAV, Grenoble) avec l'aide d'Aymeric Audfray, Catherine Gautier et Anne Imberty. Les mesures microcalorimétriques de l'interaction entre CnrXs ou ses mutants, et les ions Co(II) ou Zn(II) ont été réalisées en tampon Hepes 50 mM pH 8, NaCl 100 mM à l'aide d'un calorimètre VP-ITC de MicroCal (Nothampton, USA). La solution de sels métalliques est ajoutée par incréments de 5 ou 10 µL et suivant 30 à 60 injections à la solution protéique dans la cellule de mesure (V_0 =1,4478 mL). L'intervalle de temps entre deux injections est fixé à 300 sec, la vitesse d'agitation à 300 tours/min et la température à 25 °C. Pour ce type d'appareil, avant chaque expérience, toutes les solutions sont dégazées et mises à température à l'aide d'un thermoVac. Les données expérimentales sont traitées avec le logiciel Origin (OriginLab). La surface de chaque pic est intégrée et portée sur le graphique de l'enthalpie en fonction du rapport molaire métal/protéine présent dans la cellule de mesure. L'ajustement de la meilleure courbe théorique sur les données expérimentales permet au logiciel de calculer les différents paramètres thermodynamiques. Le blanc correspond au titrage du tampon avec le métal afin d'évaluer la chaleur associée à la dilution du métal. Lorsqu'il est significatif, l'isotherme de blanc est soustraite des isothermes des

échantillons. Les expériences ont été répétées deux fois au minimum, sauf pour le titrage du zinc que nous n'avons pas pu reproduire faute de temps.

5.4 Spectroscopie UV-Visible

5.4.1 Principe

Les atomes et les molécules existent dans un nombre défini de niveaux d'énergie. Un changement de niveau d'énergie d'un état électronique fondamental E_0 à un état électronique excité E_1 (passage d'un électron d'une orbitale à une autre) nécessite l'absorption ou l'émission d'un photon. L'énergie (E) d'un photon émis ou absorbé lors d'une transition entre deux niveaux d'énergie est donné par la relation $E = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon. Dans des molécules complexes telles que les molécules biologiques, les niveaux d'énergie sont peu espacés et, de ce fait, les photons proches de la lumière UV-visible peuvent permettre la transition électronique. Aussi ces molécules peuvent absorber la lumière dans le visible et l'ultraviolet.

Chaque bande d'absorption est caractérisée par la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption (λ_{max} en nm) et par son intensité donnée par le coefficient d'extinction molaire ($\varepsilon_{\lambda max}$ en $M^{-1}.cm^{-1}$). Ces deux grandeurs sont reliées à la concentration de la solution par la loi de Beer-Lambert : $A_\lambda = \epsilon_\lambda \times l \times c$, où l est la longueur du trajet optique (cm) et c la concentration (M).

Pour un complexe métal-protéine, il existe plusieurs types de bandes d'absorption, nous nous intéresserons plus particulièrement aux :

- Transitions *d-d* : les métaux de transitions ont leurs orbitales d incomplètes, ainsi il est possible d'observer la transition d'un électron d'une orbitale d peuplée à une orbitale d vide.

- Bandes de transfert de charges ligand→métal (Ligand to Metal Charge Transfer : LMCT) : elles représentent le transfert d'un électron du ligand vers le métal au cours de l'excitation et sont en général assez intenses.

5.4.2 Mode opératoire

5.4.2.1 Titrage des protéines suivi par spectroscopie UV-visible

Les spectres UV-visible ont été enregistrés au laboratoire, à température ambiante, avec un spectrophotomètre Cary 50 Bio (Varian). Un volume variable (120 à 150 μL) de solution protéique (50 à 200 µM) est introduit dans des cuves en quartz pour lesquelles le chemin optique est de 1 cm. Les spectres sont enregistrés pour des longueurs d'ondes allant de 250 nm à 800 nm. Pour les protéines solubles, le tampon utilisé est le suivant : 50 mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl. Pour le titrage de NccX, 0,1 % de foscholine12 est ajouté dans le tampon.

Lors des expériences de titrage, le spectre de la forme apo de la protéine est d'abord enregistré. Puis des ajouts successifs de petites quantités (1 ou 2 µL) de solution de métal fraîchement préparée sont effectués. Chaque spectre est enregistré après homogénéisation de la solution.

5.4.2.2 Titrage en boîte à gants suivi par spectroscopie UV-visible :

L'utilisation de la boîte à gant permet la manipulation des protéines et des métaux dans une atmosphère inerte composée d'azote. Nous préparons les métallations de CnrXs en boîte à gants Jacomex, les échantillons sont ensuite placés dans une cuve fermée par un bouchon en caoutchouc avant d'être analysés dans le spectrophotomètre Cary 50 Bio situé à l'extérieur de la boîte à gant.

5.4.2.3 Spectrophotométrie sur les cristaux de CnrXs métallée cobalt

L'expérience a été effectuée au laboratoire « Cryobench » de l'ESRF (Grenoble – France) en collaboration avec Antoine Royant (ESRF/IBS) à l'aide d'un microspectrophotomètre qui permet de mesurer des spectres UV-visible sur des nano-échantillons, tels que les cristaux de protéines (Royant *et al.*, 2007). Les cristaux de CnrXs métallée cobalt sont plongés dans une solution cryoprotectrice, puis montés sur une boucle et congelés directement sur le microspectrophotomètre sous un flux d'azote à 100 K. Le spectre d'absorption du cristal est enregistré par un spectrophotomètre HR2000 (Ocean Optics) utilisant une lampe halogène à tungsten (Mikropack DH2000-BAL, Ocean Optics).

5.5 La résonance paramagnétique électronique

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique qui permet l'étude d'espèces contenant un ou plusieurs électrons célibataires, appelés aussi espèces paramagnétiques. Dans les systèmes biologiques, ces espèces sont principalement des radicaux libres ou certains métaux de transition comme le Cu^{2+} ou le Co^{2+}. A l'inverse, les espèces pour lesquelles tous les électrons sont appariés comme le Co^{3+} ou le Ni^{2+} bas spin, ne donnent aucun signal. La nature diamagnétique de la chaîne polypeptidique permet à la spectroscopie de type RPE d'être une technique tout à fait adaptée pour la caractérisation structurale des sites métalliques des protéines. L'information obtenue par cette spectroscopie peut être divisée en 3 catégories : (i) nombre de centres paramagnétiques, (ii) nature et degré d'oxydation du centre métallique, et (iii) arrangement structural du site métallique.

5.5.1 Principe

L'électron est défini comme une particule de spin ½. En l'absence de champ magnétique, ses niveaux d'énergies (niveau Zeeman, m_s) sont dégénérés, c'est à dire, que les différents états

de l'électron possèdent la même énergie. L'application d'un champ magnétique provoque l'effet Zeeman c'est à dire la levée de la dégénérescence des niveaux d'énergie en faisant apparaître deux niveaux E_1 et E_2 avec $E_1 = \frac{1}{2} g_e \mu_B B_0$ et $E_2 = -\frac{1}{2} g_e \mu_B B_0$. La différence d'énergie est donc $\Delta E = E_2 - E_1 = g_e \mu_B B_0$. Ainsi lors d'une expérience RPE, les composés sont soumis à un champ représenté par l'émission d'une onde électromagnétique B_1 d'énergie fixe $h\nu$, ainsi qu'à un champ variable B_0 produit par deux aimants. Lorsque $h\nu = \Delta E = g_e \mu_B B_0$, les électrons vont transiter entre les 2 niveaux d'énergies : il s'agit du phénomène de résonance qui conduit à la détection d'une raie sur le spectre [Figure 5.5.1].

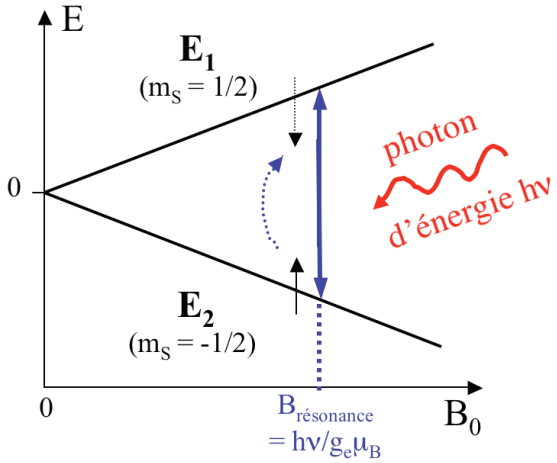


Figure 5.5.1 – Diagramme des niveaux d'énergies représentant la transition d'un électron entre les niveaux E_1 et E_2 (avec $\Delta E = g_e \mu_B B_0$) par absorption d'un photon d'énergie hν. C'est le phénomène de résonance paramagnétique électronique. Le spin de l'électron se retourne lors de la transition.

Dans le cas d'un complexe mononucléaire de Co(II), de structure électronique d^7, le spin électronique peut être S=½ (bas spin) ou S=3/2 (haut spin). Un système S=3/2 possède quatre niveaux Zeeman ($2S+1$) : $\pm 3/2$ *et* $\pm 1/2$. Lorsque le composé n'est pas soumis à un champ magnétique, l'ensemble des niveaux devrait être dégénéré. Toutefois lorsqu'un système présente un nombre impair d'électrons non appareillés supérieur à 1, les niveaux Zeeman sont partiellement dégénérés en champ nul à cause de l'écart en champ nul (zfs pour zero field splitting). Le zfs est caractérisé par D, le paramètre axial, représentant le degré d'éloignement des électrons non appareillés et E le paramètre rhombique, décrivant la symétrie du système. Ainsi, lorsque le système présente une symétrie axiale, le rapport E/D est nul, et dans le cas de la rhombicité totale du système, le rapport E/D vaut 1/3.

Dans ce dernier cas, en absence de tout élément de symétrie, le spectre RPE est formé de trois structures et défini par trois valeurs de g différentes g_x, g_y *et* g_z. Le facteur g est une caractéristique de la molécule. Pour les radicaux organiques (S=½), le facteur g est proche du facteur de Landé (g électronique, $g_e \backsim 2{,}002$). L'écart entre la valeur de g du système considéré et g_e est fonction de la nature du centre paramagnétique et de son environnement moléculaire.

5.5.2 Mode opératoire

Les expériences de RPE ont été réalisées en collaboration avec Carole Duboc du Département de Chimie Moléculaire de l'Université Joseph Fourier, Grenoble. Les enregistrements en bande X sont réalisés à 9,4 GHz avec une modulation magnétique de 100 kHz et une puissance micro-onde de 2 mW sur un appareil Bruker EMX, équipé d'une cavité ER-4192 ST (Bruker) et d'un système de contrôle de température ER-4131 VT permettant d'effectuer des acquisitions à des températures de l'ordre de 11 K lors de l'étude des complexes de cobalt et 50 K pour ceux du cuivre.

5.6 La spectroscopie d'absorption des rayons X

La Spectroscopie d'Absorption des Rayons X (SAX) est une technique qui permet d'apporter des informations électroniques et structurales sur un élément considéré, en sondant sélectivement ses états électroniques et son environnement local dans un rayon de 4-5 Å. La SAX est parfaitement adaptée à l'étude des sites métalliques des métalloprotéines en solution, puisqu'elle permet, sur des échantillons non cristallisés, d'accéder à certaines informations électroniques comme le degré d'oxydation de l'élément sondé et aussi d'obtenir des informations structurales telles que la géométrie et le nombre de coordination de l'ion métallique, la nature et la distance entre cet ion et ses voisins.

5.6.1 Principe

Lorsqu'un photon d'intensité I_0 interagit avec la matière, il existe plusieurs types d'interactions :

-Il peut être diffusé de manière élastique ou inélastique. Dans ce cas, il n'y a pas d'excitation particulière d'atomes.

-Il peut être absorbé par un atome. Cette absorption provoque des transitions électroniques et, au dessus d'une certaine énergie appelée E_0 ou niveau de Fermi, entraîne l'éjection d'un photo-électron. Il s'en suit une étape de relaxation avec des réarrangements électroniques au cours de laquelle l'atome ionisé perd l'excès d'énergie qu'il contient, par émission d'un photon (fluorescence d'intensité I_f) ou par éjection d'un autre électron (processus Auger) [Figure 5.6.1].

La SAX est basée sur l'excitationdes couches électroniques de cœur d'un atome (couche 1s pour le seuil K) provoquée par l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ (avec h la constante de Plank et ν la fréquence du photon). Son principe consiste à mesurer le coefficient d'absorption des rayons X (μ) sur un échantillon en fonction de l'énergie du rayonnement X incident (E). Ce coefficient (μ) se calcule suivant la loi de Beer-Lambert (exprimée de manière différente que dans la section 5.4) :

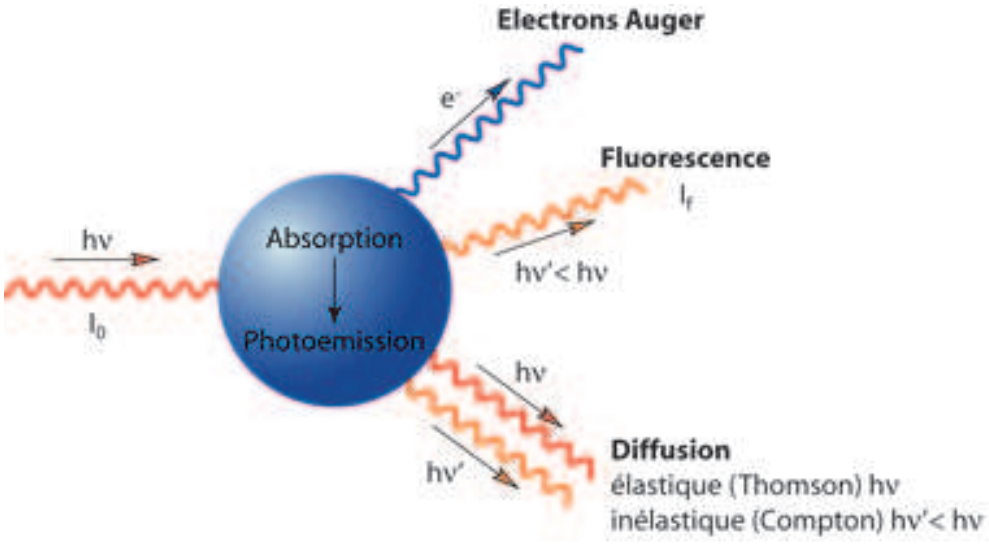


Figure 5.6.1 – Représentation schématique de l'interaction rayonnement-matière.

$$I_t = I_0 exp^{(-\mu x)}$$

I_0 et I_t étant respectivement l'intensité du faisceau incident et du faisceau transmis et x l'épaisseur de l'échantillon.

Le coefficient d'absorption se calcule donc par l'équation suivante :

$$\mu(E) = ln\frac{I_0}{I_t}$$

Cette loi est valable pour les échantillons concentrés.

Pour des systèmes dilués comme le notre où l'élément cible est présent à faible concentration ($[Co]_{échantillon} < 5g/L,$), . On enregistre le faisceau incident et la fluorescence X émise par l'échantillon. Le coefficient d'absorption se calcule alors par l'équation suivante :

$$\mu(E) = \frac{I_f}{I_0}$$

On enregistre donc le faisceau incident et la fluorescence X émise par l'échantillon.

5.6.1.1 Caractéristiques d'un spectre

Les structures du spectre d'absorption μ(E) traduisent les différents processus physiques qui se produisent lors de l'excitation des électrons de cœur. Ce spectre présente trois régions, correspondant chacune à une gamme d'énergie du photon incident et qui traduisent trois processus électroniques différents [Figure 5.6.2] :

La partie pré-seuil du XANES : Dans la partie pré-seuil du XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure), l'énergie du photon incident est inférieure à l'énergie de liaison de l'électron

de cœur (E_0) et ne permet donc pas d'éjecter un électron 1s. Cependant, cette énergie peut être suffisante pour permettre à cet électron 1s de transiter vers les premiers niveaux vides ou partiellement remplis ; ainsi, dans notre cas, selon la géométrie du complexe, le cobalt peut connaitre une transition 1s-3d, puisque son orbitale 3d n'est pas complètement remplie. Cette transition se traduit alors par un pic avant seuil, le pré-pic.

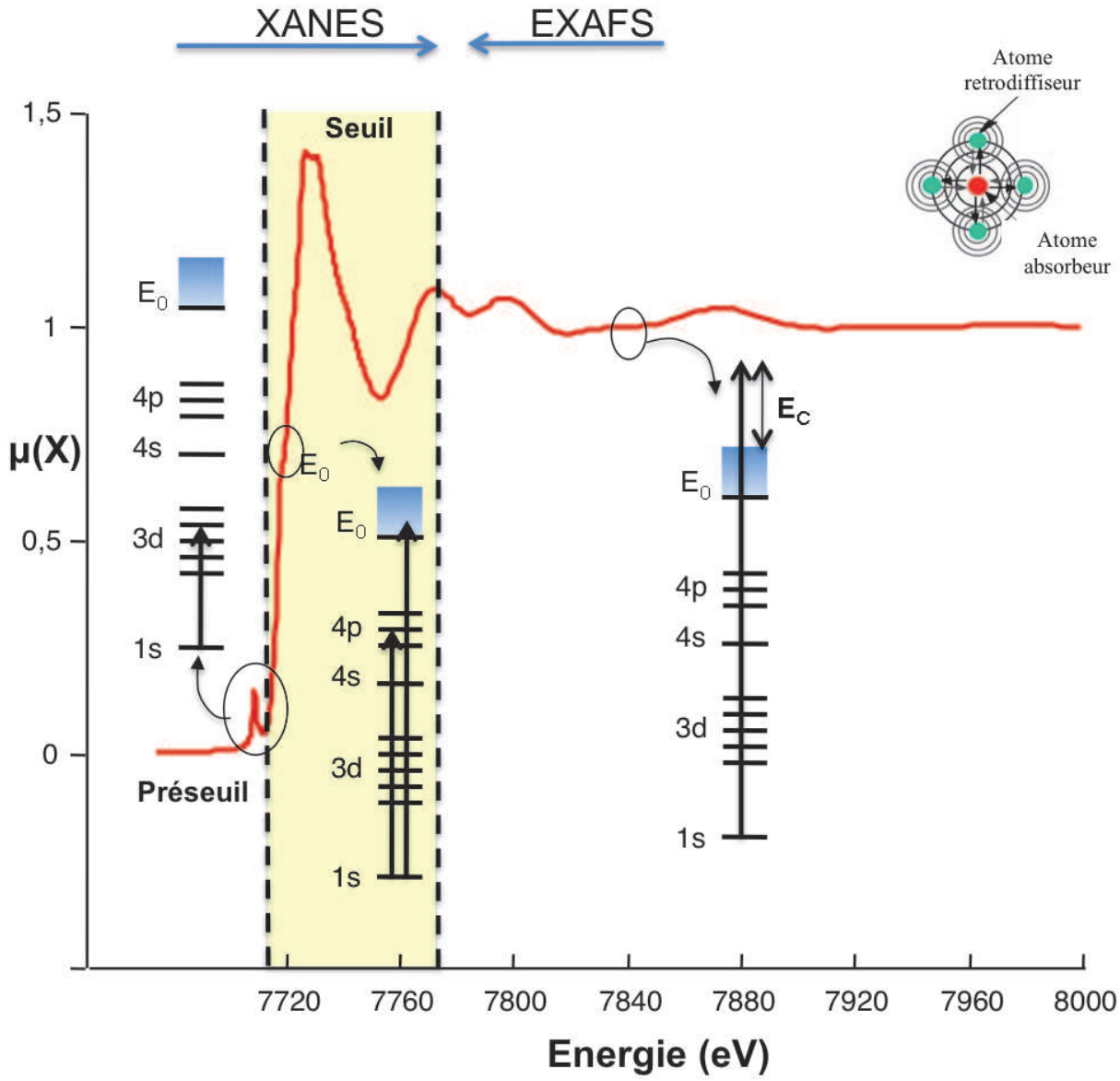


Figure 5.6.2 – Spectre d'absorption X enregistré au seuil K du cobalt.

La région seuil du XANES : Cette région, qui s'étend approximativement de [E_0 - 20 eV ; E_0 + 100 eV], renseigne sur la symétrie de l'atome cible et sur son degré d'oxydation.

Lorsque l'énergie des photons incidents augmente et atteint E_0, l'électron de cœur est arraché et éjecté au delà des niveaux liés vers le continuum d'énergie. Il devient un photo-électron avec

une énergie cinétique faible [1] et un libre parcours moyen (distance parcourue sans perte d'énergie) élevé. De ce fait, il subit de nombreux phénomènes de diffusion (simples et multiples) avec les atomes voisins.

L'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) : L'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) est la région des oscillations après seuil. Le photo-électron a une énergie cinétique accrue, son libre parcours moyen est donc plus faible. Les informations obtenues sont caractéristiques de l'ordre local autour du site sondé. La rétrodiffusion simple est prépondérante. Les oscillations autour de la courbe monotone théorique que donneraient des atomes isolés proviennent donc de l'interférence entre l'onde émise par l'atome central et l'onde rétrodiffusée par les atomes de la sphère de coordination de l'atome central. Cette région, qui s'étend d'environ [E_0 + 100 eV ; E_0 + 1 000 eV], renseigne sur la nature, le nombre et la distance des premiers voisins de l'atome cible, mais aussi sur le désordre structural au sein de l'échantillon. Il est par contre difficile de distinguer en EXAFS deux éléments possédant des numéros atomiques proches (par exemple O ou N).

5.6.2 Analyses des spectres XANES

L'analyse des spectres XANES s'accompagne d'une étape préalable de traitement :

-Soustraction du fond continu d'absorption (μ_0), obtenue en extrapolant linéairement l'avant seuil. La contribution au spectre d'absorption total de l'absorption des autres éléments de la matrice et/ou des autres seuils de l'élément étudié, est ainsi éliminée [Figure 5.6.3].

- Normalisation de l'absorbance μ par rapport au saut d'absorption du seuil ($\Delta\mu$), ce qui correspond à normaliser le signal par rapport à la quantité d'atomes absorbeurs présents (soit dans notre cas la concentration de cobalt) [Figure 5.6.3].

L'extraction et la normalisation des données XAS ont été effectuées selon des méthodes standards, en utilisant le logiciel Athena appartenant à la suite IFEFFIT (Ravel et Newville, 2005).

Les spectres ainsi obtenus sont ensuite comparés aux spectres des composés de références dont on examine l'intensité des pré-pics et les positions du seuil. On peut également aller plus loin en faisant une reproduction du spectre expérimental par des calculs théoriques.

5.6.3 Analyse des spectres EXAFS

5.6.3.1 Extraction des données

Une phase d'extraction est nécessaire pour obtenir le spectre EXAFS normalisé à partir du spectre brut μ(E). Après soustraction de μ_0 et normalisation par rapport à $\Delta\mu$ (voir le traitement

1. L'énergie cinétique du photon vaut $E_c = h\upsilon - E_0$. E_C est faible dans cette région car elle dépend de l'énergie du photon qui est plus faible dans la région XANES que dans la région EXAFS.

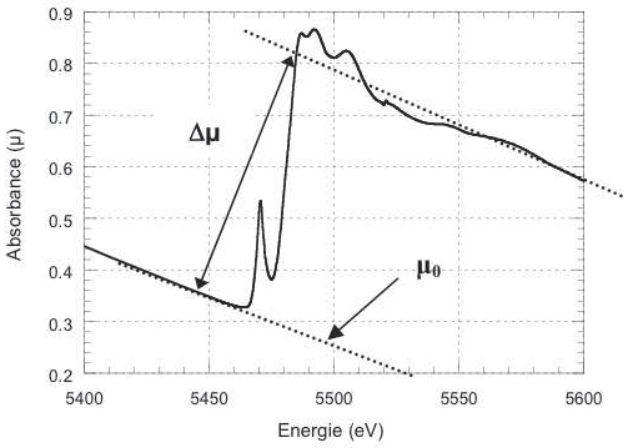


Figure 5.6.3 – Traitement des spectres XANES

des spectres XANES), on extrait les oscillations sous forme d'une fonction sinusoïdale, la fonction d'onde χ(k) qui correspond à la somme des contributions de toutes les paires atomiques [Figure 5.6.4 a et b]. Elle est exprimée en fonction du vecteur d'onde (k) qui vaut

$$k \propto \sqrt{E - E_0}$$

La fréquence des oscillations ainsi obtenues est fonction des distances interatomiques, et leur amplitude du nombre de voisins.

Afin de « visualiser » chacune des contributions, on réalise une transformée de Fourier (FT) de χ(k) qui permet de passer de l'espace réciproque ($Å^{-1}$) à l'espace réel (Å) où chaque pic correspond à une couche atomique autour de l'atome central [Figure 5.6.4 c] . On filtre le signal des premières couches de coordination par le calcul de la transformée de Fourier inverse entre des bornes définies [Figure 5.6.4 d].

5.6.3.2 Simulation numérique du spectre EXAFS

Le but de la modélisation du spectre EXAFS est d'identifier le nombre, la nature et la distance des atomes voisins de l'atome absorbeur. Les paramètres qui décrivent les oscillations EXAFS peuvent être obtenus à partir de fits des différentes couches atomiques, en utilisant les fonctions d'amplitude et de phase calculées par le programme FEFF à partir de structures connues (issues de la PDB ou de la Cambridge Structural Database (CSD). Dans notre cas nous avons utilisé la structure de CnrXs déposée dans la PDB et d'autres structures de la CSD. Une fois le calcul des positions atomiques autour de l'atome absorbeur réalisé, le programme calcule les fonctions d'amplitudes et de phases pour chaque chemin de l'électron vers un (diffusion simple) ou plusieurs (diffusion multiple) atomes voisins. Dans le cas de ligands histidine par exemple, il est important de prendre en compte la diffusion multiple à l'intérieur du cycle imidazole. Le pro-

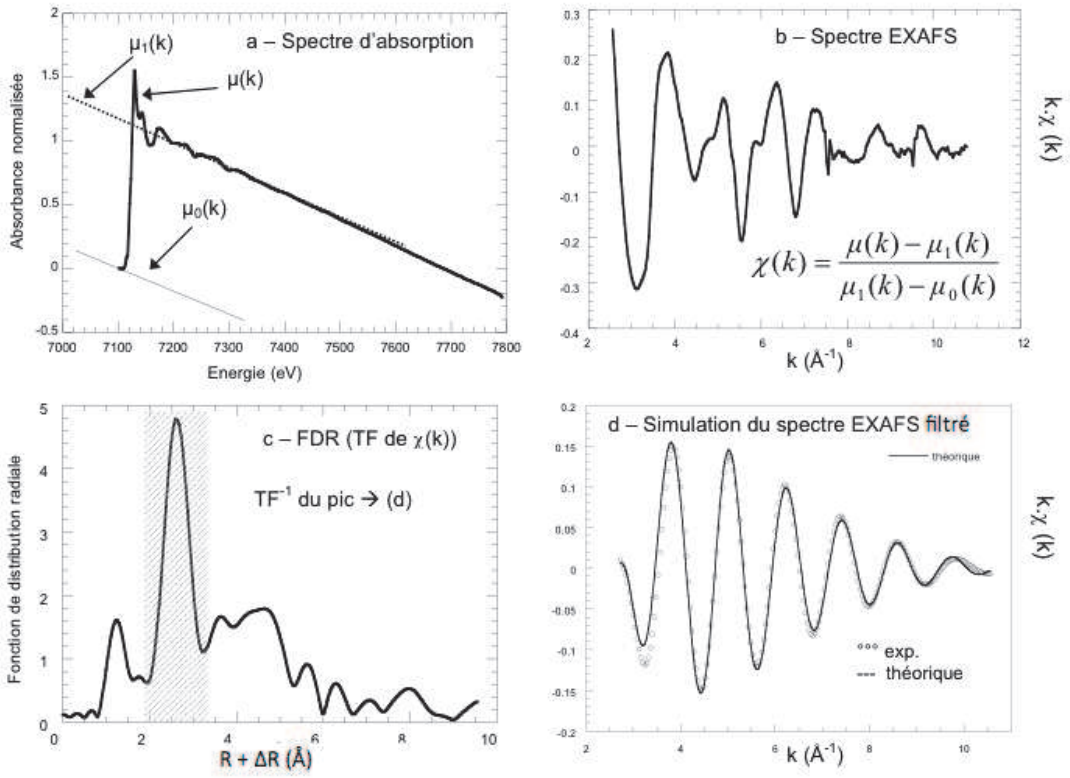


Figure 5.6.4 – Les différentes étapes d'extraction du signal EXAFS

gramme ATHENA ajuste les paramètres structuraux (nombre d'atomes, distance interatomique et paramètre de désordre pour chaque couche atomique) afin de reproduire au mieux le spectre expérimental. On peut juger de la qualité de l'ajustement grâce à la valeur du résidu qui doit être la plus faible possible. Pour l'analyse des données XANES et EXAFS, nous avons utilisé les programmes ATHENA et ARTEMIS, qui font partie du package IFEFFIT (Ravel et Newville, 2005).

5.6.4 Mise en oeuvre expérimentale

Les analyses ont été réalisées sur la ligne de lumière FAME (BM30B) du synchrotron ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble [Figure 5.6.5]. La ligne est équipée d'un monochromateur deux-cristaux en silicium (220) permettant de sélectionner la gamme d'énergie correspondant au seuil K du cobalt à partir du faisceau de rayons X polychromatique et d'une optique focalisante permettant de concentrer les photons sur l'échantillon en un spot de 300 par 100 μM^2 (H x V). L'intensité du faisceau incident est mesurée à l'aide d'une diode, et celle de la fluorecence du cobalt avec un détecteur solide résolu en énergie (Canberra, 30 éléments en germanium). La concentration des échantillons est de l'ordre de 1-2 mM. Le porte-échantillon est mis dans un cryostat à hélium à une température de 10 K durant la collecte des données pour limiter les dégâts d'irradiation. L'enregistrement à froid permet aussi d'obtenir un signal

de meilleure résolution par diminution du désordre structural du à l'agitation thermique. Pour chaque échantillon, 4 à 6 scans de 40 minutes chacun sont enregistrés et sommés.

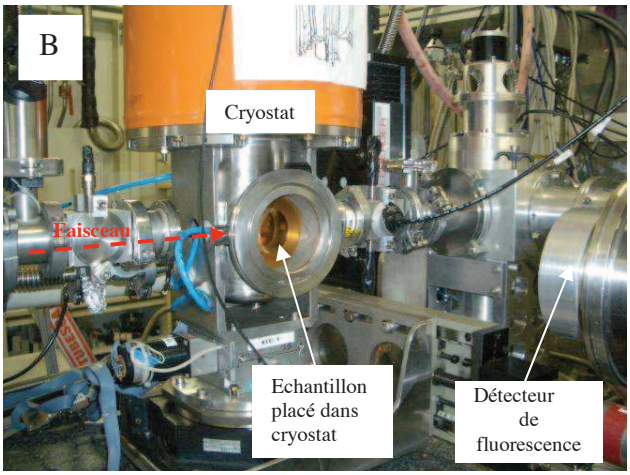


Figure 5.6.5 – La ligne de lumière FAME BM30B à l'ESRF de Grenoble

5.7 Cristallographie et cristallogenèse

La cristallographie aux rayons X est une technique physique permettant de déterminer la structure de macromolécules biologiques.

Le principe de cette technique s'apparente au fonctionnement d'un microscope optique : lorsque la lumière traverse l'objet observé, les rayons lumineux sont diffusés, puis reconcentrés par une série de lentilles pour reconstituer l'image [Figure 5.7.1-1]. Le même principe s'applique pour l'observation des atomes. Sachant qu'il faut employer des ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde est de l'ordre de grandeur de l'objet observé, l'utilisation des rayons X (caractérisés par une longueur d'onde de l'ordre de l'Angström (10^{-10} m)) est nécessaire pour visualiser l'arrangement des atomes dans une molécule. Or, il n'existe pas de lentilles capables de refocaliser les rayons X, il est donc impossible d'appliquer directement le principe du microscope pour la visualisation d'atomes. La solution consiste à remplacer les lentilles par un traitement informatique s'appuyant sur la transformation de Fourier [Figure 5.7.1-2]. Toutefois, la diffusion par une molécule isolée est trop faible pour fournir suffisamment de signal et, de ce fait, les rayons doivent être diffusés par un grand nombre de molécules ordonnées dans l'espace. Les cristaux, constitués par un agencement périodique de molécules, sont donc tout à fait adaptés pour ce type d'expérience. Ainsi ils fournissent une diffusion cohérente et simultanée des rayons X par un grand nombre de molécules ordonnées ; ce qui permet l'addition des contributions et donc une amplification du signal [Figure 5.7.1-3]. Par ailleurs, grâce au cristal nous pouvons manipuler les molécules pour les présenter sous différents angles aux rayons X.

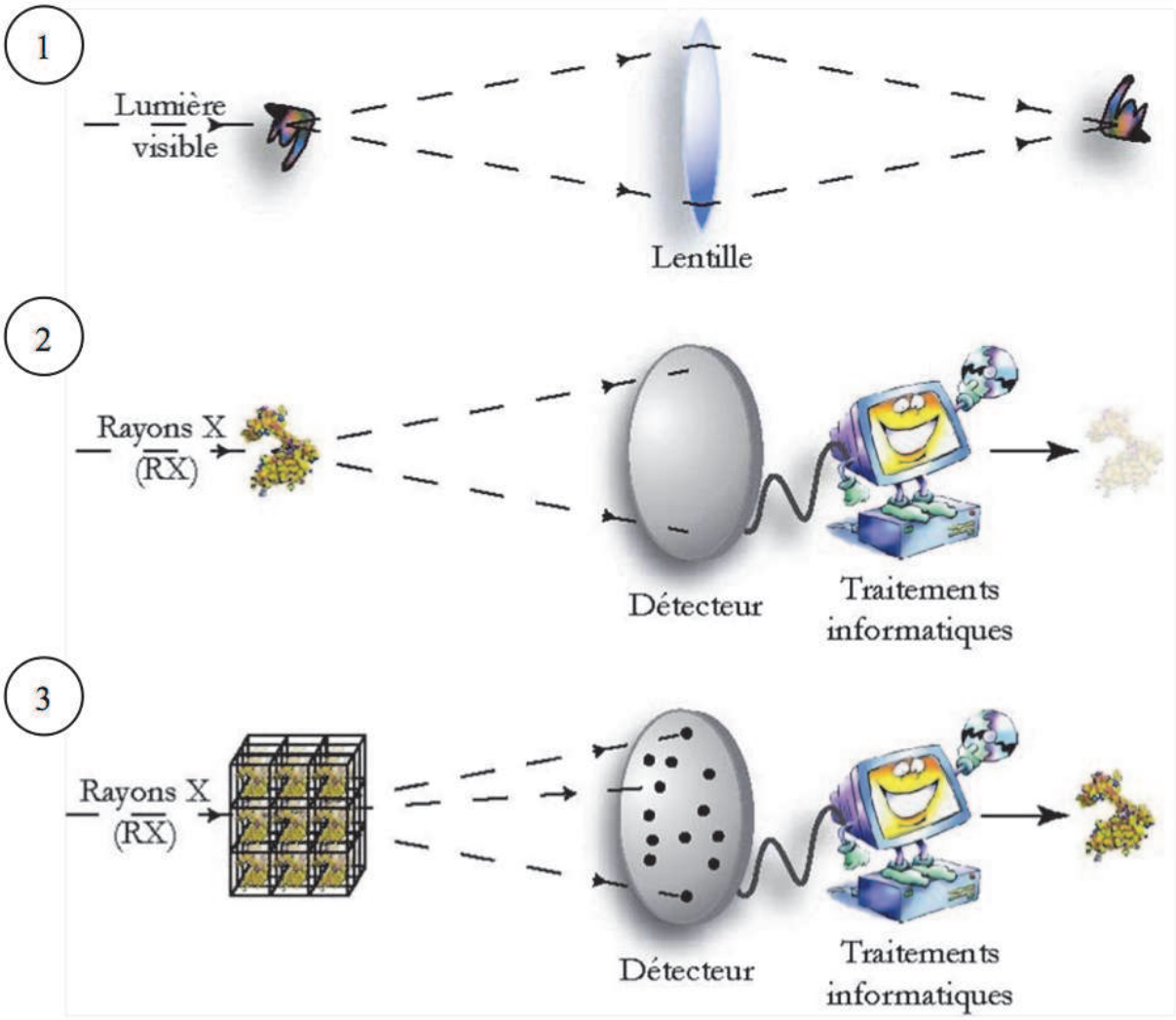


Figure 5.7.1 – Principe de la cristallographie aux rayons X. 1 : principe de fonctionnement d'un microscope. 2 : Diffusion d'une molécule isolée par les rayons X, le signal obtenu est trop fabile. 3 Diffraction d'un cristal par les rayons X.

5.7.1 La cristallogenèse

La cristallisation de la protéine est souvent l'étape limitante qui empêche d'aller plus loin dans les expériences de cristallographie aux rayons X.

5.7.1.1 Les paramètres influençant la solubilité des protéines

La cristallisation d'une macromolécule est le passage de cette dernière d'un état liquide vers un état solide organisé. Aucune relation entre la nature d'une protéine et les conditions dans lesquelles elle cristallise n'a encore été mise en évidence. En effet, la diminution de la solubilité de la protéine dépend de facteurs différents tels que :

– La nature et la concentration des agents précipitants. On peut les séparer en trois familles majoritaires :

→ Les polymères qui agissent par exclusion du solvant au voisinage de la protéine (le Poly-Ethylène Glycol (PEG) est le plus utilisé) ;

→ Les sels (non dénaturants) qui modifient la force ionique et augmentent les interactions hydrophobes entre les molécules de protéine en excluant le solvant (le sulfate d'ammonium, les acétates ou les chlorures...) ;

→ Les solvants organiques qui diminuent la constante diélectrique du milieu (Méthyl-Pentane-Diol (MPD), isopropanol, dioxane...).

- La nature et le pH du tampon, comme par exemple le Mes, l'Hepes, ou le Tris ;
- La nature et la concentration d'additifs, comme par exemple des détergents ;
- La concentration, la pureté et l'homogénéité de la protéine
- La température

5.7.1.2 Le diagramme de phases

Le diagramme de phases, qui est obtenu en faisant varier la concentration en agent précipitant (ou tout autre paramètre influençant la cristallisation : concentration en sel, pH, température...) en fonction de la concentration de protéine, met en évidence l'existence de plusieurs régions [Figure 5.7.2] :

• La zone de solubilité de la protéine où celle-ci reste en solution. Dans ces conditions aucun cristal ne peut être obtenu.

• La zone métastable (qui appartient à la zone de sursaturation), où les contraintes thermodynamiques sont favorables à l'apparition d'un précipité ou d'un germe cristallin, mais où la cinétique est trop lente pour permettre la formation d'un cristal.

• La zone de précipitation (qui appartient également à la zone de sursaturation)où les conditions provoquent l'apparition d'un précipité de protéine ;

Lors d'une expérience de cristallisation, toutes les solutions qui entrent dans la composition de la condition de cristallisation sont passées sur filtre 0,22 µm, afin d'éliminer au maximum tous les éléments qui pourraient provoquer une modification de la cristallisation (nucléation hétérogène, non cristallisation...).

5.7.1.3 Techniques de cristallisation des protéines : la diffusion de vapeur en goutte suspendue ou en goutte assise

La technique de cristallisation de diffusion de vapeur en goutte suspendue est l'une des plus utilisées. Son principe est le suivant : on dépose une goutte contenant la protéine purifiée et une concentration c_1 d'agent précipitant sur un couvercle qui est retourné et vissé sur un puits contenant une solution d'agent précipitant à la concentration c_2 deux fois supérieure à c_1. La différence de concentration, entre la goutte et le réservoir, va progressivement disparaître grâce à des échanges par diffusion de vapeur ; comme le volume du réservoir est très supérieur à celui

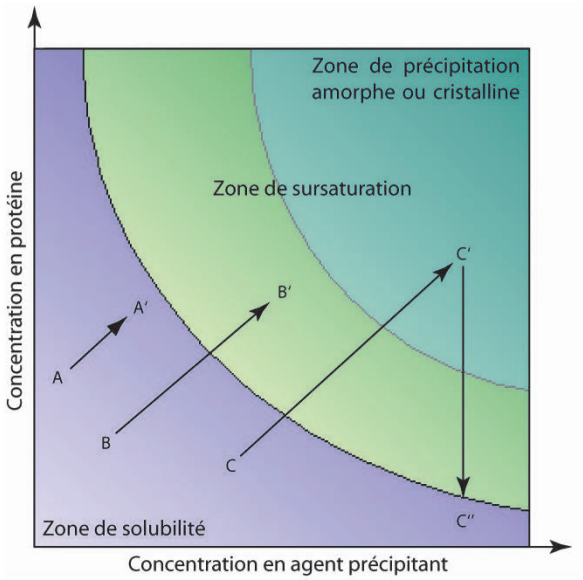


Figure 5.7.2 – Diagramme de phases. Certains chemins expérimentaux en technique de goutte suspendue à partir des conditions initiales A, B et C sont représentés.

de la goutte, cette dernière va voir son volume diminuer et sa concentration en agent précipitant augmenter jusqu'à s'approcher de c_2 [Figure 5.7.3-1].

Dans la technique de la goutte assise, la goutte est déposée sur un support fixé dans le réservoir avant de refermer le puits [Figure 5.7.3-2].

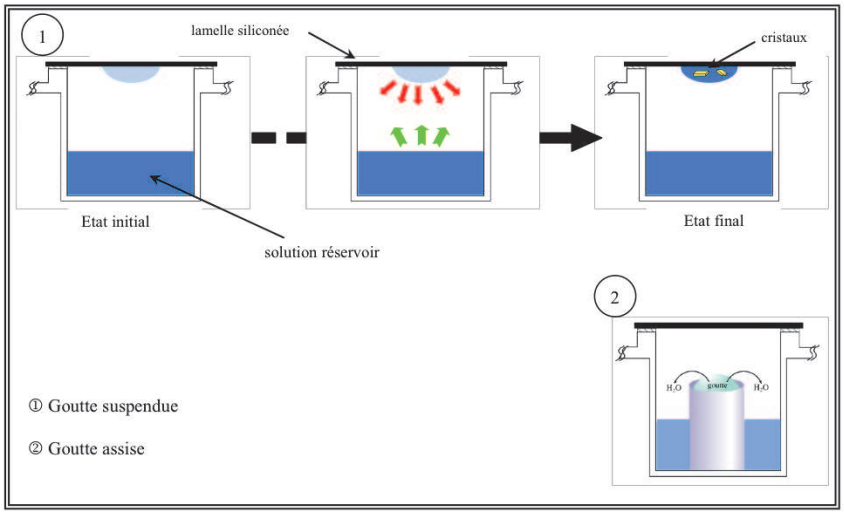


Figure 5.7.3 – Principe de la cristallisation par diffusion de vapeur

La figure 5.7.2 montre, sur le diagramme de phases, les différents chemins rencontrés lors d'une expérience de cristallisation par diffusion de vapeur en goutte suspendue :

• La première étape est toujours une augmentation des concentrations de la protéine et de l'agent précipitant (chemins A→A', B→B', et C→C') ;

• Dans le cas de la condition A, après l'équilibration de la goutte, la protéine est toujours dans la zone de solubilité, par conséquent aucun cristal ne peut être obtenu ;

• Pour la condition B, après équilibration, la protéine se trouve dans la zone métastable. Là non plus, aucun cristal ne pourra apparaître dans un délai raisonnable ;

• Pour la condition C, après équilibration, on se trouve dans la zone de précipitation, ce qui va provoquer l'apparition d'un précipité ou de germes cristallins. La concentration de la protéine va alors diminuer jusqu'à atteindre la zone de solubilité (C''), où le cristal pourra croître.

5.7.1.4 Criblage des conditions de cristallisation

Le criblage initial des conditions de cristallisation a été facilité par l'accès au robot de cristallisation CARTESIAN du PSB (Partnership in Structural Biology). Celui-ci crible automatiquement jusqu'à 6x96 conditions commerciales avec une quantité de protéine très limitée (100 nL/goutte). La méthode utilisée pour la cristallisation est la diffusion de vapeur en goutte assise (0.1 µl de solution protéique et 0.1 µl de solution de la condition de cristallogenèse avec un réservoir contenant 100 µl de la condition de cristallogenèse). Le criblage permet de dégager assez rapidement les premières tendances de cristallisation du système en utilisant peu de matériel et en testant un grand nombre de paramètres. Dans les cas favorables, les conditions sont reprises à la main et permettent d'obtenir les premiers cristaux. Ces cristaux ne sont pas toujours propices à la diffraction et une optimisation peut être nécessaire. L'optimisation consiste à faire varier quelques paramètres (sels, pH, température, ...) afin d'obtenir des cristaux de taille et de qualité suffisante pour la diffraction.

5.7.2 La cristallographie aux rayons X

5.7.2.1 La cryocristallographie

La congélation des cristaux de protéine : Les sources intenses, comme celles produisant le rayonnement synchrotron, peuvent provoquer, lors de l'enregistrement de données de diffraction, des dégâts importants dus au rayonnement X : il peut y avoir formation de radicaux libres qui diffusent et endommagent les molécules du cristal (réduction des cations métalliques, coupure des ponts disulfures...), entraînant une diminution importante de la qualité de diffraction. Une des solutions est l'utilisation de la cryocristallographie : le cristal est amené à une température inférieure à 100 K par refroidissement rapide dans de l'azote liquide, ce qui limite considérablement la propagation des dégâts radiatifs, conservant ainsi la qualité de diffraction initiale pendant une longue durée. Pendant toute l'expérience d'enregistrement des données de diffraction, le cristal est maintenu dans un flux d'azote gazeux à 100K. L'utilisation des techniques de congélation est devenue aujourd'hui quasi systématique.

Les cryoprotectants : Si on refroidit un cristal, la solution de cristallisation qui l'entoure et l'eau qu'il contient peuvent cristalliser en l'endommageant de façon importante. La diffraction engendrée par la glace ainsi formée va de plus gêner l'intégration des taches de diffraction. Afin que l'eau ne forme pas de glace et se fige de façon amorphe, on ajoute au cristal un cryoprotectant, comme par exemple du PEG, du glycérol ou du MPD. Le choix du cryoprotectant impose généralement plusieurs tests pour déterminer sa nature et sa concentration optimale, car son ajout peut perturber l'équilibre et endommager le cristal. La solution cryoprotectante est ajoutée, en fonction du cristal, directement dans la goutte, par trempages successifs ou par trempage rapide.

5.7.2.2 Diffraction aux rayons X par les cristaux

Seuls certains aspects généraux de la résolution de structure seront exposés ici. En effet, ce sont Eric Girard et Richard Kahn du groupe ELMA de l'IBS qui ont réalisé toutes les étapes nécessaires à l'obtention des structures discutées dans la partie résultat de cette thèse ; de l'enregistrement des données à la détermination des structures. L'analyse des structures a fait l'objet d'un travail collectif.

Un cristal est un solide ordonné où toutes les molécules qui le composent sont disposées de façon régulière. Ainsi, il est constitué d'un motif de base (l'unité asymétrique) qui, par une combinaison de translations et de rotations forme une maille élémentaire, elle-même reproduite par translation dans les trois dimensions de l'espace. La maille élémentaire est décrite par trois vecteurs et trois angles.

L'onde diffractée par le cristal est la somme cohérente de la diffusion de l'onde par les électrons de tous les atomes présents dans la maille élémentaire. Ainsi, à partir de l'observation de taches de diffractions enregistrées sur un détecteur, le traitement des données permet de mesurer l'intensité des taches et leurs positions dans l'espace de diffraction. On remonte ensuite par l'application d'équations mathématiques à la densité électronique de la molécule étudiée : l'image finale est ainsi obtenue en recombinant par le calcul toutes les ondes diffractées par le cristal, en tenant compte de leurs amplitudes et de leurs phases.

L'expérience de diffraction en elle-même permet d'obtenir l'amplitude de chaque onde, toutefois elle ne donne pas directement accès à l'information de phase. Pour CnrXs ; nous avons utilisé deux méthodes différentes pour accéder à ce paramètre :

-Le remplacement moléculaire : cette méthode n'est applicable que s'il existe une structure tridimensionnelle d'une protéine homologue à celle que l'on étudie. Le but est de positionner le modèle atomique connu dans la maille du cristal étudié afin d'obtenir une première estimation des phases. Cette méthode a été utilisée pour résoudre la structure de CnrXs-E63Q.

-La diffusion anomale multiple (MAD) : cette méthode utilise des atomes lourds caractérisés par une forte densité électronique. Ils contribuent de façon non négligeable à l'intensité diffractée

totale. Ainsi, si on mesure la différence des intensités enregistrées sur un cristal natif et sur un cristal dérivé (contenant un atome lourd), on pourra dans un premier temps connaitre la position de l'atome lourd puis accéder à l'information de phase de la protéine native. Toutefois, les deux cristaux utilisés pour ces enregistrements doivent être isomorphes, c'est-à-dire que la présence de l'atome lourd ne doit modifier ni la maille, ni la symétrie, ni la position de la protéine. Pour pallier cet inconvénient majeur, la méthode MAD utilise un seul cristal dérivé. On enregistre plusieurs jeux de données à différentes longueurs d'onde, voisines d'un seuil d'absorption de l'atome lourd, ce qui fait varier les propriétés de diffusion des rayons X. Cette stratégie permet de déterminer les positions des atomes responsables du signal anomal et de remonter aux phases de la protéine en n'utilisant qu'un cristal unique. Dans notre cas, les protéines ont été métallées par les ion Co^{2+}, Ni^{2+}et Zn^{2+}avant d'être mises à cristallisées (technique de co-cristallisation). Avant chaque expérience nous avons vérifié la présence et la nature de ces ions par une expérience de fluorescence aux rayons X.

5.7.2.3 Les critères d'évaluation du modèle

La qualité des données et du modèle final est évaluée par différents facteurs expérimentaux comme :

- La limite de résolution : correspond à la distance minimale, exprimée en Å, séparant deux atomes que l'on parvient à discerner.
- La complétude : exprime le nombre de réflexions expérimentalement mesurées par rapport au nombre théorique attendu.
- La redondance : traduit le nombre de mesures faites sur chaque réflexion. Plus la mesure de l'intensité d'une réflexion est redondante et plus l'information moyennée sera précise.
- La fiabilité du modèle : le modèle est construit à partir de données expérimentales. Sa compatibilité avec la stéréochimie des acides aminés est contrôlée par le calcul des écarts des valeurs des angles de liaison et des distances interatomiques par rapport aux valeurs standards. Les facteurs R et R_{free} traduisent le pourcentage d'accord entre les amplitudes observées dans l'expérience et de celles calculés d'après le modèle. Pour résumer, le modèle est d'autant plus proche de la réalité expérimentale que les valeurs de ces deux facteurs sont faibles et voisines l'une de l'autre. Pour une structure déterminée à 2,5 Å de résolution, on admet que des valeurs de l'ordre de 20 à 25 % correspondent à des modélisations structurales exploitables.

5.7.2.4 L'analyse des structures

Afin d'analyser et d'interpréter les structures nous avons utilisé les programmes Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) et Pymol (DeLano, 2002). Toutes les figures présentées dans cette thèse ont été créées avec Pymol.

5.7.3 L'enregistrement des données de diffraction

Les différentes données de diffraction sur les cristaux de CnrXs ont été enregistrées sur les lignes de lumière FIP-BM30a de l'ESRF et PROXIMA1 de SOLEIL. Les statistiques de la cristallisation, de l'enregistrement des données et de l'affinement sont indiquées dans le tableau 8.2 page 151.

Troisième partie

Résultats et Discussions

Chapitre 6

Caractérisation de CnrX *in vivo*

Pour identifier les métaux qui induisent l'expression de *cnrX* chez la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34, nous avons complété les expériences d'analyses transcriptomiques de Monchy *et al.,* 2007 par une étude sur la production de CnrX dans différentes conditions.

6.1 Influence des métaux sur la production de CnrX

La première partie de l'expérience a été réalisée par nos collaborateurs Max Mergeay et Nathalie Leys (SCK-CEN, Mol, Belgique), des spécialistes de la microbiologie et de la génétique microbienne de *C. metallidurans* CH34. Les bactéries ont été cultivées pendant trois heures en présence de différents métaux (selon un protocole explicité dans la partie matériels et méthodes, section 5.2 page 82). Elles ont été ensuite récoltées par centrifugation et les culots bactériens ont été envoyés à notre laboratoire.

Dans la seconde partie de l'expérience, une fraction des culots provenant du lot contrôle, ou des lots cultivés en présence des sels métalliques choisis $ZnCl_2$, $CuSO_4$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, a été dénaturée et déposée sur gel d'électrophorèse dénaturant. La présence de la protéine CnrX est ensuite révélée par immunodétection (Western Blot) [1]. Deux protéines contrôles ont été utilisées : CnrXs et NccX. Ces contrôles, en plus de fournir une validation de la manipulation permettent également d'évaluer la taille de la protéine reconnue par les anticorps.

NccX est un homologue de la protéine CnrX [voir introduction, section 4.2.2.1 page 68] avec laquelle elle partage 86% de similarité et 73% d'identité. A cause de ces très fortes homologies, NccX est sans surprise également reconnue par les anticorps anti-CnrXs. Nous avions naturellement tenté dans un premier temps de surproduire CnrX chez *E. coli* et de la purifier comme contrôle pour l'immunodétection. Si la production de protéine n'est pas un facteur limitant, il n'en est pas de même de sa solubilisation par les détergents et, a *fortiori* de sa purification. Nous nous sommes alors tournés vers NccX qui est remarquablement bien produite elle aussi et

1. Des anticorps contre la protéine CnrXs ont été produits et testés avant mon arrivée

plus facilement purifiée [voir matériels et méthodes, section 5.1.8, voir résultats et discussions, section 7.2.3 page 119]

Les résultats sont présentés dans la figure 6.1.1 (a). Une protéine de même taille que NccX est détectée dans les échantillons qui proviennent de bactéries cultivées avec du nickel, du cobalt et du cuivre. La différence de masse entre NccX (16685 kDa) et CnrX (16632 kDa) étant minime, nous pouvons conclure que cette protéine correspond à CnrX. L'expression de CnrX est comparativement plus induite par le nickel que par le cobalt qui est lui-même plus inducteur que le cuivre. A l'inverse, CnrX n'est pas détectée dans deux cas : lorsque les cellules ne sont pas confrontées à un stress métallique (contrôle négatif), ou quand les bactéries sont mises en présence de zinc.

Ces résultats sont confirmés par l'analyse de la figure 6.1.1(c). Dans cette expérience, l'influence des différents sels métalliques a été testée afin de vérifier que les variations d'induction mises en lumière précédemment proviennent de l'ion métallique en lui-même. Les ions entrainent la même réponse qu'ils soient sous forme de sels de chlorure ou de sels de sulfate (pour le cuivre, sels de nitrate). De plus, les deux concentrations de cobalt utilisées (2 mM et 10 mM) n'engendrent pas de différences dans l'induction de CnrX. Pour ces concentrations on n'observe donc pas d'effet dose réponse. L'intensité de la réponse au cobalt peut avoir atteint un plateau dès 2 mM, à moins que le cobalt en excès soit également pris en charge par le système Czc [voir introduction, section 4.2 page 62].

En conclusion, ces expériences confirment que l'expression de *cnr* n'est pas constitutive et que le nickel, le cobalt et le cuivre sont des métaux inducteurs tandis que le zinc n'a pas d'effet. Deux raisons peuvent expliquer l'incapacité du zinc à induire une réponse cellulaire : (i) le zinc ne peut pas se lier à CnrX ou, (ii) le zinc se lie à CnrX mais n'induit pas une forme active de la protéine. L'étude stucturale sur les formes métallées de CnrXs permettra de discriminer entre les deux propositions [voir résultats et discussions, chapitre 8 page 147] .

6.2 Quelle est la topologie de CnrX ?

L'outil de prédiction TMHMM (http ://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) qui indique les portions de séquence pouvant former des hélices transmembranaires, prévoit que la protéine CnrX possède un segment transmembranaire entre les acides aminés 9 et 32 [Figure 6.2.1].

Nous avons voulu vérifier la topologie de la protéine CnrX. Pour cela nous avons fractionné les cellules de CH34 par des centrifugations/ultracentrifugations successives afin de séparer les fractions membranaires des fractions solubles [voir matériels et méthodes, section 5.2.1 page 83]. Le profil d'expression de CnrX dans les fractions membranaires est identique à ce qui a été décrit dans la figure 6.1.1(a) qui présente les extraits totaux de CH34. L'immunodétection des protéines

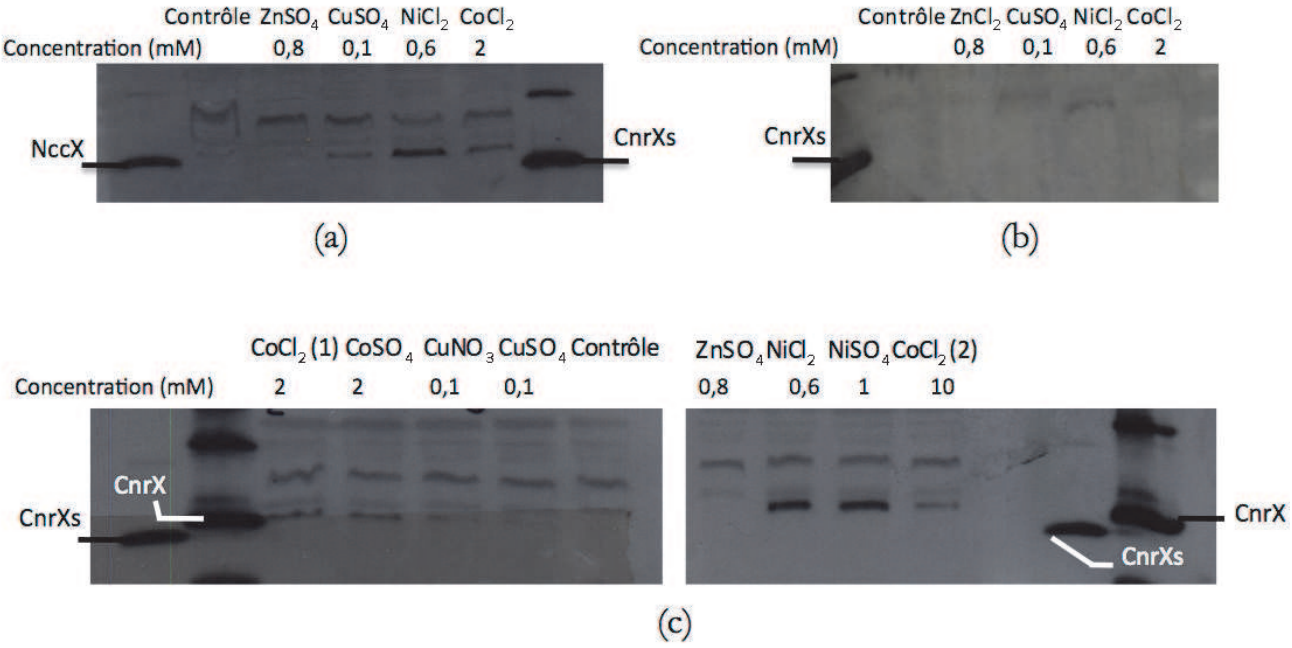


Figure 6.1.1 – Evaluation de la production de CnrX par immunodétection. Des cultures de *C. metallidurans* CH34 sont réalisées en milieu 284 et additionnées par différentes concentrations de métaux, identiques à celles utilisées dans les expériences déjà publiées par Monchy *et al.*, 2007 : 2 mM $CoCl_2$(1)/ 10 mM $CoCl_2$ (2)/ 2 mM $CoSO_4$, 0,6 mM $NiCl_2$ / 1 mM $NiSO_4$, 0,1 mM $CuSO_4$/ 0,1 mM $Cu(NO_3)_2$ ou 0,8 mM $ZnSO_4$. Des cultures contrôles (sans ajout de métal) sont également réalisées en parallèle. (a) Immunodéctection de CnrX dans des extraits bactériens entiers. (b) Immunodétection de CnrX dans le cytoplasme et dans le périplasme des cellules après leurs fractionnements (c) Immunodétection de CnrX dans des extraits bactériens entiers cultivés avec différents sels métalliques. Les contrôles sont les suivants : CnrXs, partie soluble de CnrX surexprimée chez *E. coli* et purifiée, NccX, protéine homologue de CnrX surexprimée et purifiée chez *E. coli*, CnrX, extraits membranaires de *E. coli* surexprimant CnrX

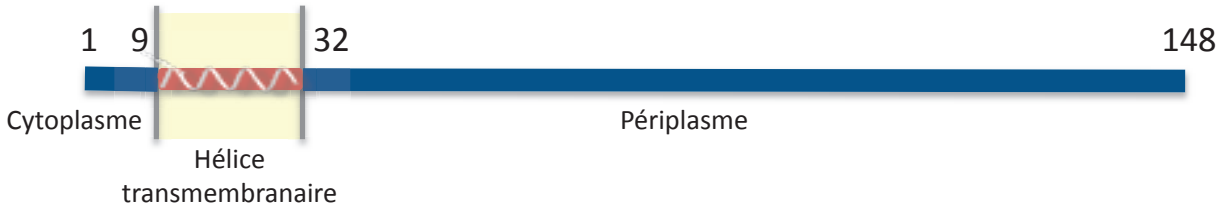


Figure 6.2.1 – Topologie de la protéine CnrX d'après TMHMM

contenues dans la fraction soluble est montrée dans la figure 6.1.1(b). CnrX n'est pas détectée dans cette fraction quelles que soient les conditions. CnrX est donc une protéine membranaire, comme la majorité des senseurs des systèmes de régulation de type ECF connus jusqu'à présent (DegS, FecR, HasR, voir introduction, section 3.3 page 51).

Chapitre 7

Etude spectroscopique de la protéine CnrXs

CnrX est la protéine senseur du système de régulation *cnr*. Son rôle est de détecter le métal et de transmettre l'information à travers la membrane pour permettre la libération de CnrH par CnrY et cela seulement en présence de cobalt, de cuivre et de nickel mais pas de zinc [voir résultats et discussions, section 6.1 page 105].

Le but principal de cette étude est de comprendre la manière dont CnrX détecte le métal et les stratégies qu'elle utilise pour sélectionner le nickel et le cobalt parmi tous les autres ions présents dans son environnement proche. Dans l'introduction nous avons mis en lumière que la question de la selectivité d'une protéine pour un métal est un des thèmes capitaux de recherche en chimie bio-inorganique. Les nombreux résultats obtenus sont le sujet principal de revues récentes (Waldron et Robinson, 2009; Waldron *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009b; Reyes-Caballero *et al.*, 2011). Les études sur la selectivité des protéines ont été réalisées de deux façons différentes, soit en étudiant des métallorégulateurs homologues mais de spécificité différentes (type RcnR/CsoR [section 3.1.2 page 44] ou NmtR/CzrA-SmtB [section 3.1.3 page 45], soit en étudiant comme dans notre cas une seule protéine et en caractérisant les effets des différents métaux par des techniques spectroscopiques ou/et structurales (voir l'exemple de NikR, section 3.1.1 page 41 et de NmtR, section 3.1.3 page 45). Il a été démontré que pour la majorité des métallorégulateurs, ce n'est pas l'affinité mais l'exploitation de la chimie de coordination du métal qui définit la composante principale de la sélectivité.

Par l'étude de la protéine CnrX nous prenons part à ces investigations tout en adoptant une certaine originalité. Il s'agit en effet, de la première étude d'un senseur périplasmique de cations métalliques. Dans ce compartiment, la concentration en métal reflète celle du milieu extérieur (Nies, 2007; Nikaido et Vaara, 1985) et n'est pas tamponnées comme dans le cytosol, où les concentrations en cuivre et en zinc libres, les métaux les plus affins pour les protéines selon la série d'Irving Willams [voir introduction, section 1.2.3 page 14], sont extrêmement faibles

(10^{-15} M pour le zinc et 10^{-21} M pour le cuivre (Outten et O'Halloran, 2001; Changela *et al.*, 2003)).

La question de la sélectivité d'une protéine périplasmique pour les métaux est donc posée. Est ce que tous les métaux se fixent dans un site unique pour lequel ils rentrent en compétition ou, ont-ils des sites de liaison différents ? Est ce que la sélectivité se fait par l'intermédiaire de l'affinité des différents métaux pour ce(s) sites(s) ou par la coordination que l'ion adopte ? Quelles sont les différences/similarités de CnrX avec les métallorégulateurs cytoplasmiques ?

L'exploitation de données provenant de différentes méthodes spectroscopiques nous permet d'apporter un début de réponse à ces interrogations. Cependant, peu d'informations concernant l'interaction de la protéine avec le zinc peuvent être obtenues par ce biais, car du fait de sa structure électronique particulière (ses électrons remplissent complètement l'orbitale *d)* il est silencieux dans les techniques spectroscopiques usuelles, en particulier la spectroscopie UV-visible et la résonance paramagnétique électronique (RPE) (Housecroft et Constable, 2006).

7.1 Production et purification de CnrXs

La séquence codante de CnrXs (domaine soluble de CnrX, résidus 31 à 148) [voir introduction, figure 4.2.5 page 69] a été clonée dans le vecteur d'expression pET30b inductible par l'IPTG. Le plasmide résultant a été utilisé pour transformer la souche BL21(DE3) d'*E. coli.* Après induction pendant 3 h par l'IPTG (0,4 mM), nous avons contrôlé l'accumulation de la protéine CnrXs sur gel. Les bactéries ont ensuite été cassées par sonication pour libérer le contenu cellulaire. L'ADN a été précipité par du sulfate de streptomycine. Puis, le surnageant obtenu après centrifugation a été mis en présence de sulfate d'ammonium pour précipiter les protéines.

CnrXs, qui ne possède pas d'étiquette pour ne pas interférer dans son interaction avec les métaux, a ensuite été purifiée par un protocole simple en deux étapes : une chromatographie échangeuse d'anion (le pI de la protéine est de 6, à pH 8 elle est donc chargée négativement), et une filtration sur gel [Figure 7.1.1]. Toutes les phases, de l'extraction jusqu'à la purification (exceptée la dernière étape de filtration sur gel) ont été réalisées en présence d'EDTA, un chélateur de métaux, afin d'éviter les contaminations comme celle mise en évidence par Pompidor *et al.* (2008) [voir introduction, section 4.2.2.3 page 70]. Le rendement final de purification est de 35 mg de protéine pure par litre de culture.

7.2 Caractérisation des sites de liaison au métal par spectroscopie UV-visible

Cette méthode est une technique simple à mettre en oeuvre qui peut donner une première idée du nombre de sites métalliques de la protéine, ainsi que des indications sur l'environnement

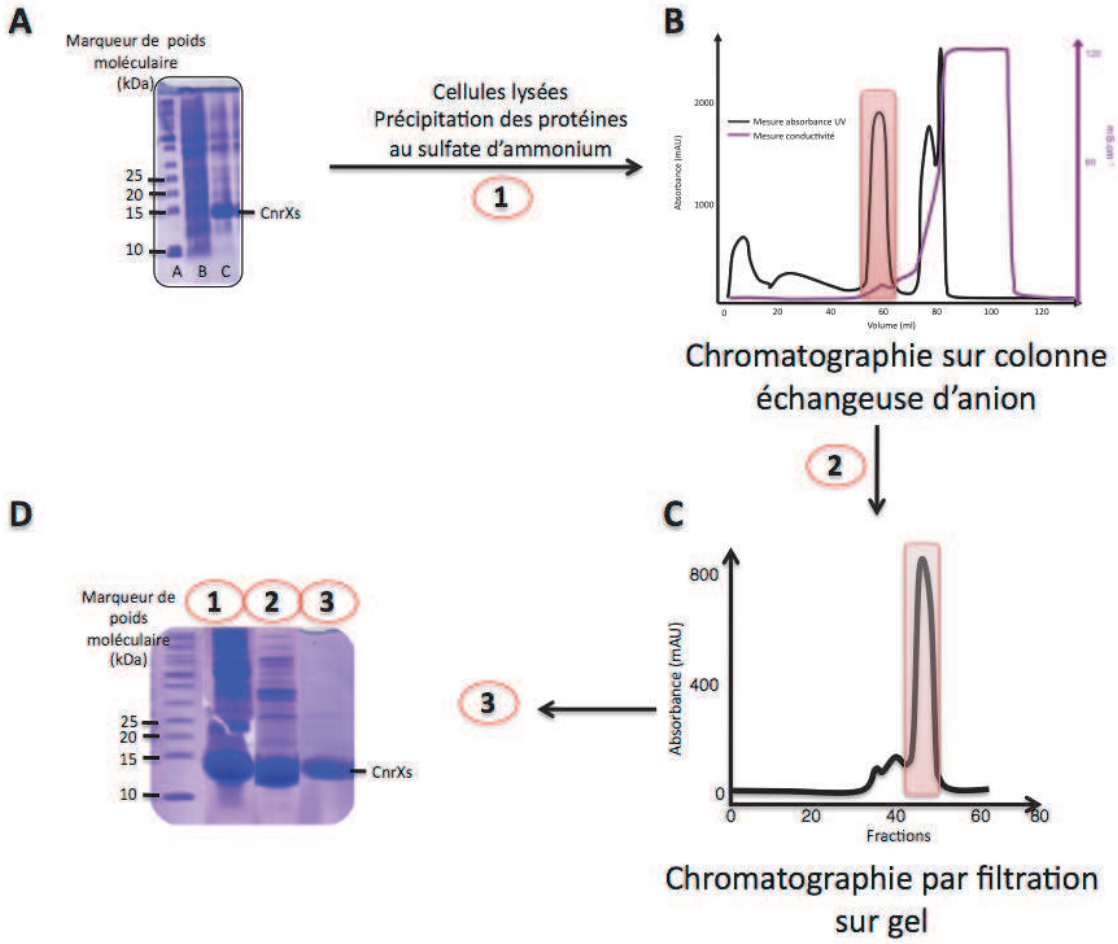


Figure 7.1.1 – De la production à la purification de CnrXs. Figure A : Contrôle de la surproduction de CnrXs par SDS-PAGE. Puits A : Marqueur de poids moléculaire, Puits B dépôt d'un aliquote de culture avant induction, Puits C dépôt d'un aliquote de culture après induction pendant 3 h par l'IPTG. Les cellules sont ensuite lysées par sonication, puis les protéines sont précipitées au sulfate d'ammonium avant d'être resolubilisées et injectées sur une colonne échangeuse d'anions. Figure B : Chromatogramme obtenu après la première étape de purification sur colonne échangeuse d'anions (HiTrap HP- GE Healthcare). La courbe noire représente l'absorbance à 280 nm en fonction du volume d'élution et la courbe mauve indique l'évolution de la conductivité électrique. Les fractions retenues (rectangle rouge) sont choisies d'après le chromatogramme et des analyses électrophorétiques en conditions dénaturantes, ces fractions sont rassemblées, concentrées et injectées sur une colonne de filtration du gel. Figure C : Chromatogramme obtenu après la deuxième étape de purification par filtration sur gel (colonne Sephadex 75 GE Healthcare de 125 mL). La courbe noire représente l'absorbance à 280 nm en fonction du volume d'élution. Les fractions retenues (rectangle rouge) sont choisies d'après le chromatogramme et des analyses électrophorétiques en conditions dénaturantes, ces fractions sont rassemblées, concentrées et stockées à -80°C. Figure D : Dépôt sur gel d'électrophorèse d'échantillons provenant des différentes étapes de purification : 1 : Protéines après précipitation par sulfate d'ammonium et resolubilisation 2) Fractions de protéines purifiées par la chromatographie échangeuse d'anion 3) Protéine purifiée en sortie de filtration sur gel.

de l'ion et les affinités relatives de chacun des métaux. Cette méthode doit toutefois toujours être complétée par d'autres techniques plus précises et plus spécifiques.

La protéine, en absence de métal, présente un spectre avec un seul pic d'absorption à 280 nm dû à la transition $\pi \rightarrow \pi*$ de l'unique tryptophane présent dans CnrXs et caractérisé par un coefficient d'extinction molaire de 16450 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Pompidor *et al.*, 2009).

7.2.1 Spectres d'absorption du nickel et du cuivre

Les propriétés de métallation de CnrXs ont d'abord été étudiées par l'analyse des spectres d'absorption UV-visible de la protéine en présence de nickel.

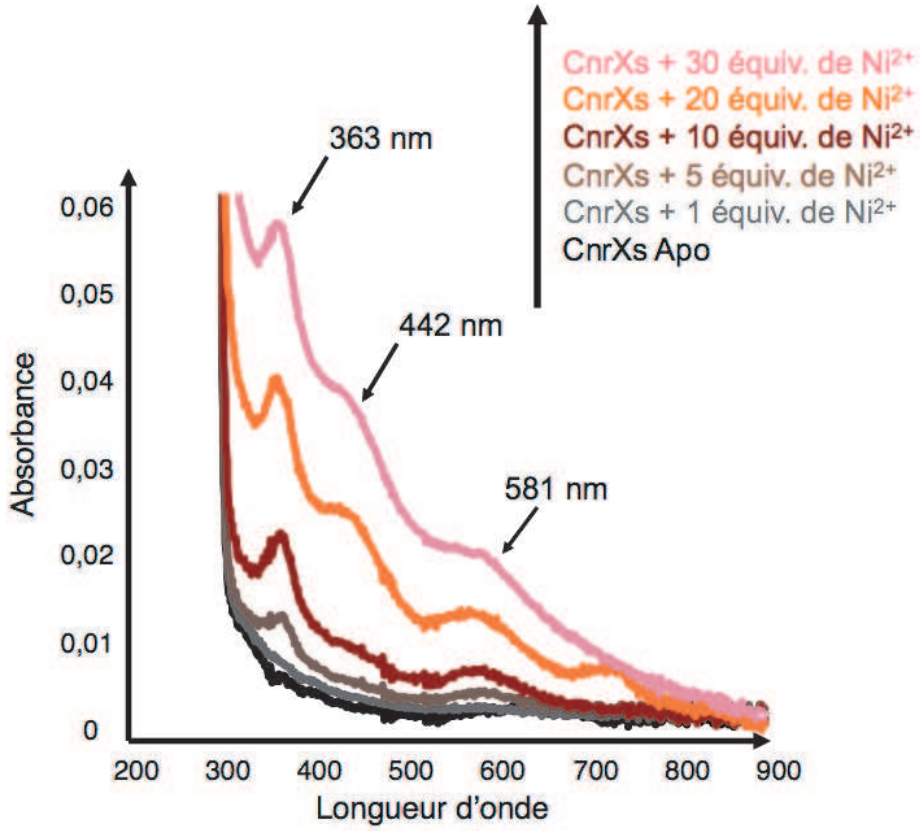


Figure 7.2.1 – Spectres d'absorption UV-visible de CnrXs à 100μM sans métal (apo) et en présence de concentrations croissantes de nickel. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique : $NiCl_2$

L'ajout de quantités croissantes d'ions Ni^{2+} fait apparaitre trois bandes d'absorption à 363, 442, et 581 nm [Figure 7.2.1]. L'intensité du signal est très faible avec des coefficients d'extinction molaire compris entre 5 et 10 $M^{-1}.cm^{-1}$. Il n'y a pas de saturation du signal et cette augmentation continue de l'absorption pourrait être le fait de liaisons non spécifiques de la protéine avec le nickel. On ne peut donc pas déduire de ces spectres le nombre de sites métalliques.

Les bandes d'absorption entre 250 et 350 nm sont caractéristiques des transferts de charges métal-ligand (LMCT - Ligand to Metal Charge Tranfert) entre un soufre et l'ion Ni(II) (Lever, 1984). L'absorption que l'on obtient à 363 nm pourrait correspondre à ce type de LMCT. Aucune cystéine n'est présente dans CnrXs, il est donc possible que la méthionine soit impliquée dans la liaison d'au moins un ion nickel comme c'est le cas pour le cuivre (Pompidor *et al.*, 2008). Ces expériences sont toutefois à considérer avec précaution car la formation de précipités lors de l'ajout de nickel a pu perturber les mesures.

L'ajout de quantités croissantes d'ions Cu^{2+} fait apparaître une bande d'absorption à 610 nm caractérisée par un coefficient d'extinction molaire de 75 $M^{-1}.cm^{-1}$ [Figure 7.2.2]. Comme dans le cas du nickel, aucune saturation du signal n'est observée lorsqu'on ajoute un fort excès de métal et la formation d'un précipité empêche des mesures de précision. Cette bande d'absorption est caractéristique des transitions *d-d* des centres Cu(II) de type 2 (Solomon *et al.*, 2004). Les sites de type 2 sont caractérisés par la coordination dans le plan équatorial d'atomes d'oxygène et d'azote en géométrie plan-carrée. Ces résultats sont donc en accord avec la structure de CnrXs métallée par le cuivre où l'ion est coordiné par une géométrie plan-carrée à des atomes d'azote et d'oxygène dans le plan équatorial .

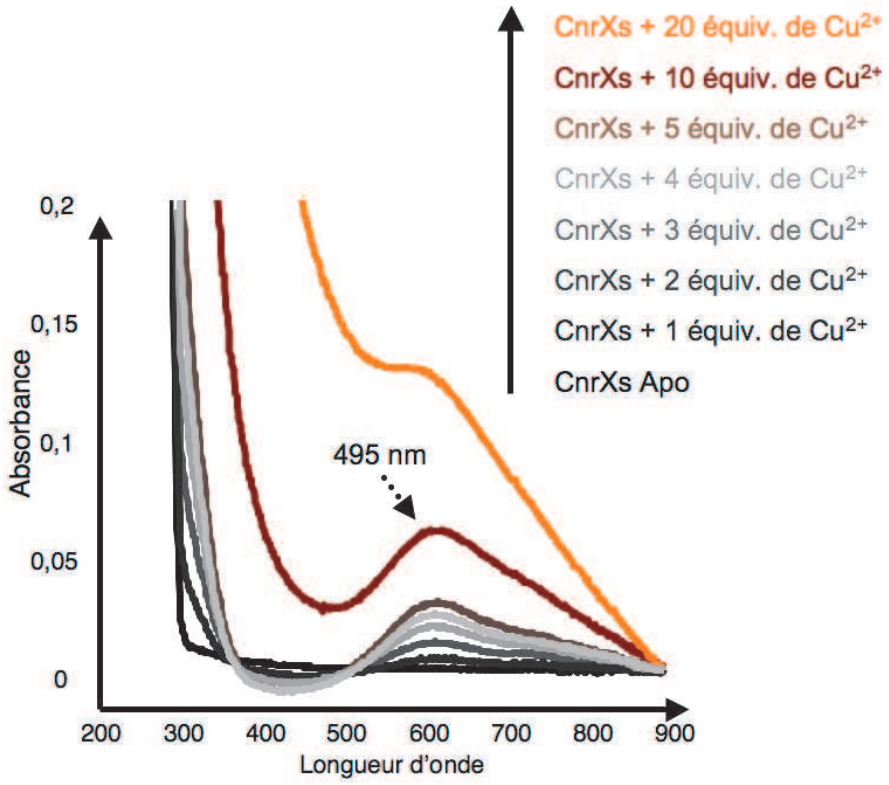


Figure 7.2.2 – Spectres d'absorption UV-visible de CnrXs à 80μM sans métal (apo) et en présence de concentration croissante de cuivre. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CuCl_2$

7.2.2 Spectres d'absorption du cobalt

Le cobalt, comme nous l'avons précédemment mentionné, est couramment utilisé comme sonde spectroscopique du fait de ses caractéristiques spectrales qui sont très informatives sur l'environnement du métal [voir introduction, section 1.2.7.3 page 26].

Après l'ajout de cobalt dans une solution de CnrXs, celle-ci devient instantanément marron foncé et cela se traduit par l'apparition d'une bande d'absorption centrée à 384 nm [Figure 7.2.3]. Il y a saturation du signal après l'ajout de 4 équivalents de cobalt par dimère de protéine. L'augmentation de l'intensité de la bande d'absorption n'est pas linéaire : on met en évidence deux phases, une première jusqu'à l'ajout de deux équivalents, caractérisée par un coefficient d'extinction molaire apparent (ε) de l'ordre de 500 M^{-1} cm^{-1}, puis une seconde phase jusqu'à la saturation à 4 équivalents qui a un ε_{384nm} de 3000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Selon ces résultats, le dimère de CnrXs peut se lier à 4 ions cobalt, soit 2 ions par monomère.

Nous n'avons pas trouvé de spectre identique dans les publications caractérisant des sites de liaison au cobalt. Le spectre obtenu est donc tout à fait original, que ce soit par sa longueur d'onde d'absorption maximale ou par la valeur de son coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde.

7.2.2.1 Identification de résidus impliqués dans la liaison au cobalt

Afin de mieux caractériser ces sites, nous avons effectué des expériences de mutagenèse dirigée pour déterminer les résidus impliqués dans les liaisons aux ions métalliques. Notre choix s'est porté sur certains des résidus dont le rôle de ligand du cuivre avait été démontré, à savoir His42, Glu63 et Met123 [voir introduction, section 4.2.2.3 page 70]. L'ajout de cobalt sur les mutants CnrXs-H42A et CnrXs-E63Q, produits et purifiés dans les mêmes conditions que CnrXs de type sauvage, entraîne également l'apparition d'une bande à 384 nm. Toutefois, le titrage s'achève après l'ajout de 2 équivalents de cobalt par dimère de protéine mutée [Figure 7.2.4]. La protéine de type sauvage sature à 4 équivalents, un des sites de fixation a donc été touché par ces mutations. Il semble donc que 2 des 4 ions cobalt liés à la protéine soit coordinés aux résidus His42 et Glu63 qui sont également des ligands de l'ion cuivre. Au contraire, le mutant CnrXs-M123A a un profil de titrage identique à celui de la protéine de type sauvage, indiquant que ce residu n'est pas indispensable à la fixation du cobalt [Figure 7.2.4]. Des données complémentaires sur le rôle du résidu Met123 dans la coordination de l'ion métallique seront présentées dans les chapitres 8 et 9.

CnrX possède 6 résidus histidines, 3 d'entre eux (His42, His46 et His119) sont strictement conservés et indispensables à la régulation de *cnr* chez CH34 [voir introduction, section 4.2.2.1 page 68] (Grass *et al.*, 2005). Nous avons en outre démontré leur rôle de ligand de l'ion cuivre (Pompidor *et al.*, 2008). Un quatrième résidu histidine (His131) est également capital pour la

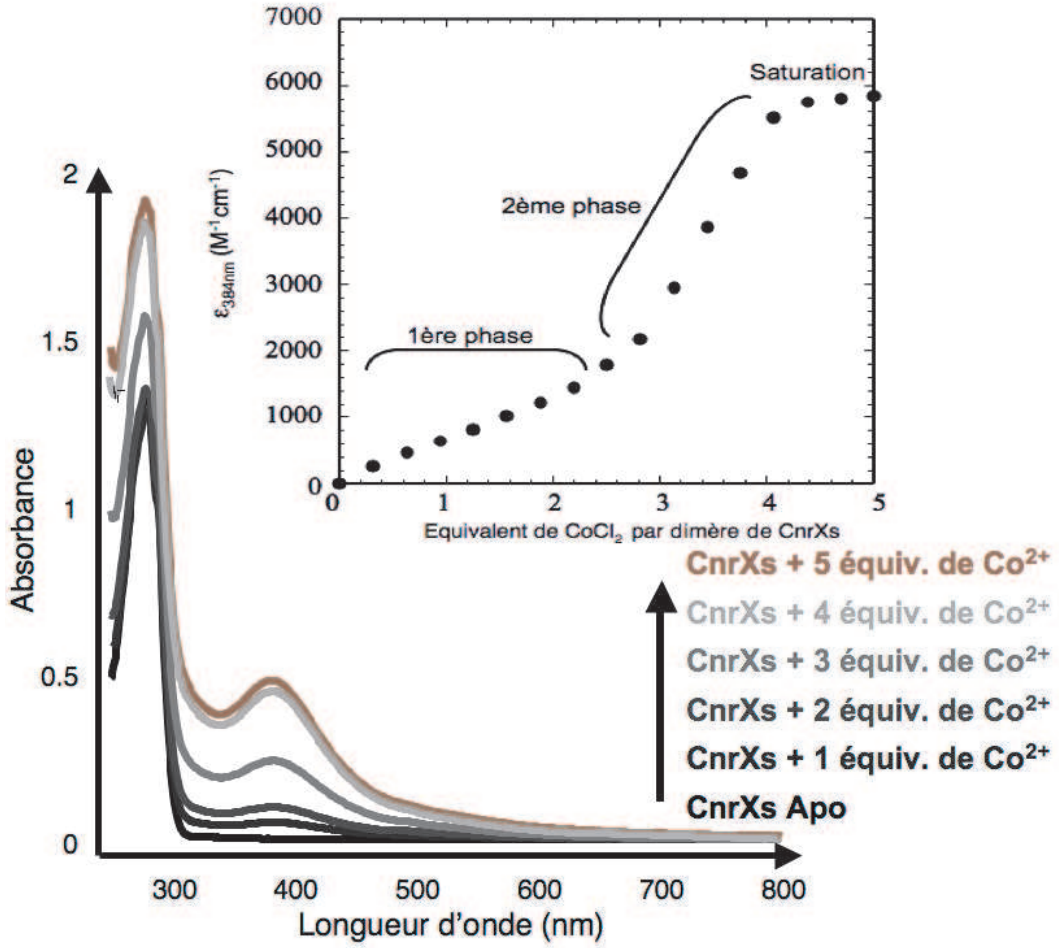


Figure 7.2.3 – Spectres d'absorption UV-visible de CnrXs à 80μM sans métal (apo) et en présence de concentrations croissantes de cobalt. L'encart montre l'évolution de ε_{384nm} en fonction du nombre d'équivalents de cobalt ajoutés. Les différentes phases du titrage sont également indiquées. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$

régulation de *cnr* [voir introduction, section 4.2.2.2 page 70](Grass *et al.*, 2005). Nous avons donc muté ce résidu pour tester son implication dans la liaison du cobalt. La forme métallée par le cobalt du mutant CnrXs-H131A se comporte de la même manière que CnrXs (bande d'absorption et ε identiques, saturation à 4 équivalents). Le résidu His131 ne semble donc pas être un ligand du cobalt [Figure 7.2.4].

CnrXs lie 4 cobalt en solution, toutefois la structure de la protéine métallée par le cuivre ne montre que deux sites de liaison par dimère de protéine. Les 8 premiers résidus de la séquence (31-SHRNEAGHG-39) n'apparaissent pas dans cette structure, mais avec 2 résidus histidine et un glutamate, certains pourraient participer à la formation d'un site supplémentaire. Pour le vérifier, nous avons donc muté une des deux histidines. Le mutant CnrXs-H32A montre un profil de titrage totalement modifié par rapport au sauvage, avec l'apparition de bandes d'absorption à 440, 495, et 525 nm [Figure 7.2.5]. Il n'y a pas de saturation du signal. La forme des spectres est tout à fait

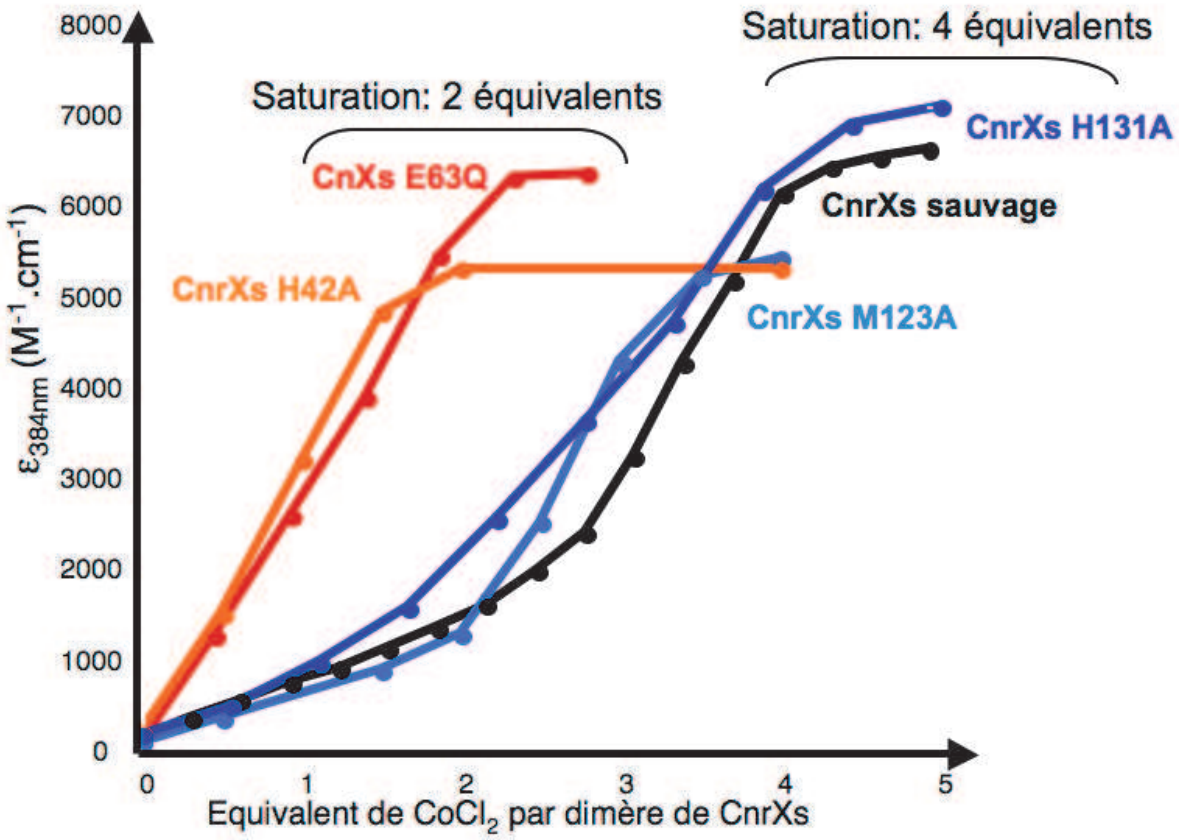


Figure 7.2.4 – Valeurs de ε_{384nm} en fonction de la concentration en cobalt ajoutée. Les spectres d'absorption UV-visible de CnrXs de type sauvage et de différents mutants en présence de concentrations croissantes de cobalt sont enregistrés. Les valeurs de ε_{384nm} sont ensuite calculées et reportées dans ce graphique en fonction du nombre d'équivalents de $CoCl_2$ ajouté. Selon les mutants, la saturation du signal apparait à 2 ou à 4 équivalents. Courbe noire : CnrXs, courbe orange : CnrXs-H42A, courbe rouge : CnrXs-E63Q, courbe bleue clair : CnrXs-M123A, courbe bleue foncé : CnrXs-H101A. Conditions : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$.

conforme à ce qui est attendu lors de la fixation d'un Co(II) sur une protéine. Les bandes à 440, 485 et 525 nm, dont les intensités croissent durant la métallation, sont des bandes de transition *d-d* caractéristiques de Co(II). L'intensité des bandes est faible, le coefficient d'extinction molaire de la bande à 495 nm est de 75 $M^{-1}.cm^{-1}$. Des observations empiriques sur des complexes de Co^{2+} ont établi que le coefficient d'extinction molaire pouvait être utilisé comme un indicateur du nombre de coordination : ainsi pour un site tétracoordiné ce coefficient a une valeur supérieure à 300 $M^{-1}.cm^{-1}$, dans les sites pentacoordinés ce coefficient est inférieur à 300 $M^{-1}.cm^{-1}$ et, dans un complexe octaédrique ce coefficient est proche de 50 $M^{-1}.cm^{-1}$(Banci *et al.*, 1982). L'intensité du signal obtenu laisse envisager que le site métallé soit de coordination penta ou hexacoordiné. Il semblerait donc qu'avec la mutation H32A nous ayons considérablement altéré le site donnant la signature spectrale atypique.

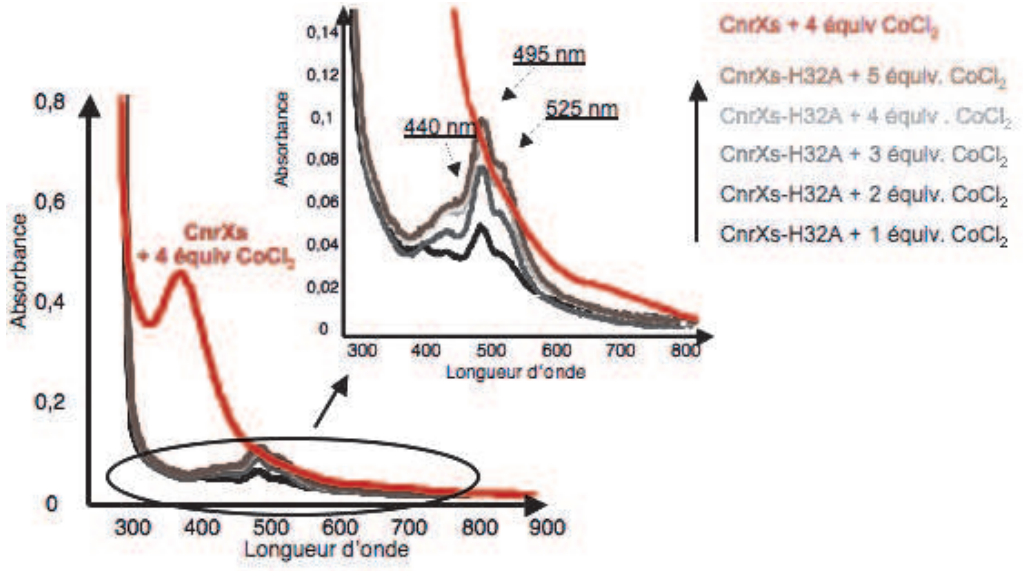


Figure 7.2.5 – Spectres d'absorption UV-visible de CnrXs-H32A à 530μM sans métal (apo) et en présence de concentrations croissantes de cobalt. Le spectre de la protéine CnrXs de type sauvage avec 4 équivalents de cobalt est montré en comparaison. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$

La protéine CnrXs comporte donc deux sites de liaison au cobalt par monomère : un site de géométrie octaédrique impliquant au moins les résidus His42 et Glu63 que nous appellerons site 1, et un site incluant au moins le résidu His32 que nous nommerons site 2.

7.2.2.2 Analyse de l'effet de l'oxygène sur l'absorption du cobalt

Les spectres d'absorption électroniques du Co(II) dans un environnement protéique ont été étudiés en détails. Ils sont tous caractérisés par des bandes d'absorption entre 500 nm et 700 nm, du type de celles enregistrées pour le mutant CnrXs-H32A. Ces bandes sont parfois accompagnées par une absorption intense vers 300 nm ($\varepsilon \geq$ 1000 $M^{-1}.cm^{-1}$), signature d'un transfert de charge entre le soufre d'une cystéine et le cobalt (Maret et Vallee, 1993). Aucune cystéine n'est présente dans la protéine et nous avons démontré que la seule méthionine existante n'était pas indispensable à la liaison du cobalt. Le spectre atypique, caractérisant l'interaction entre CnrXs et le cobalt, n'a donc pas pour origine une liaison entre un atome de soufre et l'ion métallique.

En examinant la littérature pour trouver des similarités entre les spectres que nous avions obtenus et des résultats publiés, nous avons pensé que l'oxygène pouvait avoir une influence sur le signal du cobalt. En effet, il a depuis longtemps été découvert que l'ajout d'oxygène sur des amines de cobalt en solution pouvait entrainer une forte absorbance entre 300 et 400 nm de ces complexes (Wilkins, 1971). De plus, Larabbee *et al.* dans un article paru en 2008, présentent des complexes de Co(II)Co(III) modèles caractérisés par une absorbance à 360 nm (longueur d'onde proche de celle du site 2) et une intensité élevé ($\varepsilon \geq$1000 $M^{-1}.cm^{-1}$). Nous avons extrapolé ces

résultats en émettant l'hypothèse qu'en présence d'oxygène, le cobalt (II) dans le site 2 pouvait être oxydé en cobalt (III) et donner le spectre atypique décrit précédemment (Larrabee *et al.*, 2008).

Expérience sous anaérobiose : Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des expériences de titrage en boîte à gants, sous anaérobiose. Lorsque l'on ajoute du cobalt dans une solution de CnrXs dans ces conditions, celle-ci devient rose très clair. Ainsi, de manière intéressante, le titrage de la protéine CnrXs de type sauvage en boite à gant présente un spectre très similaire à celui de CnrXs-H32A avec des bandes d'absorption à 440, 495 et 525nm [Figure 7.2.6]. L'intensité des bandes est faible, le coefficient d'extinction molaire de la bande à 495 nm est de 75 $M^{-1}.cm^{-1}$. L'intensité de ces bandes augmente linéairement. Le spectre n'étant pas modifié pendant tout le titrage, cela suggère que les deux sites ont en absence d'oxygène le même type de géométrie.

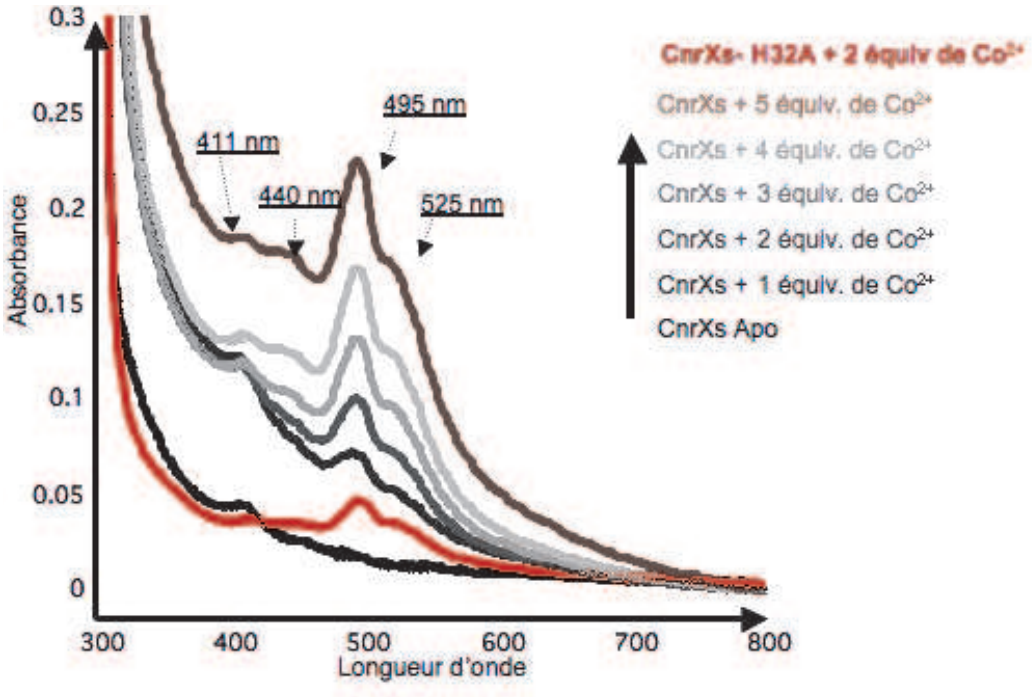


Figure 7.2.6 – Spectres d'absorption UV-visible de la protéine CnrXs de type sauvage à 564μM sans métal (apo) et en présence de concentrations croissantes de cobalt sous anaérobiose. Le spectre de la protéine CnrXs-H32A avec 2 équivalents de cobalt est montré en comparaison. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$

Conséquence de l'apport d'oxygène : Nous avons ensuite évalué le rôle de l'apport de l'oxygène sur le profil d'absorption, en mettant au contact de l'air les échantillons préparés en boîte à gants. Sur la protéine de type sauvage, lorsque l'on ouvre à l'air les tubes contenant 2 équivalents de cobalt, le spectre de la solution n'est pas modifié [en bleu sur la figure 7.2.7]. A l'inverse, la

même expérience sur un tube contenant six équivalents de cobalt conduit à l'apparition de la bande d'absorption centrée à 384 nm [en rouge sur la figure 7.2.7].

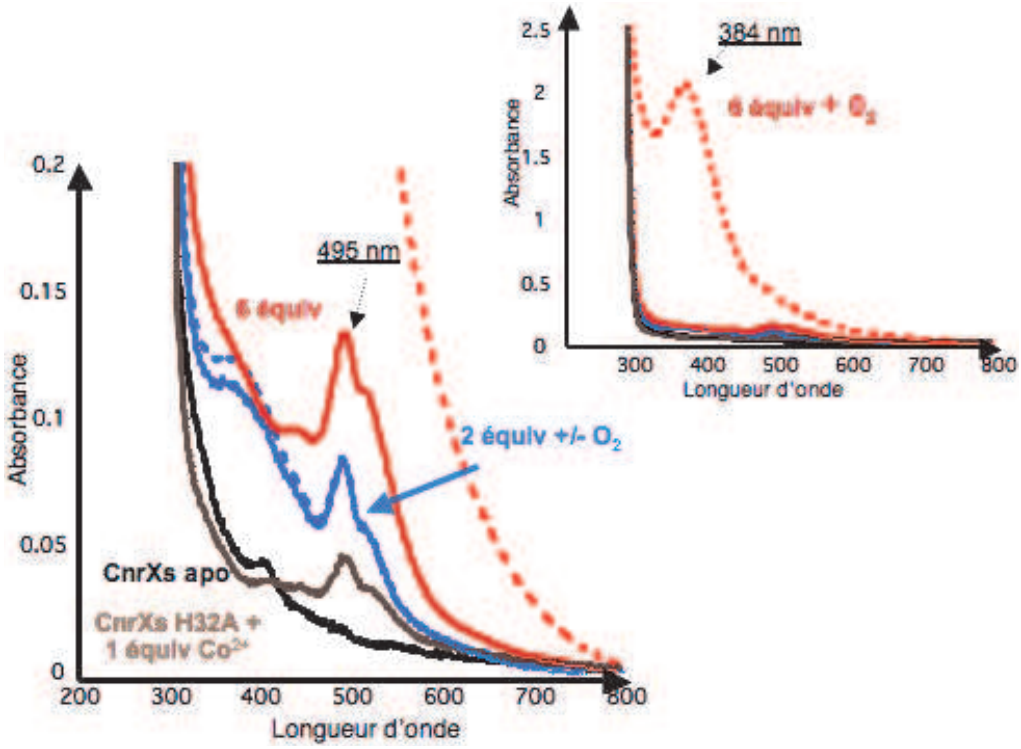


Figure 7.2.7 – Spectres d'absorption UV-visible de la protéine CnrXs de type sauvage à 406μM après ajout de 2 équivalents (courbe bleu) et 6 équivalents (courbe rouge) de $CoCl_2$ sous anaérobiose (traits pleins) et après ouverture à l'air (traits en pointillés) . Le spectre de la protéine CnrXs-H32A avec 1 équivalent de cobalt est montré en comparaison. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$

La même expérience est mise en place avec le mutant CnrXs-E63Q [Figure 7.2.8]. Le spectre de CnrXs-E63Q enregistré sous anaérobiose ressemble à une version émoussée de celui des formes métallées de CnrXs de type sauvage et CnrXs-H32A, confirmant des types de sites identiques pour le site 1 et le site 2 en absence d'oxygène. L'ouverture à l'air après l'ajout de deux équivalents de cobalt entraîne l'apparition de la bande intense centrée à 384 nm.

Ainsi, tandis que CnrXs-E63Q fixe le cobalt uniquement sur le site 2, il semblerait que la protéine CnrXs de type sauvage lie le cobalt dans un premier temps sur le site 1 qui n'est pas sensible à l'oxygène, puis seulement dans un second temps sur le site 2.

Ainsi, nous avons montré que la présence d'oxygène est la cause principale de la modification drastique de l'allure du spectre du site 2. Cette modification pourrait être le résultat de l'oxydation de Co(II) en Co(III) en présence d'oxygène. Afin de prolonger cette étude nous avons utilisé d'autres techniques spectroscopiques plus sensibles pour caractériser les ions cobalt du site 2. Cependant, auparavant afin d'estimer si le site 2 est un site physiologique pertinent nous avons étudié la forme métallée cobalt de NccX, un homologue de CnrX.

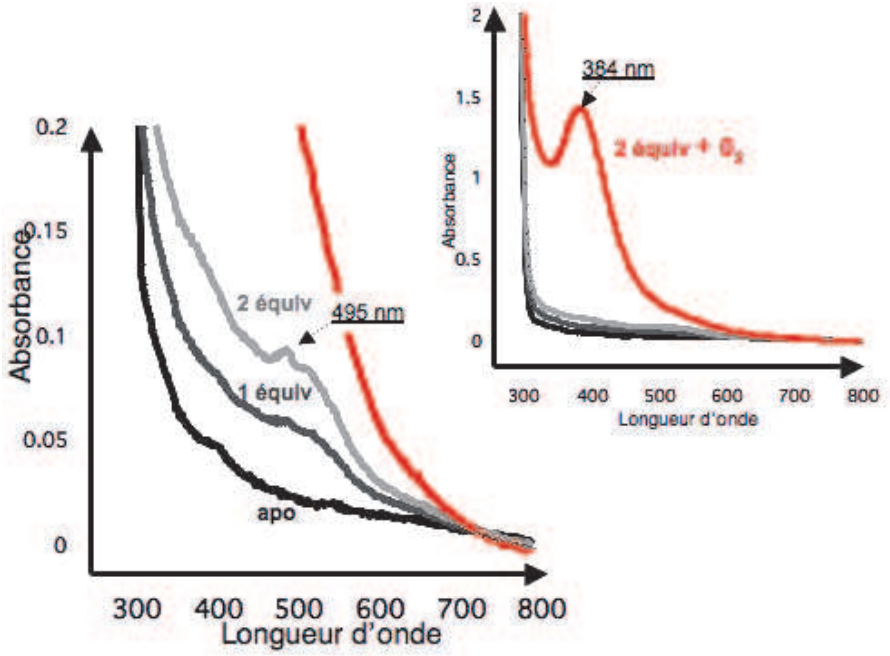


Figure 7.2.8 – Spectres d'absorption UV-visible du titrage de la protéine CnrXs-E63Q à 511μM par le $CoCl_2$ sous anaérobiose. Dans l'insert, le spectre de la forme métallée par 2 équivalents de cobalt de CnrXs-E63Q après ouverture à l'air est représenté. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$

7.2.3 Le site 2 existe-t-il dans la forme entière de la protéine ?

La question suivante concerne l'existence physiologique le site 2. Pour y répondre, nous avons voulu caractériser le mode de liaison du cobalt sur la protéine entière par spectroscopie UV-visible. Ceci afin d'examiner la présence de ce site dans des conditions non biaisées par l'utilisation de CnrXs, un objet modèle plus facile d'emploi. Comme nous l'avons précédemment indiqué, la forme entière CnrX n'est pas purifiée de manière satisfaisante. Nous avons donc utilisé la protéine homologue NccX, dont le protocole de purification a été l'objet d'un long travail de mise au point effectué par Jacques Covès, Eve De Rosny et Isabelle Petit-Haertlein dans notre laboratoire. Les différences de comportement de ces deux protéines homologues envers la méthode de purification s'expliquent sans doute par de plus fortes variations de séquences dans la partie transmembranaire (63% d'identité entre les deux séquences) que dans la partie périplasmique (76% d'identité) où sont notamment conservés les acides aminés identifiés comme ligands du métal dans CnrXs [Figure 7.2.9].

L'ajout de cobalt sur la protéine NccX entraîne l'apparition de bandes d'absorption à 440, 495 et 525 nm [Figure 7.2.10]. L'addition de deux équivalents de cobalt est suffisante pour que le signal atteigne son intensité maximale. Comme pour les formes métallées par le cobalt de CnrXs-H32A et de CnrXs sous anaérobiose, le coefficient d'extinction molaire à 495 nm est de 75 $M^{-1}.cm^{-1}$.

```
                                                  32          42   46
CnrX  : MMKSRTRRLS LSTLFGALLG VSVAAAWLYY/SHRNEAGHGD LHEILHEAVP LDANE 1-55
NccX  : MMKSRTFRLS VSTLVGALVG VLMAIVGVYV/THSTEEPHTS LHEMLHDAVP LDSNE 1-55

                63
CnrX  : REILE LKEDAFAQRR REIETRLRAA NGKLADAIAK NPAWSPEVEA ATQEVERAAG 56-110
NccX  : REILE LKEEEFTARR REIESRLRAA NGKLAESIAK NPQWSPEVEE ATREVERAAA 56-110

                119   123
CnrX  : DLQRATLVHV FEMRAGLKPE HRPAYDRVLI DALRRGSQ 111-148
NccX  : DLQRATLVHV FEMRAGLKPE HRAAYDRVLV DALKRGSQ 111-148
```

Figure 7.2.9 – Comparaison des séquences de CnrX et de NccX. Les résidus surlignés en jaune sont ceux qui ont été supprimés par clonage pour obtenir CnrXs et NccXs. Les résidus en rouge sont les acides aminés qui font partie du site de liaison du cuivre d'après la structure de CnrXs déterminée par Pompidor *et al*, 2008. L'histidine 32, située à l'extrémité amino-terminale de la protéine, est représentée en bleu. Les résidus soulignés sont identiques dans les deux protéines.

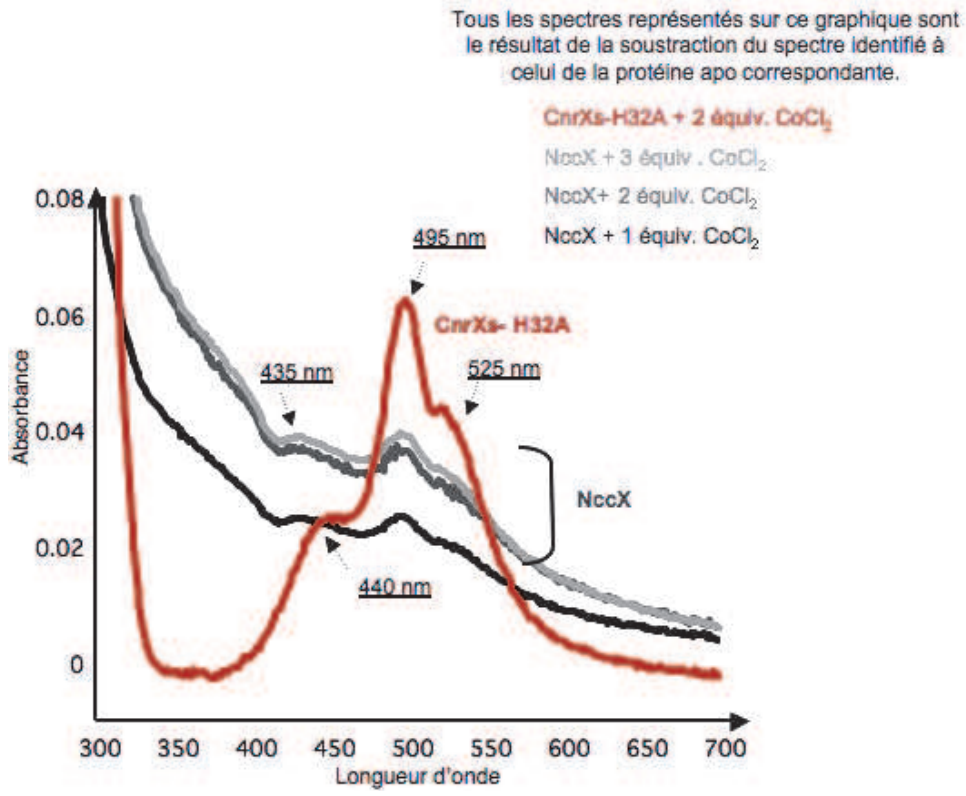


Figure 7.2.10 – Spectres d'absorption UV-visible de NccX à 250μM en présence de concentrations croissantes de cobalt. Le spectre de la protéine CnrXs-H32A avec 2 équivalents de cobalt est montré en comparaison. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$

NccX ne possède donc qu'un seul site de liaison au cobalt par monomère, site qui possède à première vue toutes les caractéristiques du site 1 et que nous appellerons dorénavant le site fonctionnel (site F). La protéine mutante CnrXs-H32A permet donc la caractérisation du site F et semble être un bon modèle spectroscopique de la forme entière de la protéine, ce que l'on sera amené à confirmer par l'utilisation de techniques plus spécifiques.

Cela suggère également que CnrXs possède deux sites de liaison au cobalt supplémentaires (sites S) par rapport à NccX. Le site S n'a donc pas de rôle particulier dans la fonction de la protéine entière puisqu'il en est absent.

Le résidu His32, ligand du site S, est situé sur l'extrémité amino-terminale de CnrXs, tandis qu'il est localisé juste après l'hélice transmembranaire de NccX. Dans la structure de CnrXs déterminée, His32 fait partie de résidus dont la structure n'a pas été résolue, ce qui peut indiquer qu'il occupe des positions relatives différentes dans les protéines au sein cristal et donc que son degré de liberté est grand. Le degré de liberté de His32 dans NccX est certainement moindre car il est maintenu entre l'hélice transmembranaire d'un coté et le domaine périplasmique de l'autre. His32 n'a vraisemblablement pas la même configuration dans les deux protéines. Cette différence peut expliquer la présence du site S dans la protéine tronquée et son absence dans la forme entière.

De manière intéressante la protéine NccXs, construite sur le même modèle que CnrXs présente le même spectre d'absorption centré à 384 nm avec toutefois une intensité un peu plus faible [Figure 7.2.11]. Le site S est donc probablement un artefact lié à la façon dont nous avons construit les domaines senseurs périplasmiques des protéines membranaires CnrX et NccX. Toutefois son signal spectroscopique est intéressant et sa caractérisation détaillée pourra être effectuée par l'étude du mutant CnrXs-E63Q

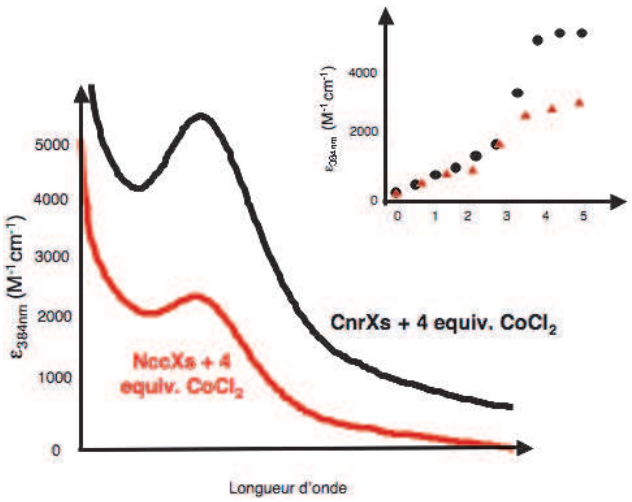


Figure 7.2.11 – Spectres d'absorption UV-visible des protéine CnrXs et NccXs métallées par 4 équivalents de cobalt. L'encart montre l'évolution de ε_{384nm} de CnrXs (points noirs) et de NccXs (triangles rouges) en fonction du nombre d'équivalents de cobalt ajoutés. Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$

7.3 Etude des deux sites de liaison au métal par RPE

Nous avons établi dans la section 7.2.2.2 que l'allure atypique du spectre UV-visible de CnrXs métallée par le cobalt avait pour origine la présence d'oxygène. La première hypothèse serait que cette évolution spectrale à l'air soit provoquée par des modifications oxydatives des acides aminés de la protéine. La masse de CnrXs n'est toutefois pas modifiée après l'ajout des ions métalliques comme nous avons pu le vérifier par spectrométrie de masse

Une autre hypothèse, correspondant plus à ce que nous avions rencontré dans la littérature, serait que la présence de l'oxygène entraîne sur le site S une modification des propriétés physico-chimiques du cobalt, comme par exemple le changement de l'état d'oxydation de Co(II) en Co(III).

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique spectroscopique qui permet, comme son nom l'indique, de caractériser les espèces paramagnétiques en solution (comme le Co(II)). Au contraire, les espèces dont tout les électrons sont appariés (comme le Co(III)) ne présentent pas de spectre RPE. Ainsi, en présence d'oxygène, si un changement structural du complexe du cobalt intervient et que son état d'oxydation évolue, il sera facile de l'observer. Cette étude RPE va également être une importante source d'informations quant aux caractéristiques des sites Co(II) contenus dans CnrXs. En effet, le cobalt (II) est un ion de configuration électronique d^7, qui peut être bas spin ($S = 1/2$) ou haut spin ($S = 3/2$) et donc présenter des signatures RPE distinctes.

7.3.1 Analyse de l'effet de l'oxygène

Dans un premier temps, la protéine CnrXs est titrée par des concentrations croissantes de $CoCl_2$ sous anaérobiose. Ensuite, pour chaque concentration, le tube RPE contenant le mélange est mis au contact de l'air. Les spectres RPE résultant sont présentés dans la figure 7.3.1. Le spectre de $CoCl_2$ à une concentration de 1,94 mM, correspondant à 4 équivalents de cobalt par dimère de CnrXs, est également enregistré comme contrôle.

Tous les spectres obtenus sont caractéristiques d'un ion Co(II) haut spin, toutefois les ions Co(II) liés à la protéine présentent un spectre différent de celui obtenu pour $CoCl_2$ dans l'HEPES. On observe une transition intense centrée vers 1200 Gauss dont l'intensité augmente presque linéairement en fonction du nombre d'équivalents de cobalt ajoutés pour les échantillons préparés en boîte à gant. L'exposition à l'air n'induit pas de modifications du spectre de la protéine CnrXs métallée par 2 équivalents de cobalt. Au contraire, pour 4 équivalents de cobalt, l'ouverture à l'air entraîne une diminution du signal d'un facteur 2 ; ce qui signifie que 2 équivalents de Co(II) sont transformés en espèces diamagnétiques. On peut noter que de façon concomitante un signal apparait à $g = 2$ (signalé par un astérisque sur la figure), qui correspondrait à la présence d'une très faible quantité de Co(II) bas spin dans l'échantillon.

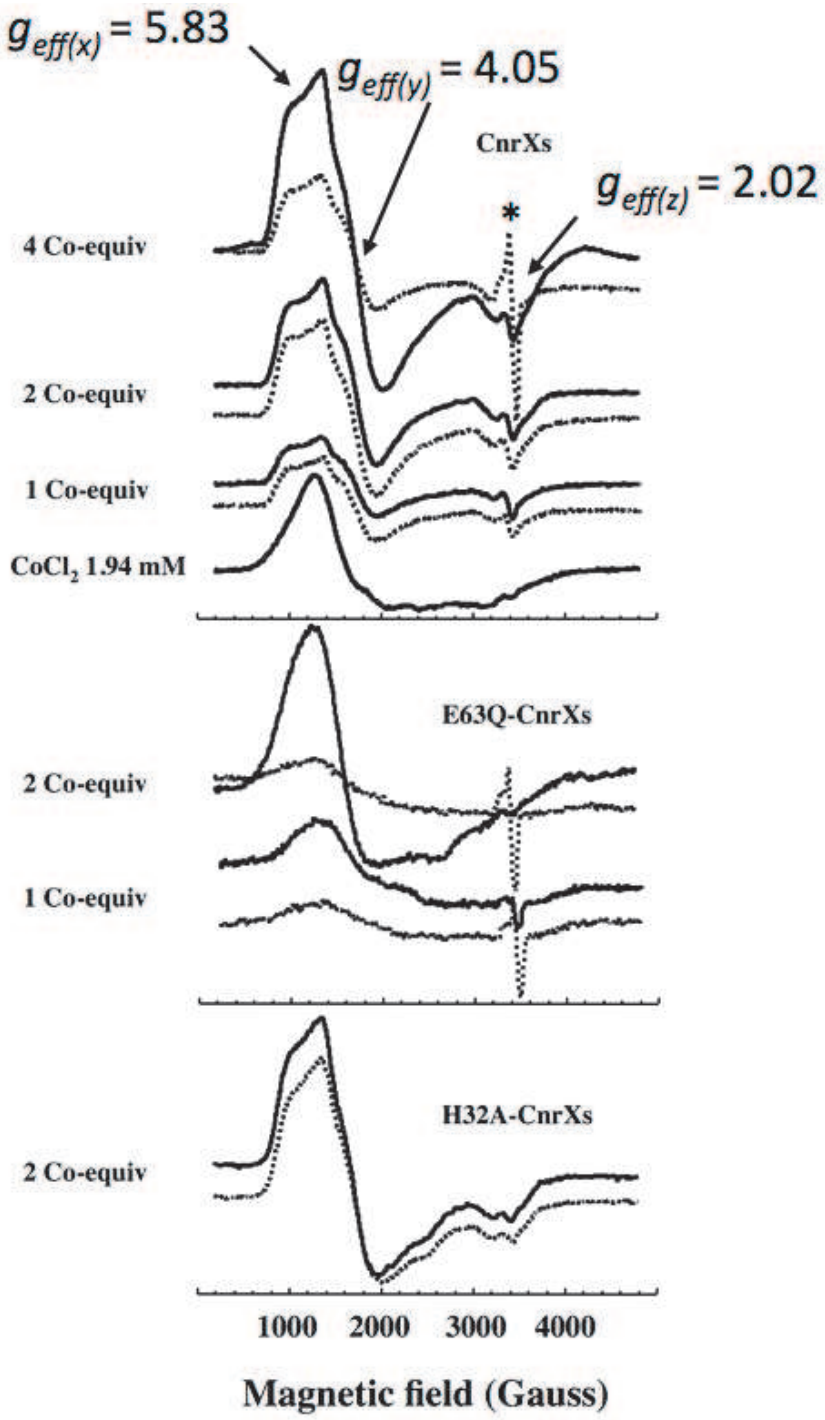


Figure 7.3.1 – Analyse par RPE en bande X de la liaison du cobalt à CnrXs (485μM), CnrXs-E63Q (470μM) et CnrXs-H32A (409μM). Les spectres RPE correspondants aux échantillons préparés sous anaérobiose sont représentés en traits pleins. Les spectres enregistrés après l'ouverture des tubes à l'air sont en pointillés. Le signal marqué d'un astérisque est attribué au Co(II) de bas spin (S = $^1/_2$). Les paramètres RPE $g_{eff(x,y,z)}$ sont également indiqués. Conditions : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$.

Nous faisons ensuite les mêmes expériences avec CnrXs-E63Q et CnrXs-H32A. Le spectre RPE de la forme métallée de la protéine CnrXs-E63Q préparée sous anaérobiose est également caractéristique d'un Co(II) de haut spin, mais son allure diffère de celle de CnrXs de type sauvage. L'ouverture à l'air entraîne la disparition presque totale de ce signal, avec de manière concomitante, l'apparition du signal caractéristique du Co(II) de bas spin. A l'opposé, le spectre de CnrXs-H32A avec 2 équivalents de cobalt est similaire à celui enregistré pour CnrXs de type sauvage sous anaérobiose, et son intensité est insensible à la présence d'oxygène.

L'analyse RPE étaye les données UV-visible en confirmant la présence de deux types de sites métalliques qui fixent tous les deux du Co(II) haut spin sous anaérobiose. Les ions cobalt présents dans le site F ne sont pas sensibles à l'oxygène, alors que ceux du site S vont évoluer à l'air vers une espèce silencieuse en RPE.

7.3.2 Détermination des caractéristiques structurales des sites F et S par RPE

7.3.2.1 Spectres du cobalt

De nombreux sites métalliques de protéines ont été caractérisés par RPE de leur forme métallée au cobalt (Maret et Vallee, 1993; Fielding *et al.*, 2011; Breece *et al.*, 2005). Toutefois, la plupart des spectres publiés sont difficiles à interpréter car l'écart en champ nul (D) pour un ion Co(II) haut spin est souvent beaucoup plus grand (>30 cm^{-1}) que l'énergie fournie par le spectromètre (hv = 9 Ghz soit 0,3 cm^{-1}). De ce fait les spectres RPE en bande X sont insensibles à la grandeur de D et les seuls paramètres RPE utiles qui peuvent être extraits de ces spectres sont les valeurs de $g_{réel}$ et de E/D (Bennett, 2002).

Concernant le spectre RPE du site F, c'est à dire celui de CnrXs-H32A métallée par deux ions cobalt, les trois transitions sont localisés à $g_{eff(x,y,z)}$ = 5,83, 4,05 et 2,02. Dans la raie à bas champ, on peut observer le profil non résolu d'un couplage hyperfin issue de l'interaction entre le spin électronique du Co(II) avec son noyau (spin nucléaire du ^{59}Co $I = 7/2$). La simulation des données expérimentales fournit les paramètres suivants *:* $g_{réel(x,y)}$ = 2,42 $g_{réel(z)}$ = 2,11 et E/D = 0,125. Ces paramètres sont proches de ceux obtenus avec d'autres protéines contenant du cobalt et sont indicatifs d'un cobalt coordiné par cinq ou six ligands. De plus, l'observation d'un couplage l'hyperfin dans la raie à bas champ est en accord avec un environnement octaédrique pour le cobalt dans le site F (Werth *et al.*, 1995). La valeur E/D de 0,125 cadre avec une géométrie distordue autour du centre cobalt. De plus, la déviation notable de $g_{réel}$ par rapport à g_e montre un fort couplage spin-orbite comme cela est attendu pour un Co(II) haut spin de faible symétrie. En accord avec les données de la spectroscopie UV-visible, le site F semble donc contenir un ion cobalt coordiné par 6 ligands.

Le spectre RPE de CnrXs-E63Q enregistré en absence d'oxygène a une allure correspondant à un Co(II) haut spin. Il est caractérisé par une raie à bas champ ne présentant ni rhombicité, ni structures hyperfines liées au ^{59}Co. De plus, la valeur de g_{eff} pour la transition à plus haut champ n'est pas mesurable. Il n'est donc pas possible d'obtenir des simulations fiables de ce spectre, indiquant que le site S, en condition d'anaérobie, contient un centre Co(II) dans une géométrie très peu contrainte. Ce type de géométrie est typique d'un ion coordiné par 5 ou 6 ligands, avec au moins une molécule d'eau.

7.3.2.2 Spectres du cuivre

Si le cobalt est un métal de choix pour analyser l'environnement métallique par la spectroscopie UV-visible, le cuivre est plus adapté en RPE. En effet, le Cu(II) est un ion d^9, de spin $S = 1/2$ et présente donc des spectres facilement analysables qui sont sensibles à l'environnement métallique. De plus, les complexes mononucléaires de Cu ayant été largement étudiés, de nombreuses corrélations magnéto-structurales ont été identifiées. Les ions Ni(II) bas spin et Zn(II), quant à eux, sont des espèces diamagnétiques, et donc silencieuses en RPE. L'ion Cu(II) présente généralement des spectres RPE axiaux (c'est-à-dire que $g_x = g_y = g_\perp$), pour lesquels un couplage hyperfin (A) issu de l'interaction du spin électronique du cuivre avec son noyau (^{63}Cu $I = 3/2$) est observé dans la transition à bas champ ($g_{//}$).

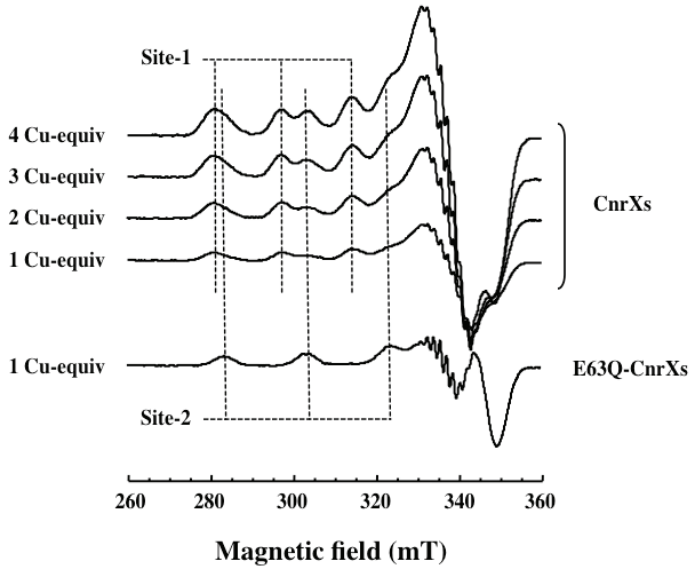


Figure 7.3.2 – Analyse par RPE en bande X de la liaison du cuivre à CnrXs (485μM), CnrXs-E63Q (470μM). Les caractéristiques du cuivre lié au site 1 (site F) et au site 2 (Site S) sont représentés en pointillés. Conditions : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$.

Les titrages des protéines CnrXs et CnrXs-E63Q par le $CuCl_2$ sont suivis par RPE [Figure 7.3.2]. Le profil complexe des spectres de CnrXs indique un mélange de deux sites de fixation du Cu(II). Les deux sites peuvent être facilement distingués l'un de l'autre par l'examen des

interactions hyperfines situées à bas champ. En effet, on observe qu'elles ne sont pas espacées de manière régulières, comme attendu pour un seul centre Cu(II).

La forme métallée par le cuivre de CnrXs-E63Q a un spectre caractéristique d'un seul site Cu(II) caractérisé par les paramètres suivants : $g_{//}$= 2,194, $g_{\perp}$ = 2,028 et $A_{//}$ = 625 MHz [Figure7.3.3]. Des interactions superhyperfines provenant de l'interaction du spin électronique du Cu(II) avec les noyaux d'atomes d'azote (^{14}N *I =1)* sont aussi observées dans la composante $g_{\perp}$ et ont un profil très compliqué avec plus de 9 résonances. En conséquence, nous pouvons déduire qu'au moins 3 atomes d'azote sont impliqués dans la coordination du Cu(II) dans le site S.

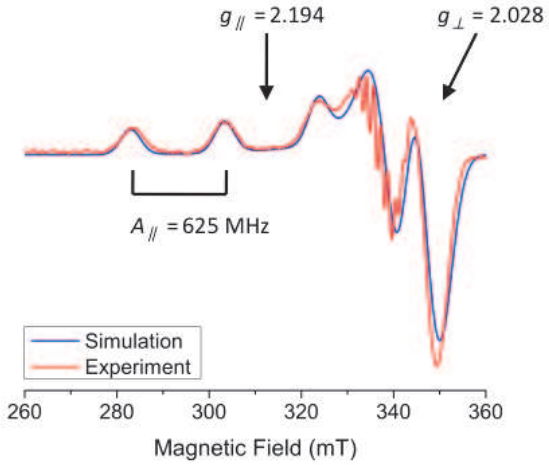


Figure 7.3.3 – Spectres RPE en bande X expérimental (en bleu) et simulé (en rouge) du cuivre lié au site S. Les paramètres utilisés pour la simulation sont indiqués sur la figure.

La soustraction du signal du site S sur le signal CnrXs lié à 4 ions cuivre donne un spectre caractérisé par un signal axial avec les paramètres suivants : $g_{//}$= 2,267, $g_{\perp}$ = 2,054 et $A_{//}$ = 525 MHz [Figure 7.3.4]. Ces paramètres sont identiques à ceux précédemment reportés par Pompidor *et al*, correspondant à un Cu(II) de type 2 et donc en adéquation avec un site cuivre coordiné par trois histidines et un glutamate dans le plan équatorial (Pompidor *et al.*, 2008).

Nous voyons également dans ces spectres que le ratio de l'intensité des signaux des sites F et S varie selon le nombre d'équivalents de cuivre ajoutés sur la protéine. Cela est particulièrement frappant pour les transitions localisées à 297 mT (site F) et 303 mT (site S). Lors de l'ajout des 2 premiers équivalents, le ratio de l'intensité des signaux est de 60/40 (site F/ site S) indiquant que les ions cuivre ont une meilleure affnité pour le site F.

Le cuivre et le cobalt se coordinent donc à deux sites métalliques distincts. D'abord, entre 1 et 2 équivalents de métal, le site F est rempli en majorité, ensuite entre 3 et 4 équivalents, les ions se fixent dans le site S. Les données de RPE sont concordantes avec les résultats obtenus par la spectroscopie UV-visible et les paramètres structuraux, puisque d'après ces techniques, selon l'ion utilisé pour la métallation, le site F comprend un centre Co(II) coordiné par 6 ligands

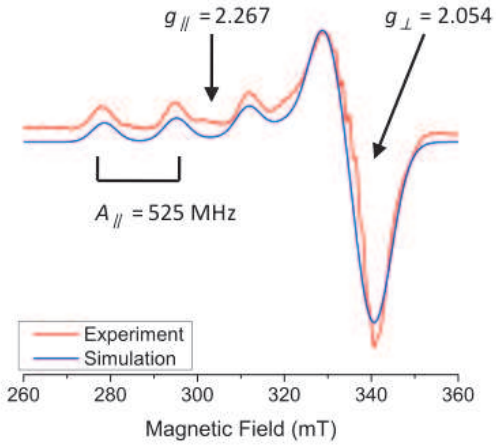


Figure 7.3.4 – Spectres RPE en bande X expérimental (en bleu) et simulé (en rouge) du cuivre lié au site F. Le spectre expérimental a été obtenu par la soustraction du spectre de la forme métallée CnrXs-E63Q et du spectre de la forme métallée CnrXs de type sauvage. Les paramètres utilisés pour la simulation sont indiqués sur la figure.

ou un ions Cu(II) de type 2. D'autre part, si on considère que le site S est similaire pour les deux ions, la RPE nous apporte des informations supplémentaires sur la structure du site (sous anaérobiose, Co(II) avec 5 ou 6 ligands, dont au moins trois azotés et une molécule d'eau).

Afin de décrire avec plus de détails les deux sites métalliques et de comparer le site F avec le site de la protéine entière nous avons étudié les formes métallées par le cobalt de la protéine CnrXs de type sauvage et celles des différents mutants et nous les avons comparées à NccX par la spectroscopie d'absorption X.

7.4 Etude des deux sites de liaison au cobalt par spectroscopie d'absorption X

La spectroscopie aux rayons X (SAX) est une technique souvent utilisée pour détailler l'environnement d'ions métalliques au sein d'une protéine dans un échantillon en solution et propice pour caractériser les espèces silencieuses en RPE comme le Co(III) par exemple. Cette expérience, menée sur différents échantillons métallés avec du cobalt à l'air (CnrXs, CnrXs-E63Q, CnrXs-H32A, NccX), nous permet d'une part, de comparer précisément la structure du site F de CnrXs à celle du site de NccX et, d'autre part, d'étudier plus en détail le site S pour lequel nous n'avons pas d'information structurale.

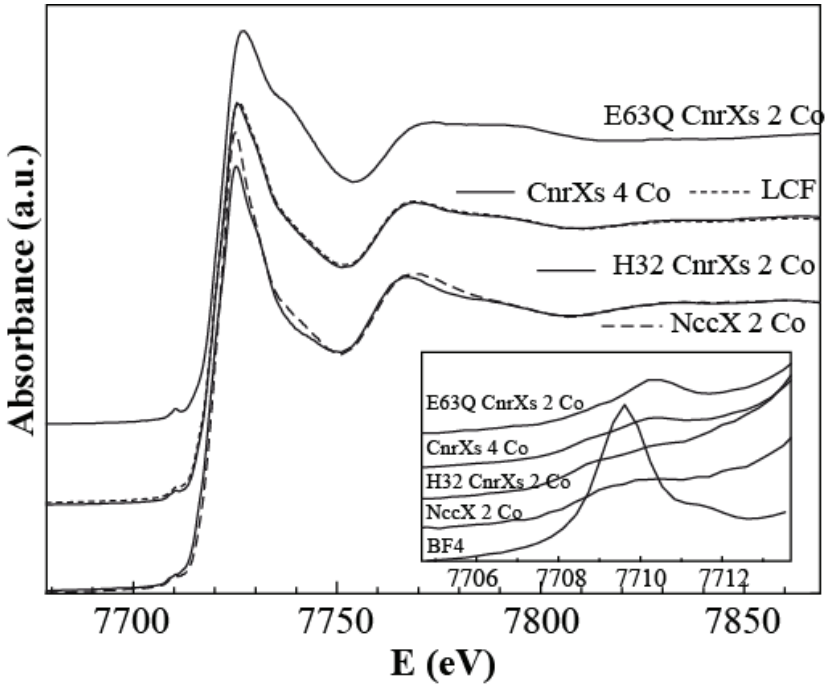


Figure 7.4.1 – Spectres XANES au seuil K du cobalt pour les protéines CnrXs-E63Q, CnrXs-H32A et NccX métallées par 2 ions cobalt et pour CnrXs métallée par 4 cobalt. La ligne en pointillée superposée au spectre de CnrXs est la simulation obtenue par la combinaison linéaire de 62% de CnrXs-H32A liée à 2 cobalt + 36% de CnrXs-E63Q liée à 2 cobalt. Dans l'insert, aggrandissement des caractéristiques du pré-seuil et comparaison avec le Co(2-methylimidazole)$_4$(BF$_4$)$_2$.

7.4.1 Coordination et état d'oxydation du cobalt dans les sites F et S par l'étude du XANES

Le XANES donne des informations sur la coordination de l'ion métallique dans la protéine. Le XANES du cobalt présente généralement un pic au niveau du pré-seuil vers 7710 eV attribué à un mélange de transitions *1s-3d* et *1s-4p*, dont l'intensité diminue lorsque le degré de symétrie du polyèdre ou le degré d'occupation de l'orbitale *3d* augmente (Juhin *et al.*, 2010). Le pré-pic est plus intense pour un ion cobalt en coordination tétraédrique (comme le Co(II)BF4 utilisé en référence) que pour une coordination octaédrique. Tous les spectres des échantillons protéiques ont un pré pic entre 7709 et 7711 eV de faible intensité, ce qui suggère une coordination octaédrique dans le site F et dans le site S [Figure 7.4.1].

Les spectres de CnrXs-H32A et NccX métallées par 2 équivalents de cobalt (courbes verte et rouge) ont un seuil à la même position que celui de l'acétate de cobalt (II) tétrahydrate (courbe marron). Cette observation est en accord avec la présence d'ions cobalt divalents dans ces échantillons [Figure 7.4.2].

Au contraire, le spectre de CnrXs-E63Q métallée par 2 équivalents de cobalt (courbe mauve) a un seuil est plus proche de celui du Co(III) ethylène diamine (courbe orange), suggérant la présence de Co(III) dans cet échantillon

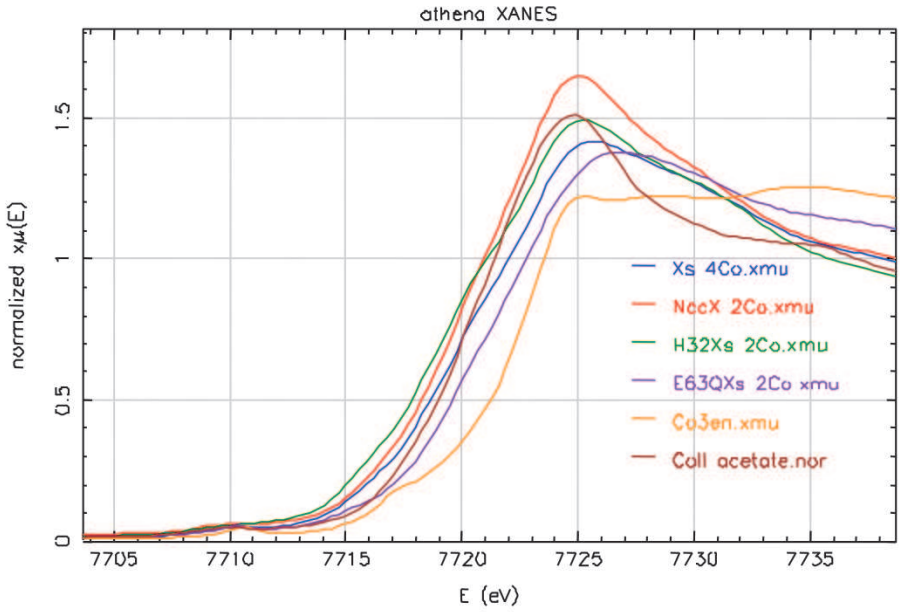


Figure 7.4.2 – Agrandissement du spectre XANES précédent au niveau du seuil d'absorption

7.4.2 Caractérisation du site F par l'analyse des spectres EXAFS

	Atome	Nombre d'atomes	Distance entre les atomes(Å)	σ² (Å²)	Facteur R
CnrXs-H32A + 2 Co	His	3.0±0.2	2,11±0.04	0,004	$1,6.10^{-2}$
	O	2.0±0. 2	2,13±0.07	0,009	
	S	0.9±0. 1	2,57±0.02	0,005	
NccX +2 Co	His	3.0±0.2	2,09±0.04	0,005	$2,1.10^{-2}$
	O	2.0±0. 2	2,13±0.04	0,003	
	S	1.1±0. 1	2,57±0.02	0,010	
CnrXs-E63Q +2Co	His(**Co(III)**)	0.5±0.2	1.93±0.003	0,003	$5,0.10^{-3}$
	N/O(**Co(III)**)	2.0±0.2	1.93±0.003	0,003	
	His (**Co(II)**)	2.0±0.1	2.13±0.005	0,003	

Tableau 7.1 – Environnement structural du cobalt dans CnrXs-H32A, CnrXs-E63Q et NccX obtenu après l'analyse des données EXAFS. N : Nombre d'atomes, R : distance inter-atomique, σ^2 : facteur Debye Waller, facteur R : résiduel entre la simulation et l'expérience.

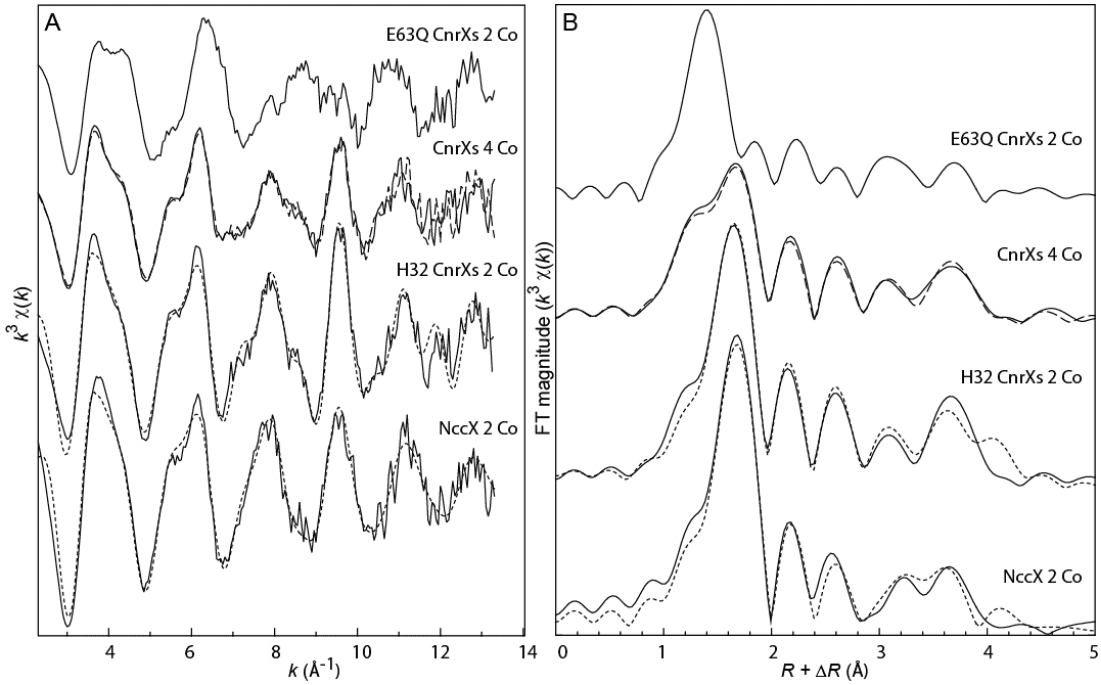


Figure 7.4.3 – Spectres EXAFS au seuil K du cobalt (A) et le module de la transformée de Fourier (B) des protéines CnrXs-E63Q, CnrXs-H32A et NccX métallées par 2 ions cobalt et de CnrXs métallée par 4 ions cobalt. Les lignes en pointillées représentent les simulations des couches multiples et la ligne discontinue (superposée à CnrXs) la simulation obtenue par la combinaison linéaire de 56% de CnrXs-H32A liée à 2 cobalt + 32% de CnrXs-E63Q liée à 2 cobalt.

Les spectres EXAFS des protéines CnrXs-H32A et NccX métallées par 2 ions cobalt et leurs simulations sont montrées sur la figure 7.4.3. Les paramètres structuraux dérivés de ces spectres sont donnés dans le tableau 7.1.

Dans CnrXs-H32A, le métal est lié à trois histidines situées à 2,11Å, à deux atomes d'oxygène à 2,13Å et un atome de soufre à 2,57Å. La nature des atomes ligands ainsi que leurs nombres concordent presque parfaitement avec la structure précédemment publiée [Tableau 7.2], à savoir la liaison par le cobalt et le cuivre de 3 azotes, 1 oxygène et d'1 soufre. Le deuxième oxygène du glutamate semble être un ligand du cobalt mais pas du cuivre (distance $>$ 3Å). Le cobalt et le cuivre se fixent sur le site F par l'intermédiaire des mêmes ligands ; toutefois les distances métal-ligand ne sont pas équivalentes, indiquant que la nature de l'ion métallique influe sur sa position dans le site comme cela avait été montré pour la protéine RcnR [voir introduction, section 3.1.2 page 44].

La nature des atomes liés au cobalt, leur nombre et la distance métal-ligand sont identiques pour CnrXs-H32A et NccX. Le site F est donc totalement identique dans la protéine CnrXs-H32A et NccX. CnrXs-H32A est en conséquence un modèle spectroscopique parfait de NccX.

Cuivre	Distance entre le métal et les ligands (Å)	Moyenne (Å)
$N^{\varepsilon 2}$ His42	2,20	2,3
$N^{\varepsilon 2}$ His46	2,29	
$N^{\varepsilon 2}$ His119	2,37	
O1 Glu63	1,90	2,5
O2 Glu63	3,10	
S^{δ} Met123	2,77	2,77

Tableau 7.2 – Environnement structural du cuivre dans le site F (Pompidor *et al.*, 2008)

7.4.3 Caractéristiques du site S par l'étude du XANES et de l'EXAFS

La forme métallée de CnrXs-E63Q présente d'importantes différences dans les spectres XANES [voir section 7.4.1 page 128] et EXAFS ainsi que dans les transformées de Fourier.

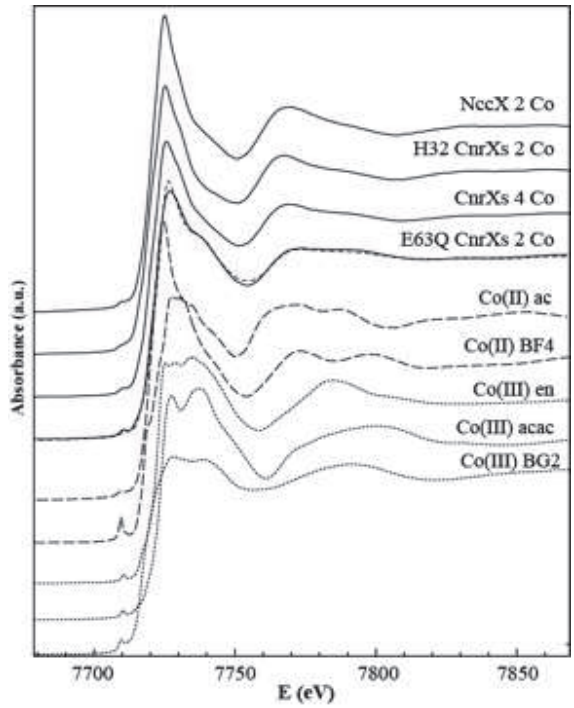


Figure 7.4.4 – Comparaison des spectres XANES au seuil K du cobalt de nos échantillons avec des références (traits discontinus pour les références Co(II) et traits en pointillés pour les références Co(III). La coordination du cobalt est tétraédrique pour le composé Co(II)BF4 et octaédrique pour les autres. Le spectre de la protéine CnrXs-E63Q métallée par 2 ions cobalt est simulé par une combinaison linéaire de 59% de CnrXs-H32A métallée par 2 ions cobalt + 89% de Co(III) acétylacétonate (Co(III)acac) (ligne en pointillés).

La partie XANES peut être simulée par une combinaison de 59% de CnrXs-H32A métallée par 2 ions cobalt (ou NccX métallée par 2 ions cobalt) + 39% de la référence Co(III) acétylacétonate (Co(III)acac où le cobalt (III) est coordiné par 6 atomes d'oxygène) [Figure 7.4.4]. Ces résultats suggèrent la présence dans le site S d'un mélange de cobalt divalent et de cobalt trivalent.

Le spectre EXAFS a une fréquence et une amplitude plus faibles que celle des spectres caractéristiques du site F [Figure 7.4.3]. Aucune simulation valable n'a pu être obtenue en faisant l'hypothèse que le site ne contenait que du Co(II) ou que du Co(III). Toutefois, le spectre peut être simulé par un modèle décrivant la liaison d'un centre Co(II) avec deux résidus histidine, et d'un Co(III) avec 2 ligands (N ou O) ainsi que 0,5 histidine. N'oublions pas que le signal EXAFS donne une information moyenne sur les ions cobalt contenus dans l'échantillon ; ainsi si par exemple on avait 50% de Co(II) lié à 4 His et 50% de Co(III) lié à 6 O, la première couche de coordination pourrait être simulée avec 2N (0,5x4) et 3O (0,5x6). On peut interpréter les résultats de la simulation du spectre de CnrXs-E63Q par deux configurations différentes : 40% de Co(II) lié à 5 ligands (nombre de ligands moyen = 0,4 x 5 = 2,0) et 60% de Co(III) lié à 4 ligands (N = 2,4), ou 50% de Co(II) lié à 4 ligands (N =2) et 50% de Co(III) lié à 5 ligands (N=2,5). Cependant, dans notre cas la précision sur N n'est pas optimale du fait d'interférences destructives des contributions du Co(II) et du Co(III) [voir figure 7.4.5].

Nous pouvons donc en déduire que le site S contient un mélange de Co(II) et de Co(III) dont certains des ligands sont des histidines. Faute d'informations plus précises, il est impossible d'établir les proportions de Co(II) et de Co(III), ni de déterminer le nombre de coordinations du site S.

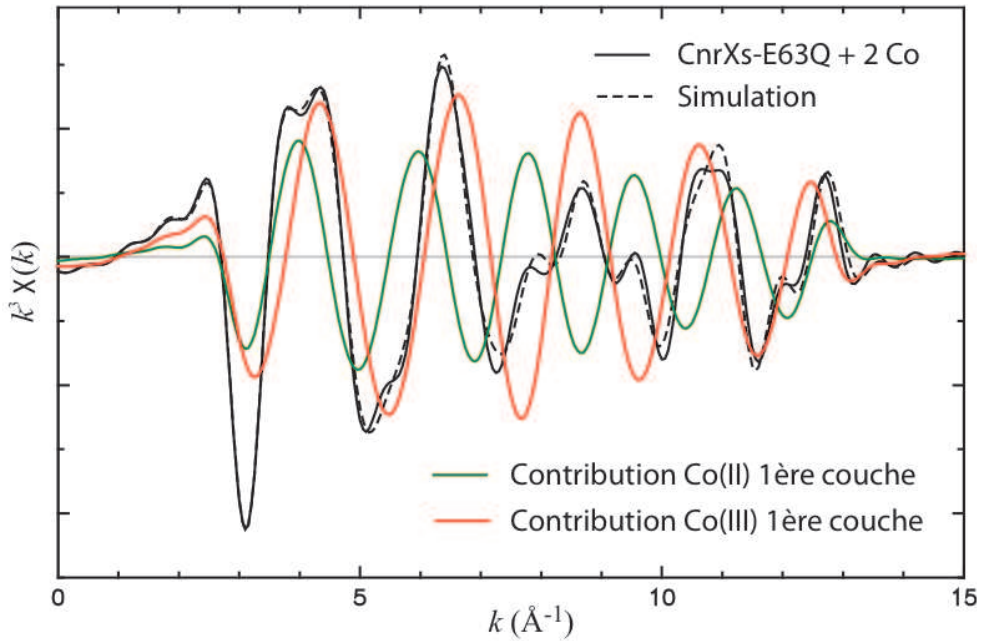


Figure 7.4.5 – Simulation du spectre EXAFS de CnrXs-E63Q métallée par deux équivalents de cobalt et visualisation des contributions Co(II) et Co(III) pour la première couche. Ces dernières sont en opposition de phase de 7 à 11 A^{-1}, le spectre résultant a donc une amplitude très faible (interférence destructive) .

7.4.4 Caractéristiques des sites de liaison au cobalt de la protéine CnrXs

Les spectres XANES et EXAFS de la protéine CnrXs liée à 4 ions cobalt sont des intermédiaires entre CnrXs-H32A et CnrXs-E63Q métallées par 2 ions cobalt. Le XANES et l'EXAFS peuvent être simulés par une combinaison linéaire de 60% de CnrXs-H32A et 40% de CnrXs-E63Q. Si on impose une distribution de 50%-50%, la simulation est fortement altérée. Donc l'environnement du cobalt de la protéine CnrXs métallée par 4 ions est légèrement différent de la simple addition de ceux trouvés pour CnrXs-H32A et CnrXs-E63Q. La présence de cobalt libre dans les échantillons pourrait expliquer ces différences.

7.5 Mesure de l'affinité du cobalt pour les sites F et S par ITC

Grâce aux techniques de spectroscopies utilisées nous savons maintenant que CnrXs possède deux sites métalliques distincts dont la nature d'une partie des résidus ligands à été déterminée par l'utilisation de la SAX. Mais cette étude ne saurait être complète sans évaluer l'affinité du cobalt pour ces sites. La microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC) constitue un outil de choix pour la détermination des paramètres thermodynamiques de nombreuses interactions biologiques comme les interactions protéine-métal. Elle permet de mesurer directement la chaleur associée à la formation d'un complexe et d'en déduire une constante d'affinité. [voir matériel et méthode, section 5.3 page 84]

Les thermogrammes du titrage de CnrXs et des mutants par des ions cobalts ainsi que les données intégrées sont représentés dans la figure 7.5.1. Dans les trois cas, ces données sont simulées par des paramètres issus d'un modèle de protéine à deux sites de liaison au métal.

Chaque monomère de CnrXs contient deux sites de liaison avec des affinités et des stoechiométries différentes : un site de très haute affinité (Kd = 1,5 nM) et d'une stœchiométrie d'à peu près 1 cobalt par monomère et, un site de forte affinité (Kd = 113 nM) avec une stoechiométrie d'un cobalt par dimère [Tableau 7.3]. L'analyse des contributions thermodynamiques montre que les deux sites de liaison au métal sont dirigés par l'enthalpie avec un effet limité de l'entropie sur la liaison. Dans les systèmes biologiques, les réactions conduites par l'enthalpie sont typiquement associées avec la formation de liaisons hydrogènes et d'interactions électrostatiques.

Le changement du résidu Glu63 en Gln entraîne une très forte baisse de l'affinité du site F (Kd = 3300 nM), tandis que l'affinité pour le site S augmente d'un ordre de grandeur (Kd = 11 nM). La liaison du cobalt sur le site F dans ces conditions est fortement perturbée, CnrXs-E63Q est donc un bon modèle du site S.

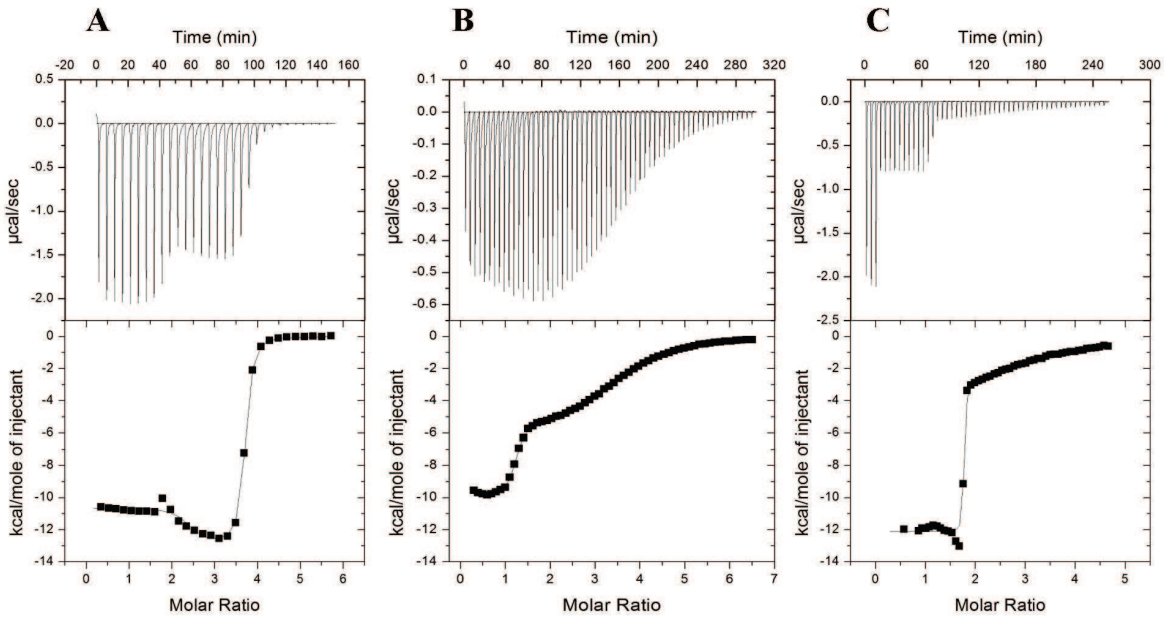


Figure 7.5.1 – Titrage de CnrXs, de CnrXs-E63Q et de CnrXs-H32A par le $CoCl_2$ suivi par ITC. Le panneau du haut montre les thermogrammes expérimentaux et le panneau du bas, la chaleur dégagée en fonction du ratio cobalt/protéine correspondant au titrage montré dans les panneaux du haut. Le tracé en trait plein représente la meilleure simulation pour un modèle de protéine à deux sites de liaison. A, CnrXs (25μM) dans 50 mM de tampon HEPES (pH 8) avec 30 injections de 10μL de $CoCl_2$ (625 μM) dissout dans de l'eau. B, CnrXs-E63Q (22μM) avec 60 injections de 5 μL de $CoCl_2$ (625 μM). C, CnrXs-H32A (20μM) avec 3 injections de 20μL suivies de 48 injections de 5 μL de $CoCl_2$ (408 μM).

	Site F				SiteS			
	n	Kd (nM)	ΔG(kcal/mol)	ΔH(kcal/mol)	n	Kd (nM)	ΔG(kcal/mol)	ΔH(kcal/mol)
CnrXs	2,5	2,5	-12,0	-10,6	1,2	113	-9,5	-13,3
CnrXs-E63Q	3,4	3300	-7,5	-7,0	1,2	11	10,9	-11,4
CnrXs-H32A[a]	1,7	1,5[b]	-12,0	-12,1	1,2[b]	19000	-6,4	-6,0

Tableau 7.3 – Paramètres ITC déduits de deux titrages indépendants. [a]Une seule titration utilisée. [b] Paramètres fixés pendant la processus de simulation.

Le titrage de CnrXs-H32A par l'ITC montre une combinaison entre un site de très haute affinité (Kd = 1,5 nM) et un site de très basse affinité (Kd = 19000 nM). Toutefois, l'appareil utilisé ne permettant pas de mesurer des affinités plus fortes que 1,5 nM, le coefficient de dissociation du complexe Co :CnrXs-H32A pour le site F peut être inférieur à cette valeur. Ces données confirment que CnrXs-H32A est un modèle parfait pour l'étude de NccX/CnrX qui ne possède que le site F.

7.6 Mesure de l'affinité du zinc pour la protéine

Le thermogramme du titrage de CnrXs-H32A par les ions zinc ainsi que les données intégrées sont représentés dans la figure 7.6.1. Le mutant CnrXs-H32A a été utilisé dans cette expérience car le site S n'a qu'une très faible affinité pour le métal dans cette protéine. Les données sont simulées par des paramètres issus d'un modèle de protéine à deux sites de liaison au métal.

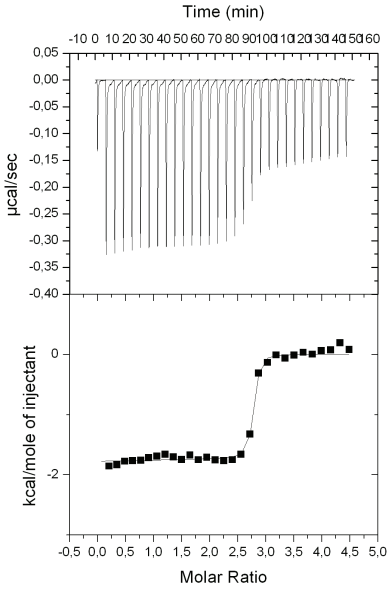


Figure 7.6.1 – Titrage de CnrXs-H32A par de l'acétate de zinc suivi par ITC. Le panneau du haut montre le thermogramme expérimental et le panneau du bas, la chaleur dégagée en fonction du ratio zinc/protéine correspondant au titrage montré dans le panneau du haut. Le tracé en trait plein représente la meilleure simulation pour un modèle de protéine à deux sites de liaison. CnrXs-H32A (20μM) avec 1 injection de 5μL suivies de 29 injections de 10 μL d'acétate de zinc (400 μM).

Ce titrage montre une combinaison entre un site d'assez haute affinité (Kd = 20 nM / n = 2,7) et un site de très basse affinité (Kd = 700 μM / n = 1,2). Le zinc comme le cobalt se fixe à deux sites sur la protéine. Dans le mutant CnrXs-H32A la fixation sur le deuxième site est également très altérée.

Bien que le zinc ne soit pas un métal inducteur, il peut donc tout de même interagir avec CnrXs, mais avec une affinité plus faible que le cobalt (20 nM contre 1,5 nM pour le cobalt. Des résultats complémentaires sur la fixation du zinc dans la protéine seront apportés dans le chapitre 8 sur l'étude structurale des formes métallées de CnrXs.

7.7 Mesure relative de l'affinité du zinc, du nickel et du cuivre pour CnrXs

7.7.1 Compétition entre les ions nickel, cobalt et zinc suivie par spectroscopie UV-visible

Pour évaluer l'affinité des autres ions pour le site F nous avons réalisé des expériences de compétitions entre les différents ions suivies par UV-visible. Nous avons utilisé CnrXs-H32A qui modélise parfaitement le site F [voir section 7.5], afin de ne pas être gênés par le signal intense du cobalt dans le site S.

L'ajout de cobalt sur CnrXs-H32A entraîne l'apparition d'un spectre décrit dans la section 7.2.2 page 113 [Figure 7.7.1.A]. La spectre de la liaison du nickel à la protéine CnrXs-H32A est identique à celui de la protéine de type sauvage avec l'apparition de bandes à 363 nm et 581 nm [voir section 7.2.1 page 111] [Figure 7.7.1.B].

La figure 7.7.1.A montre que lorsque l'on ajoute du nickel sur la CnrXs métallée par du cobalt, le spectre n'est pas modifié, il ne déplace donc pas le cobalt de CnrXs. Réciproquement, du cobalt ajouté sur la forme métallée nickel, ne déplace pas le nickel. Quand on ajoute un mélange stoechiométrique des deux ions sur la protéine, on obtient un mélange d'espèces, des protéines métallées par du nickel et d'autres métallées par du cobalt. Cela montre que les deux métaux, d'une part, se fixent sur un même site pour lequel ils sont en compétition et que, d'autre part, ils ont une affinité comparable pour ce site.

Le zinc n'a pas de signal spectroscopique, on ne peut pas visualiser directement sa liaison à la protéine. Toutefois, par une expérience de compétition, nous avons étudié et évalué son affinité par rapport à celle du nickel et du cobalt. Lorsqu'on ajoute du nickel ou du cobalt sur une solution contenant la protéine CnrXs-H32A métallée par du zinc, les spectres font apparaître les bandes d'absorption spécifiques du nickel ou du cobalt. Ces ions se fixent donc sur le site F. Au contraire, les figures D et E montrent que le zinc ne déplace pas les deux autres métaux puisque leurs spectres ne sont pas modifiés après l'ajout de zinc. En conclusion, soit le zinc ne se fixe pas sur le même site que le cobalt et le nickel, soit ces métaux ont une plus forte affinité pour le site F que le zinc, résultat qui est étayé par la valeur du Kd du zinc pour son site de fixation. Nous verrons plus loin que l'analyse des structures des formes métallées de CnrXs appuie cette seconde hypothèse.

7.7.2 Compétition entre le cuivre et le cobalt suivie par RPE

La compétition entre le cuivre et le cobalt est suivie par RPE. Deux séries d'expériences du même type que les précédentes ont été réalisées [Figure 7.7.3]. Lorsque l'on ajoute 2 équivalents de cuivre sur la forme de CnrXs métallée par du cobalt, le cuivre se fixe sur le site S. Les deux

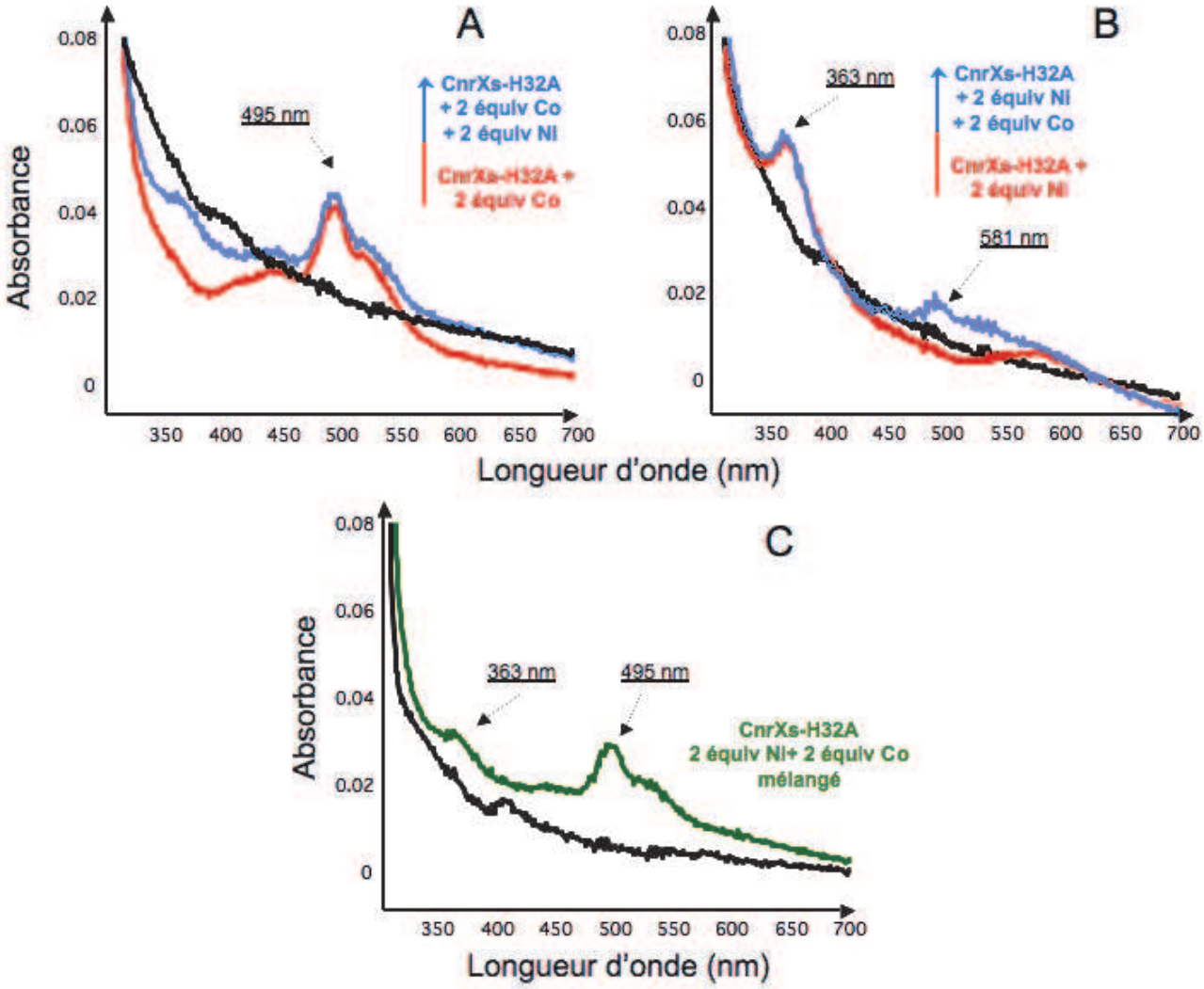


Figure 7.7.1 – Expériences de compétitions entre le nickel et le cobalt suivies par spectroscopie UV-visible. Le spectre rouge est enregistré après l'addition du premier ion métallique, et le bleu après addition du second ion. La concentration de CnrXs-H32A est de 150 μM dans la figure A et B et de 200 μM dans la figure C . Figure A : addition de 2 équivalents de cobalt puis de 2 équivalents de nickel. Figure B : addition de 2 équivalents de nickel puis de 2 équivalents de cobalt. Figure C addition d'un mélange stoechiométrique de 2 équivalents de nickel et de 2 équivalents de cobalt.

premiers équivalents de cobalt se coordinent donc préférentiellement au site F et ne sont pas déplacés par le cuivre. Inversement, l'addition de deux équivalents de cobalt sur la forme de la protéine métallée par du cuivre engendre l'apparition du spectre de Co(II) haut spin correspondant au site F. Ainsi l'ajout de Co(II) a permis de compléter les sites F vacants (40% [voir section 7.3.2.2. La quantité résiduelle de cobalt n'est pas observable par RPE car après sa fixation sur le site S, elle a été convertie en espèce silencieuse en RPE dans les conditions aéobies de l'expérience.

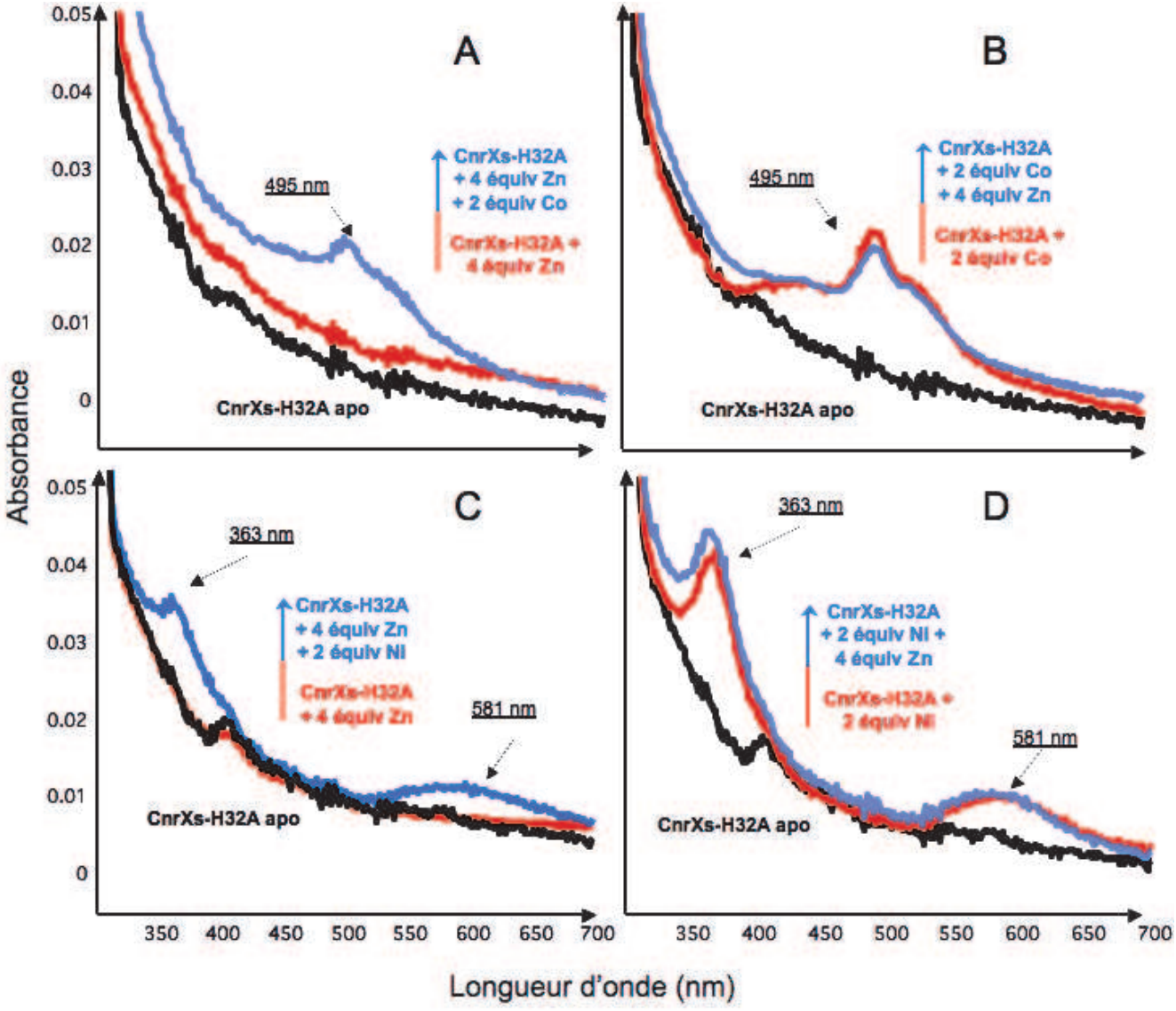


Figure 7.7.2 – Expériences de compétitions entre le nickel, le cobalt et le zinc suivies par spectroscopie UV-visible. Le spectre rouge est enregistré après l'addition du premier ion métallique, et le bleu après addition du second ion. La concentration de CnrXs-H32A est de 200 μM dans la figure A et B et de 150 μM dans la figure C et D. Figure A : addition de 2 équivalents de zinc puis de 2 équivalents de cobalt. Figure B : addition de 2 équivalents de cobalt puis de 2 équivalents de zinc.Figure C : addition de 2 équivalents de zinc puis de 2équivalents de nickel. Figure D : addition de 2 équivalents de nickel puis de 2 équivalents de zinc.

Cette étude met donc en évidence que les affinités du Cu(II) et du Co(II) sont comparables pour le site F.

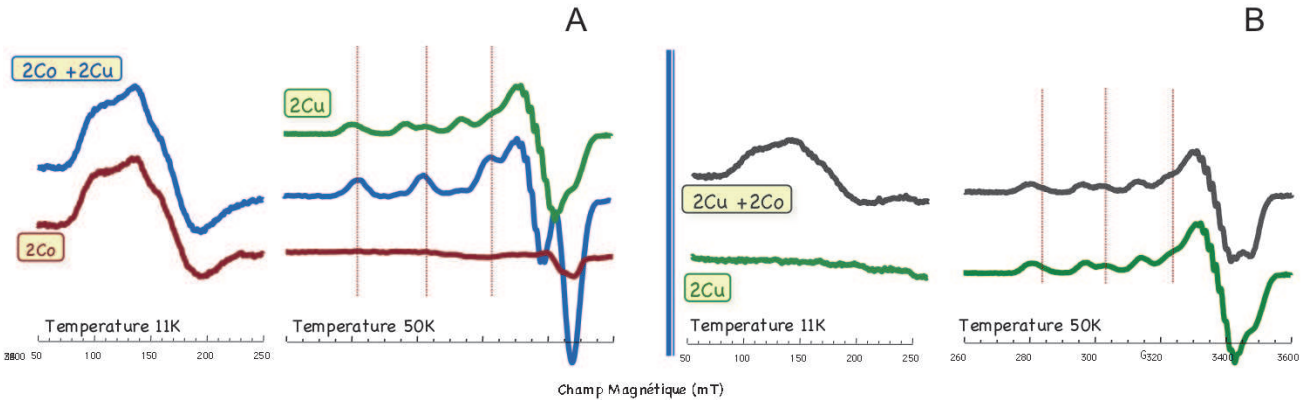


Figure 7.7.3 – Expériences de compétitions entre le cobalt et le cuivre suivies par RPE. La protéine CnrXs (225 μM) est d'abord métallée par 2 équivalents de cobalt (Figure A) ou de cuivre (Figure B). Après l'enregistrement d'un premier spectre RPE, on ajoute 2 équivalents du second métal. Les caractéristiques spécifiques à la liaison du Cu(II) au site S sont indiquées par des lignes verticales rouges. Pour plus de clarté, l'échelle de résonance à bas champs (50-250 mT) a été agrandie et le spectre de CnrXs lié à deux ions cuivre a été ajouté dans la figure A.

7.8 Le site S est impliqué dans la stabilisation du dimère de CnrXs

Nous avions remarqué que, lorsque nous chargions sur gel SDS les échantillons provenant des titrages de CnrXs par le $CoCl_2$, des bandes entre 25 et 30 kDa étaient observables. Sachant que CnrXs a une masse molaire de 13266 Da, ces bandes pourraient correspondre à la migration de dimères de protéine, insensibles à la dénaturation.

Afin de comprendre l'origine de ce phénomène, nous avons réalisé l'expérience suivante : CnrXs, CnrXs-E63Q et CnrXs-H32A ot été mises en présence de quantités croissantes d'ions cobalt et incubées toute la nuit. Les échantillons, sans être chauffés, ont ensuite été analysés par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide. Les résultats sont montrés sur la figure 7.8.1-A. Toutes les formes apo des protéines sont dénaturées et seul le monomère est visible sur le gel. En revanche, en présence de 1 ou 2 équivalents de cobalt, une petite quantité de CnrXs dimérique est résistante à la dénaturation. La proportion de la forme dimèrique par rapport à la forme monomérique augmente et atteint un plateau à partir de 3 équivalents de cobalt par dimère. Pour CnrXs-E63Q, le plus fort ratio forme dimerique/forme monomérique est obtenu dès 2 équivalents de cobalt et, il n'augmente pas quand on ajoute du cobalt. Inversement, la protéine CnrXs-H32A en conditions dénaturantes, reste toujours sous forme monomérique à chaque étape du titrage.

Lorsque les protéines CnrXs et CnrXs-E63Q sont métallées par respectivement 4 et 2 équivalents de cobalt en condition d'anaérobie et analysées sur gel (puits a et b), aucune bande de la taille de la forme dimérique de CnrXs n'est observable. Toutefois, lorsque ces mêmes échantillons

sont ouverts et incubés à l'air avant d'être analysés, une certaine quantité de la forme dimérique non dénaturée est mise en évidence.

Les mêmes expériences de métallation sous condition aérobies ont été réalisées sur CnrXs en présence de cuivre, de nickel et de zinc [Figure 7.8.2]. Nous pouvons voir sur la figure qu'aucun de ces ions ne permet de stabiliser la forme dimérique de CnrXs.

La fixation du cobalt sur le site S en présence d'oxygène est donc impliquée dans la stabilisation du dimère de CnrXs. Ce phénomène pourrait être expliqué par la formation d'un complexe binucléaire de cobalt à l'air qui ponterait les 2 monomères. Cette hypothèse sera plus amplement discutée dans le chapitre suivant.

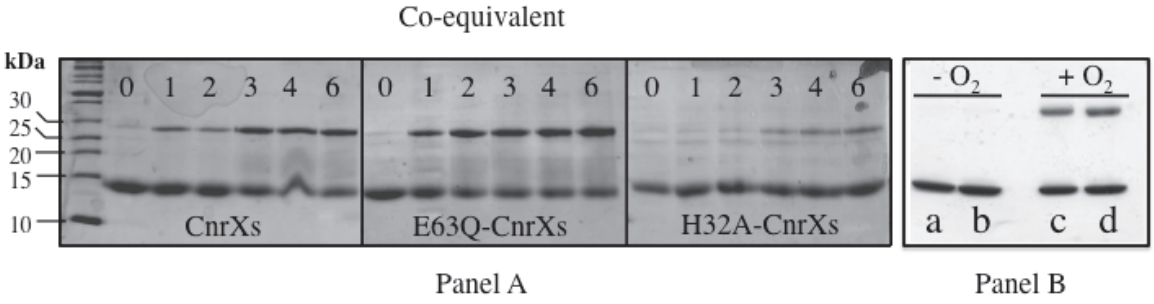


Figure 7.8.1 – Analyse par SDS PAGE du titrage de CnrXs, CnrXs-E63Q et CnrXs-H32A. Panneau A : la protéine est incubée avec les quantités indiquées de $CoCl_2$ sur la nuit à 4°C et chargée sur un gel de 15% d'acrylamide. Panneau B : la forme de CnrXs *métallée* par 4 équivalents de cobalt ainsi que le mutant CnrXs-E63Q métallé par 2 équivalents de cobalt sont préparés en boîte à gants sous anaérobiose et, analysés après une incubation sur la nuit en présence ou en absence d'oxygène. Puits a et c : CnrXs métallée par 4 équivalents de cobalt, puits b et d : CnrXs-E63Q métallée par 2 équivalents de cobalt.

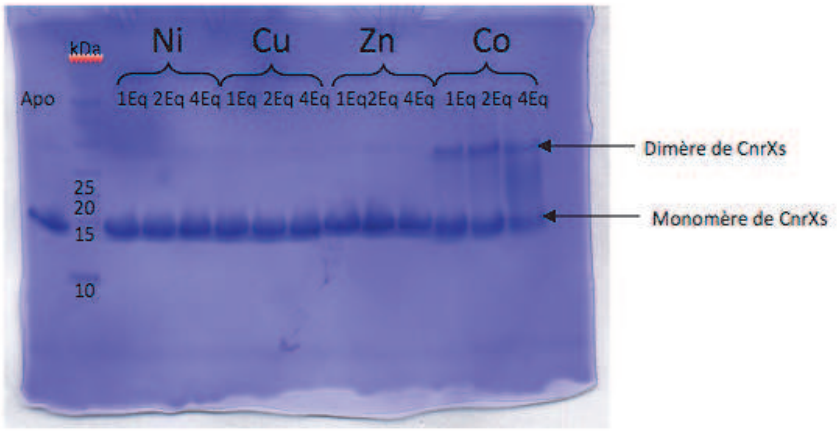


Figure 7.8.2 – Analyse par SDS PAGE du titrage de CnrXs par du nickel, du cuivre, du zinc et du cobalt. La protéine est incubée avec les quantités indiquées de $NiCl_2$, de $CuCl_2$, d'acétate de zinc et de $CoCl_2$, sur la nuit à 4°C et chargée sur un gel de 15% d'acrylamide.

7.9 Discussion

CnrXs est le domaine senseur périplasmique de la protéine membranaire CnrX, qui en complexe avec CnrYH, contribue à la régulation de gènes impliqués dans la résistance au cobalt et au nickel chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Cette résistance est induite par la libération du facteur σ_{ECF} CnrH par CnrYX et ce, uniquement lorsque la bactérie évolue dans un environnement riche en nickel ou en cobalt. Toutes les études *in vivo* publiées auparavant ont montré que l'induction de l'opéron *cnr* était favorisée en présence de nickel par rapport au cobalt et au cuivre, tandis qu'elle est négligeable en présence de zinc (Grass *et al.*, 2000, 2005; Tibazarwa *et al.*, 2000; Monchy *et al.*, 2007; Grosse *et al.*, 2007). L'immunodétection de CnrX chez *C. metallidurans* CH34 soumis à un stress métallique confirme que le nickel, le cobalt et même le cuivre sont capables d'induire une réponse biologique tandis que le zinc n'a pas cette capacité. Il est probable que cette différence trouve son origine dès le déclenchement du signal ; à savoir la détection sélective du cation par CnrXs, menant ou non à la libération de CnrH.

Le but de cette première phase du travail a été d'examiner la manière dont CnrX détecte les métaux, pour mieux comprendre à terme la sélectivité de la protéine. Pour cela nous avons (i) produit une forme tronquée de la protéine, à partir de Ser31, ne contenant que le domaine de détection des métaux CnrXs et, (ii) étudié le ou les sites de liaison aux métaux par différentes méthodes de spectroscopie.

Les titrages de CnrXs par le nickel et le cuivre suivis par UV-visible sont peu informatifs et ne permettent pas de conclure sur le nombre de sites présents dans la protéine, ni de décrire ce ou ces sites. Lorsque l'on ajoute du cobalt sur une solution de CnrXs en présence d'oxygène, celle-ci devient marron. Le spectre UV-visible enregistré est dominé par une bande centrée à 384 nm (ε_{384nm}= 500/1000 $M^{-1}.cm^{-1}$) dont l'intensité sature pour 4 équivalents de cobalt ajoutés par dimère de protéine. Nous avons montré par des expériences de mutagenèse que le dimère de CnrXs contient deux types de sites de liaison au cobalt. Dans chaque monomère, il y a un site fonctionnel, ou site F, à l'origine d'un spectre est similaire à celui de la protéine membranaire NccX (A_{max} = 495 nm, ε_{495nm} = 75 $M^{-1}.cm^{-1}$) et un site supplémentaire ou site S dont le spectre est atypique et intense (A_{max} = 384 nm, ε_{384nm} = 1000 $M^{-1}.cm^{-1}$).

Le cobalt dans le site F est lié à 6 ligands dont Glu63 et His42 que l'on a identifiés par mutagenèse. Ces deux résidus, strictement conservés parmi les 22 homologues de CnrX, sont aussi impliqués dans la liaison du cuivre (Pompidor *et al.*, 2008) [voir introduction, section 4.2.2.3]. His42 et His46 jouent un rôle dans la fonction de la protéine selon Grass *et al.* (2005) [voir introduction section 4.2.2.2]. En effet, les auteurs ont montré (i) que *in vivo* le nickel ne pouvait plus induire la transcription de *cnr* lorsque CnrX possédait la double mutation His42Arg-His46Arg et, (ii) que *in vitro* CnrX', forme soluble de la protéine dans leur étude, mutée n'était plus capable de lier le nickel. Le résidu His42 est donc indispensable à la régulation de la résistance

au nickel et au cobalt car il fait partie du site de liaison de ces deux métaux et intervient dans la phase de détection de l'ion métallique.

La liaison du cobalt au site F a été analysée par l'étude du mutant CnrXs-H32A. Les spectres UV-visible de CnrXs-H32A, de NccX et de CnrXs métallée par 2 ions Co(II) sous anaérobiose sont identiques. C'est le premier argument indiquant que les ions cobalt ont la même sphère de coordination dans les trois protéines et dans ces conditions de titrage. La caractérisation XAS des sites métalliques confirme que NccX coordine un Co(II) dans un site de liaison au métal identique à celui de CnrXs-H32A, en terme de ligands et des distances du ligand au cation. Le dimère de NccX ne fixe que 2 équivalents de cobalt contrairement à CnrXs et à NccXs qui en lie 4. Le site F est probablement le seul site de liaison au métal présent dans la protéine entière. CnrXs-H32A est donc le meilleur modèle spectroscopique de NccX, et probablement de CnrX étant donné les fortes similarités de séquences entre les deux protéines qui incluent la conservation stricte de tous les résidus ligands du métal présents dans la protéine.

Nous avons pu montrer que le cobalt dans le site S se lie à His32. Le résidu His32 fait partie de la séquence aminoterminale de la protéine 31-SHRNEAGHG-39. Cette séquence n'apparait pas dans la structure de la protéine CnrXs, toutefois avec deux histidines et un glutamate elle pourrait participer à la formation d'un site métallique en solution. Nos expériences ont montré que ce site est absent de la protéine entière NccX et qu'il n'a donc pas de fonction particulière. Cette conclusion est en accord avec l'étude de mutants de CnrXs menée par Grass *et al.* (2005) et mentionnée dans l'introduction. Les auteurs ont montré que la double mutation His32Arg/His38Arg ne modifiait pas l'induction du système par le nickel et qu'avec ces mutations la protéine CnrX' était toujours capable de se lier au métal. Le site S a toutefois un signal spectroscopique atypique que nous avons caractérisé plus avant grâce à l'étude du mutant CnrXs-E63Q dans lequel le site F est altéré.

D'après les données obtenues en UV-visible et en RPE, en condition d'anaérobiose, le site S contient un ion Co(II) haut spin dans une géométrie penta ou octaédrique qui coordine au moins une molécule d'eau. En présence d'air, le Co(II) est majoritairement changé en espèce silencieuse en RPE, tandis qu'une minorité est modifiée en Co(II) bas spin. Les données EXAFS confirment que le cobalt présent dans le site S est dans une coordination octaédrique et suggère de plus que ce site soit occupé par un mélange de Co(II) et de Co(III). Toutefois, à cause des interférences destructives des contributions du Co(II) et du Co(III), il est difficile de conclure sur la proportion de chaque espèce (Co(II) ou Co(III)) et sur le nombre exact de coordinations du cobalt. D'autres données complémentaires provenant des analyses RPE de CnrXs-E63Q métallée par le cuivre indiquent la présence de 4 ligands, dont au moins 3 azotes, sur le plan équatorial en accord avec la géométrie octaédrique précédemment identifiée. De plus, comme l'indiquent les expériences d'electrophorèse en condition dénaturante douce, le dimère de CnrXs-E63Q est

stabilisé en présence de cobalt. Ce phénomène pourrait avoir comme origine soit, un pont formé par les ions cobalt du site S entre les deux monomères soit, la coordination de deux ions par des résidus des deux protomères.

L'oxydation de complexes d'amines de cobalt en présence d'oxygène est connue depuis près d'un siècle et demi (Frémy, 1852) [Figure 7.9.1]. Ces molécules sont formées par des complexes octaédriques de cobalt haut spin et, ont en solution une couleur rose pale dans une atmosphère sans oxygène. Lorsque ces solutions sont mises en présence d'oxygène, elles prennent une coloration brune. Le spectre d'absorption UV-visible de ces complexes montre une ou deux bandes de transfert de charge entre 300 et 400 nm avec un coefficient d'extinction molaire plus grand que 1000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Il a été mis en évidence que cette modification considérable de spectre avait pour origine la formation d'un complexe binucléaire de μ-peroxo-cobalt diamagnétique, entrainant de ce fait la dimérisation de la molécule (Michailidis et Martin, 1969). Toutefois le degré d'oxydation du cobalt dans cette espèce n'a jamais pu être clairement prouvé ; il pourrait s'agir de complexe binucléaire de Co(III) ou de Co(II) Co(III) (Schaefer, 1968; Wilkins, 1971). Ces complexes ne sont que transitoires car la réaction est suivie par la formation d'un complexe mononucléaire de Co(III). La façon dont le cobalt est capable de capturer l'oxygène n'est toujours pas comprise. Cependant certaines précisions sur les complexes susceptibles de former ces espèces à l'air sont connues. Ainsi il est indispensable que trois atomes d'azote minimum soient coordinés au cobalt avant la réaction pour former ces complexes oxygénés (Michailidis et Martin, 1969). De plus, il a été montré qu'une molécule d'eau coordinée au cobalt était plus facilement remplaçable par 0_2 qu'un -NH_2 (Miller *et al.*, 1969).

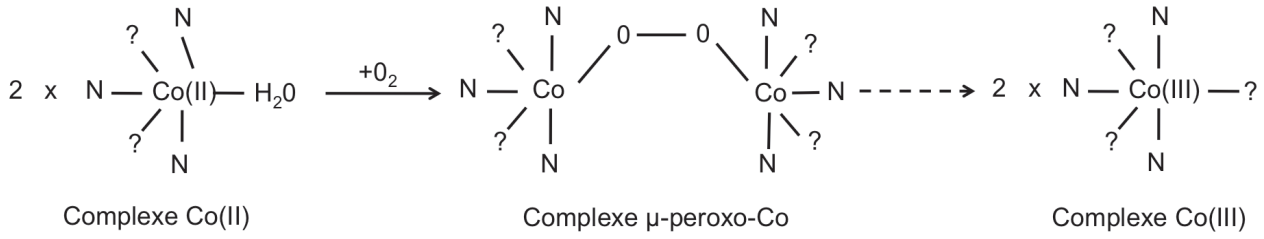


Figure 7.9.1 – Schéma de la réaction de formation des complexes binucléaires de cobalt et mononucléaire de Co(III) en présence d'oxygène.

Les similarités avec les caractéristiques du cobalt présent dans le site S sont frappantes : en effet

(i) si on fait l'hypothèse que le cuivre et le cobalt sont coordinés par des ligands identiques dans le site S, le cobalt(II) sous anaérobiose est donc coordiné par 5 ou 6 ligands dont au moins 3 atomes d'azotes et une molécule d'eau,

(ii) en présence d'oxygène une forte bande d'absorption est observé à 384 nm,

(iii) l'espèce formée en présence d'oxygène est silencieuse en RPE,

(iv) le dimère de la protéine est stabilisé par l'ajout de cobalt à l'air et non pas sous anaérobiose,

(v) les données EXAFS indiquent qu'un mélange de Co(II) et Co(III) est présent dans le site S.

Ainsi nous avons émis l'hypothèse que le cobalt du site S coordine sous anaérobiose au minimum His32, His38 et l'azote aminoterminal [1] et qu'à l'air il forme des complexes binucléaires de μ-peroxo-cobalt et/ou des complexes mononucléaires de Co(III) expliquant la bande d'absorption atypique dans le spectre UV-visible, la présence de Co(II)/Co(III) dans CnrXs et la dimérisation de la protéine en présence de cobalt uniquement [Figure 7.9.2].

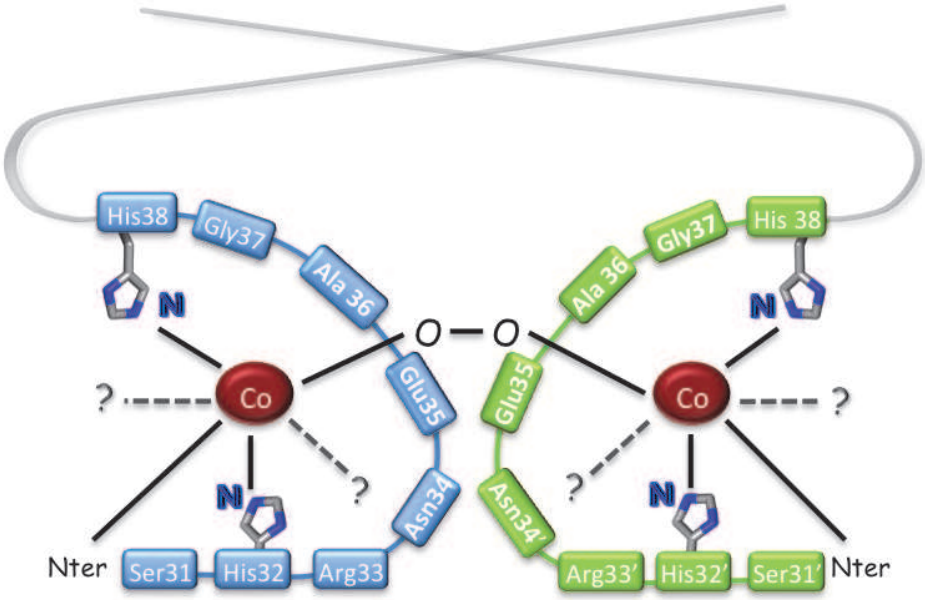


Figure 7.9.2 – Schéma du complexe binucléaire de cobalt dans le site S de CnrXs. Cette représentation est en grande partie spéculative.

On peut noter que lorsque l'on ajoute 2 équivalents de cobalt sur la protéine de type sauvage en absence d'oxygène, seul le site F est peuplé et les ions cobalt sont stabilisés en Co(II). Lorsqu'on réalise la même expérience à l'air, pour une raison inconnue une partie des ions cobalt est acceptée par le site S et forme des espèces oxygénées, entraînant l'apparition de la bande à 384 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 500 $M^{-1}.cm^{-1}$. Cette bande est si intense qu'elle masque la liaison du cobalt sur le site F caractérisée par une absorbance centrée à 495 nm et un ε_{495nm} autour de 75 $M^{-1}.cm^{-1}$. Une fois le site F occupé, le cobalt accède au site S et montre une forte absorbance à 384 nm (ε_{384nm} autour de 3000 $M^{-1}.cm^{-1}$). Ces deux étapes dans la fixation du cobalt expliquent ainsi la titration biphasique de CnrXs par le $CoCl_2$ en présence d'oxygène.

1. Nous n'avons pas réussi à ce jour à cloner le mutant CnrXs-H38A et nous n'avons pas non plus de preuves de l'implication de l'azote aminoterminal.

Nous avons complété ces résultats sur les propriétés électroniques du cobalt et sur la description des sites métalliques par l'évaluation de l'affinité du métal pour les sites. Les expériences d'ITC, en accord avec les données spectroscopiques détectent deux types de sites de liaison au cobalt ; pour chaque dimère les sites F coordinent deux ions cobalt tandis que les sites S n'en fixent qu'entre 1 et 1,4. Cette valeur nous semble sous-estimée car elle ne correspond pas aux précédents résultats obtenus qui indiquaient la présence de deux ions cobalt dans le site S. Cette différence peut être expliquée si on considère, par exemple, que l'enthalpie de liaison du quatrième ion cobalt est beaucoup plus faible que celle de la liaison des 3 autres entraînant une sous-estimation de la valeur de n.

L'affinité pour le site F n'est pas changée lorsqu'on mute le site S et celle du site S est légèrement modifiée (un ordre de grandeur supérieur) lorsqu'on modifie le site F. Inversement l'affinité du site F et du site S est très affectée (diminution de trois à cinq ordres de grandeur) par les mutations respectives E63Q et de H32A. Toutefois les affinités résiduelles restent significatives (3,3 μM pour le site F et 19 μM pour le site S) et devraient toujours permettre l'observation des signaux spectroscopiques des sites mutés. Il est possible donc que ces affinités soient sur-estimées du fait de la complexité de l'évènement de liaison du métal à la protéine (Wilcox, 2008). Cela est particulièrement vrai pour la thermodynamique de la liaison du cobalt dans le site S qui est compliquée puisqu'elle inclut 3 évènements : (i) la liaison du Co(II), (ii) la suite de réactions conduisant au complexe oxygéné du cobalt et, (iii) un léger changement de conformation mis en évidence par l'apparition du Co(II) bas spin détecté par RPE.

En combinant des techniques de biologie moléculaire, de biochimie et de spectroscopie, nous avons donc identifié et caractérisé les deux types de sites de liaison au cobalt de la protéine, dont seulement un a une réalité physiologique. Si on compare ces résultats avec les expériences *in vivo* et avec la structure de CnrXs précédemment publiée, ces sites accueillent vraisemblablement le nickel et le cuivre. En ce qui concerne le zinc, nous ne pouvons que le postuler pour le moment. En effet, si nous avons pu montrer qu'il se interagissait avec CnrXs par les expériences d'ITC, nous n'avons pas pu caractériser son site de liaison en raison de son silence dans les techniques spectroscopiques utilisées. Ainsi, si nous avons pu répondre à la question concernant la façon dont CnrX détecte le métal, nous ne savons toujours pas quel(s) est (sont) l'(les) élément(s) guidant la sélectivité de la protéine. Par nos expériences de compétitions en UV-visible et en RPE, il semble que des différences d'affinités soit impliquées dans la préférence de la protéine pour les métaux inducteurs, puisque *in vitro* le zinc est chassé du site par le cobalt et le nickel. Toutefois ces derniers ont, avec le cuivre, une affinité apparente identique alors que leurs pouvoirs inducteurs sont très différents. Afin de continuer notre étude sur la sélectivité de la protéine et la prolonger en essayant de caractériser la nature du signal envoyé par CnrX aux autres protéines du

complexe, nous allons à présent présenter les résultats de l'étude structurale des formes métallées de CnrXs.

Chapitre 8

Etude structurale de CnrXs

Afin d'analyser la sélectivité de CnrXs envers différents métaux, nous avons dans un premier temps caractérisé le métal et ses sites de liaison. Ainsi les études spectroscopiques et biochimiques sur la protéine CnrXs métallée par le cobalt ont mis en évidence l'existence de deux sites de liaison au métal, dont un seul est présent dans la protéine entière NccX. De plus si nous avons pu démontrer que ce site est similaire à celui identifié dans la structure métallée par le cuivre, nous ne pouvons pour l'instant qu'en faire l'hypothèse pour le nickel et le zinc. Nous avons également évalué de manière quantitative (pour le cobalt et le zinc) et qualitative (pour les autres métaux) l'affinité de ces sites pour les différents ions métalliques. Si ces résultats apportent beaucoup d'informations sur le métal en lui-même tel que son degré d'oxydation, son état de spin, ou sa géométrie de coordination, les paramètres structuraux déduits des analyses spectroscopiques ne sont que partiels et reflètent uniquement la structure du site métallique. La question de la sélectivité de CnrXs pour le métal n'est donc toujours pas entièrement résolue, ni celle de la nature du signal initié par la liaison du métal sur CnrXs.

Les systèmes de type ECF, comme cela a été détaillé dans l'introduction [voir introduction, section 3.3]], transmettent les informations détectées à la surface vers l'intérieur de la cellule par des cascades de protéolyse ou par des changements de conformation qui, au final, se concluent par la libération du facteur σ_{ECF} et sa fixation sur l'ARN polymérase.

L'hypothèse que la métallation puisse induire des changements de conformation sur CnrXs a été dans un premier temps repoussée. En effet, les analyses structurales attestaient d'une très forte conservation de la position de la chaine carbonée principale entre la forme métallée par le cuivre de la protéine et la forme apo (Pompidor *et al.*, 2008). Nous avons donc cherché à savoir si la métallation de CnrX pouvait être le point de départ d'une cascade protéolytique, d'autant que le motif HEXXH présent dans sa séquence est la signature des zincines, un type de protéase à zinc. Cette appellation fait référence à l'ion zinc catalytique coordiné par les deux résidus histidine du motif signature. Ce type de protéases est impliqué dans différents mécanismes de régulation. Elles sont ainsi connues pour leur capacité à protéolyser le domaine intra-membranaire des facteurs anti-σ permettant ainsi la libération des facteurs σ (Gomis-Rüth, 2003; Heinrich et

Wiegert, 2009) [voir introduction, section 4.2.2.1 page 68]. Nous avons utilisé plusieurs méthodes (détection de petits peptides protéolysés par fluorescence ou par chromatographie), mais aucune activité protéasique n'a pu être démontrée sur la forme soluble de la protéine seule ou en présence de métaux. Cela n'est toutefois pas surprenant, si on considère que ce motif HEXXH présent chez CnrX n'est pas conservé chez ses homologues [voir introduction, section 4.2.2.1 page 68].

Nous avons donc réalisé une étude structurale sur différentes formes métallées de CnrXs en collaboration avec Eric Girard et Richard Kahn du groupe ELMA de l'IBS. CnrXs est une protéine qui cristallise dans des conditions simples, reproductibles et dans un délai court. Mon travail a consisté à produire, à purifier les protéines et à mettre au point les conditions de cristallisation. J'ai participé aux expériences de diffraction qui ont eu lieu la plupart du temps sur la ligne de lumière FIP-BM30a de l'ESRF et l'analyse a fait l'objet d'un travail collectif.

8.1 La protéine apo

La production d'une protéine sous forme apo (sans métal) est essentielle pour mener une étude sur l'impact des métallations. Cette protéine doit également contenir une sélénométhionine afin de pouvoir déterminer les phases expérimentales grâce au signal anomal du sélénium et construire ainsi un modèle de la structure. La protéine sélénométhionylée CnrXs (Se-CnrXs) purifiée et cristallisée avant mon arrivée contenait des traces de cuivre que l'on a pu observer par un expérience de RPE [Figure 8.1.1] (Pompidor *et al.*, 2008).

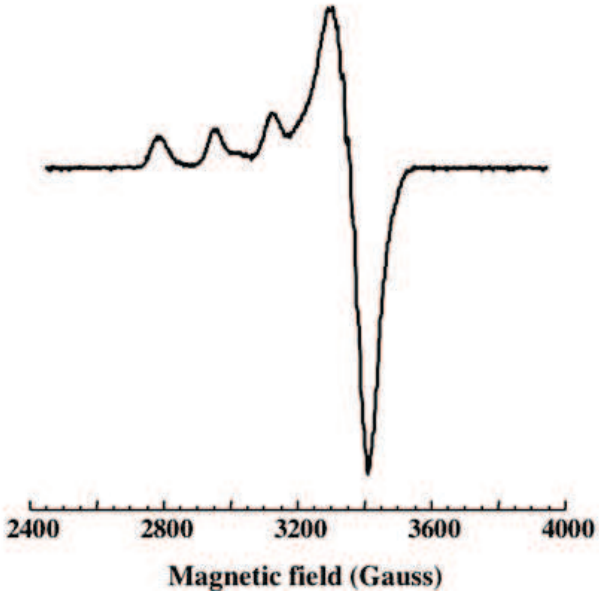


Figure 8.1.1 – Spectre RPE en bande X de la protéine CnrXs apo produite et cristallisée avant mon arrivée (Pompidor *et al.*, 2008).

Nous avons changé notre méthode de purification, en ajoutant de l'EDTA à chaque étape, excepté dans la dernière filtration sur gel, pour augmenter nos chances d'obtenir une protéine sans trace de métal. Le spectre RPE de la protéine ainsi produite ne montre aucune trace de cuivre ni d'autres métaux paramagnétiques. Toutefois, après cristallisation dans des conditions proches de celle publiée [Tableau 8.1] (Pompidor *et al.*, 2009), la fluorescence aux rayons X enregistrée sur le cristal juste avant la collecte des données de diffraction a indiqué une concentration non négligeable de zinc à l'intérieur du cristal ou dans la solution qui l'entoure. Cette contamination a été confirmée par la détection d'un signal anomal (autre que celui de la sélénométhionine) dans les données de diffraction, confirmant la présence de zinc dans la protéine..

Après détermination de la structure, nous avons observé que cet atome de zinc était situé dans un site semblable au site F décrit dans le chapitre précédent. Le site F étant détruit dans le mutant CnrXs-E63Q [voir résultats et discussions, section 7.5 page 133], nous avons donc utilisé cette protéine comme substitut de la protéine apo.

Nous avons obtenu des cristaux de CnrXs-E63Q dans des conditions similaires à celle de Se-CnrXs [Tableau 8.1]. Sa structure est déterminée à 1,9 Å et résolue par remplacement moléculaire avec Se-CnrXs comme modèle de phasage. Comme escompté, cette protéine ne contient aucun ion métallique.

8.2 Cristallisation des protéines métallées

La protéine de type sauvage CnrXs a été métallée par 4 équivalents de nickel (CnrXs-Ni), cobalt (CnrXs-Co) et zinc (CnrXs-Zn) avant d'être mise à cristalliser. Aucun cristal n'a pu être obtenu dans des conditions proches de celles utilisées pour Se-CnrXs ou CnrXs-E63Q. Environ 600 conditions issues de kits commerciaux (Hampton et Qiagen) ont été testées par le robot de cristallisation du HTX lab (High Throughput Crystallisation Laboratory, https ://embl.fr/htxlab/). L'analyse de ces tests nous a amené à choisir quelques conditions que nous avons reproduites à la main. Leur optimisation a souvent été nécessaire pour faire grossir les cristaux ou améliorer leur forme. Pour cela, nous avons fait varier quelques paramètres tel que la concentration en protéine, le pH ou bien la concentration des solutions tampons et des sels utilisés. Les conditions de cristallisation des cristaux qui ont été analysés par diffraction des rayons X, les temps d'apparition et la forme des cristaux ainsi que les agents cryoprotectants utilisés sont listés dans le tableau 8.1.

Les statistiques de l'enregistrement des données, de la résolution de la structure et de l'affinement sont résumées dans le tableau 8.2.

	Conditions de cristallisation	Taille de la goutte	Morphologie du cristal/ Groupe d'espace	Temps de croissance du cristal	Cryoprotectants utilisés
Se-CnrXs	22% PEG 2000MME 20% glycérol	2 µL protéine 2 µL réservoir	Plaque $P2_1$	2-4 jours	25% glycérol puis huile de paraffine
CnrXs-E63Q	16% PEG 2000MME 20% glycérol	2 µL protéine 2 µL réservoir	Plaque $P2_1$	2-4 jours	15% glycérol
CnrXs-Co	1,6 M sulfate d'ammonium 0,1 M Tris pH 8 15% glycérol	2 µL protéine 2 µL réservoir	Bipyramide tétragonale $P4_12_12$	1 mois	22% glycérol puis huile de paraffine
CnrXs-Ni	1,2 M phosphate de sodium 0,4 M phosphate de potassium	1 µL protéine 1 µL réservoir	Bipyramide tétragonale $P4_12_12$	2-4 jours	Paratone N
CnrXs-Zn	10% PEG 6000 1 M LiCl 0,1 M Hepes pH 7,5	1 µL protéine 1 µL réservoir	Cube I432	1 mois	20% glycérol puis huile de paraffine

Tableau 8.1 – Paramètres de cristallisation

8.3 Description et analyse des structures cristallograhiques

Au sein du cristal, l'unité asymétrique est formée soit par un ou deux dimères, soit par un monomère. Dans ce dernier cas, comme nous savons que l'unité biologique est le dimère (Pompidor *et al.*, 2009), cela signifie que les deux protomères sont strictement identiques et nous avons donc reformé le dimère en appliquant la symétrie cristallographique.

Selon les structures, les acides aminés situés entre les résidus Ser31 (premier acide aminé de la séquence clonée) et Glu35 voire Glu40 ne sont pas résolus. Les analyses de spectrométrie de masse montrent que les cristaux contiennent des protéines non dégradées. L'absence de ces acides aminés dans la structure est très certainement due à des positions relatives différentes de cette chaine polypeptidique au sein du cristal congelé.

8.3.1 Architecture générale de CnrXs :

Toutes les structures (CnrXs-Co, CnrXs-Ni, CnrXs-Zn, CnrXs-E63Q) montrent une architecture commune composée uniquement d'hélices α. Chaque protomère est formé par 4 hélices repliées en épingle à cheveux . Les deux courtes hélices α_1 et α_4, la partie aminoterminale de α_2 et la partie carboxyterminale de α_3 forment une structure particulière appelée "faisceau de

	CnrXs-Se	CnrXs-E63Q	CnrXs-Zn		CnrXs-Co			CnrXs-Ni
Data statistics								
Beamline	FIP-BM30A	FIP-BM30A	FIP-BM30A		PROXIMA1			FIP-BM30A
Synchrotron source	ESRF	ESRF	ESRF		SOLEIL			ESRF
Experiment	SAD	MR	MAD		MAD			SAD
Space group	$P2_1$	$P2_1$	I432		$P4_12_12$			$P4_12_12$
Cell parameters (Å)	a = 31.896 b = 81.809 c = 93.336 β = 90.465	a = 31.968 b = 79.341 c = 93.040 β = 90.107	a = 155.721		a = 33.033 c = 196.226			a = 32.198 c = 195.986
Asymmetric unit content	2 dimers	2 dimers	1 dimer	1 monomer	1 monomer	Inflection 1.6060	Remote 1.0332	0.9797
Wavelength (Å)	0.9795	0.9797	Peak 1.2839	Remote 0.9797	Peak 1.6048	39.22 – 2.42 (2.55 – 2.42)	33.04 – 1.55 (1.64 – 1.55)	32.20 – 1.41 (1.48 – 1.41)
Resolution range (Å) **(High resolution shell)**	46.67 – 1.91 (2.01 – 1.91)	46.52 – 1.89 (1.99 – 1.89)	44.71 – 2.45 (2.58 – 2.45)	44.95 – 2.30 (2.42 – 2.30)	39.22 – 2.42 (2.55 – 2.42)	4770	16626	20101
No. of unique reflections	36868	35627	11983	14718	4769	5.1 (20.4)	4.7 (33.4)	3.7 (14.7)
R_{merge} (%) [a]	3.5 (23.4)	6.5 (31.7)	7.4 (49.8)	9.1 (40.1)	4.9 (17.3)	2.0 (8.7)	2.6 (20.0)	1.5 (5.8)
R_{pim} (%) [b]	2.3 (16.0)	3.6 (17.4)	3.0 (20.2)	4.0 (17.4)	1.8 (6.9)	2.5 (8.0)	2.5 (16.6)	1.8 (5.2)
R_{ano} (%) [c]	3.3 (14.3)	-	4.8 (14.8)	3.8 (13.2)	4.2 (9.2)	11.4 (3.8)	12.2 (2.4)	13.2 (5.2)
$I / \sigma(I)$ [d]	13.9 (3.3)	8.6 (2.5)	8.8 (1.6)	5.4 (2.0)	11.7 (4.5)	99.6 (97.4)	99.1 (95.2)	95.6 (92.1)
Completeness (%)	99.0 (95.9)	96.2 (91.8)	99.8 (98.9)	99.8 (99.0)	99.9 (99.2)	12.1 (11.3)	7.2 (6.7)	13.8 (13.3)
Redundancy (%)	6.2 (5.6)	4.2 (4.2)	7.1 (6.9)		11.7 (11.8)			13.5 (12.6)
Refinement statistics								
No. of reflections used	36813	35583	14640		16579			20038
R_{work} / R_{free} (%)	18.73 / 23.82	17.21 / 21.96	20.70 / 25.93		17.62 / 20.38			17.95 / 19.78
No. atoms:	3622	3519	1768		910			892
protein+metal								
solvent	264	428	125		153			176
other	21	24	5		18			4
<B factor> (Å^2):	40.06	28.27	46.22		28.27			13.92
protein								
solvent	43.73	36.54	42.07		39.17			25.26
metal	-	-	Zn_{A1}: 28.25 Zn_{A2}: 44.17 Zn_B: 34.29		20.32			6.76
Rmsd: Bond lengths (Å)	0.006	0.006	0.016		0.017			0.007
Bond angles (°)	0.893	0.894	1.169		1.583			1.064

Tableau 8.2 – Statistiques de la cristallisation, de l'enregistrement des données et de l'affinement.

4 hélices" [Figure8.3.1]. Les 2 protomères s'associent pour former un dimère qui correspond à l'unité biologique (Pompidor *et al.*, 2009).

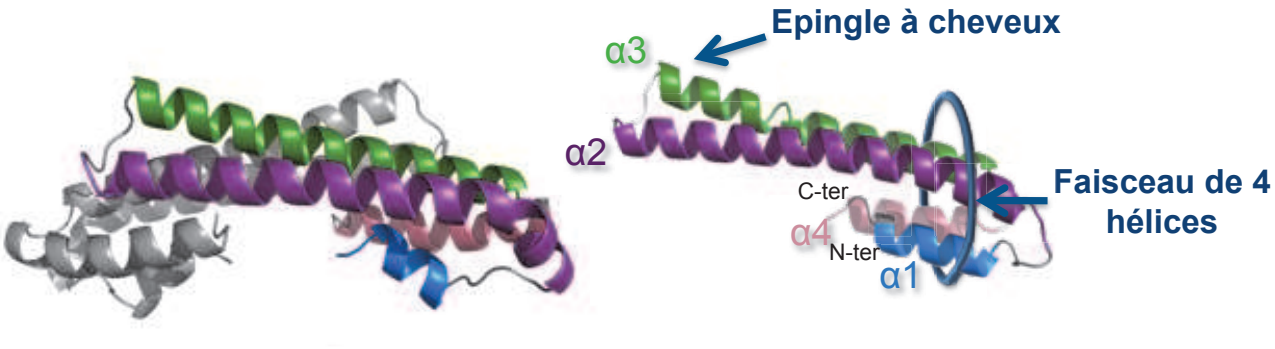


Figure 8.3.1 – Structure de la protéine CnrXs à gauche et d'un protomère à droite. Le faisceau des 4 hélices est indiqué par un cercle bleu. Code couleur : α_1 en bleu, α_2 en mauve, α_3 en vert et α_4 en rouge.

8.3.2 Caractérisation des sites de liaison au métal

La présence de chaque ion métallique (nickel, cobalt ou zinc) dans les cristaux est vérifiée par fluorescence après excitation par les rayons X avant l'expérience de diffraction.

8.3.2.1 La forme cristalline de CnrXs métallée cobalt ne contient que le site F

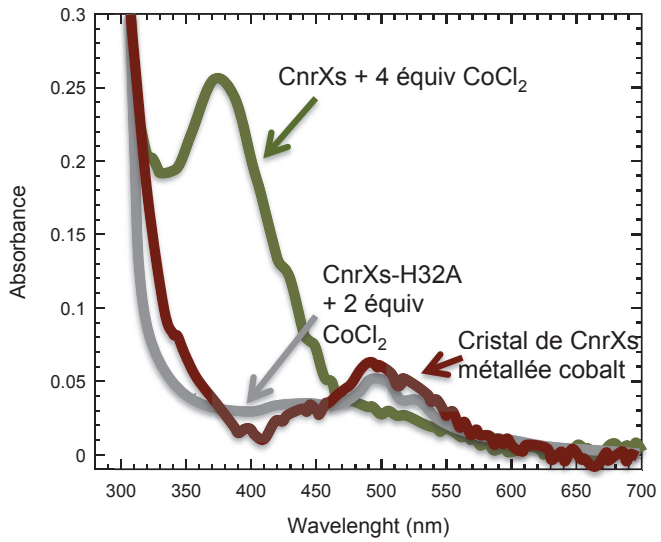


Figure 8.3.2 – Spectre d'absorption UV-visible d'un cristal de CnrXs métallée cobalt (courbe marron), de CnrXs-H32A métallée par 2 équivalents de cobalt (courbe grise) et de CnrXs métallée par 4 équivalents de cobalt (courbe verte).

Toutes les protéines cristallisées dans cette étude ne possèdent que 2 sites de liaison au métal par dimère. Au contraire, l'étude spectroscopique de CnrXs en solution avait mis en évidence 4 sites (2 sites F et 2 sites S) pour chaque dimère. L'utilisation d'un microspectrophotomètre mesurant l'absorption UV-visible sur des cristaux de protéine dans le laboratoire du Cryobench (ligne de lumière ID29S, ESRF) nous a permis d'élucider ce paradoxe. Le cristal de CnrXs-Co a un spectre identique à celui de la protéine CnrXs-H32A métallée par le cobalt avec un maximum d'absorbance à 495 nm [Figure 8.3.2]. Lorsque la protéine est sous forme cristalline, le cobalt est donc uniquement lié au site F.

Aucune information supplémentaire sur le site S ne pourra nous être fournie par l'étude des protéines cristallisées.

8.3.2.2 Le site de liaison du nickel et du cobalt

Les structures du site métallique du nickel et du cobalt sont très similaires. Les résidus ligands appartiennent aux hélices α_1, α_2 et α_3 et sont presque superposables [Figure 8.3.3c]. Le nickel et le cobalt sont liés par une coordination octaédrique 3N2O1S. Par l'analyse des distances et des angles entre deux résidus ligands consécutifs, nous avons établi que les 4 ligands équatoriaux définissaient un carré presque parfait [Tableau 8.3 et figure 8.3.3 a et b]. Les deux ions métalliques coordinent les atomes $N_\varepsilon 2$ des résidus His42, His46 et His119 et un oxygène provenant du Glu63. La coordination octaédrique est complétée en axial par le deuxième oxygène du Glu63 et par le soufre de la Met123. D'après ces caractéristiques ce site correspond au site F que nous avons caractérisé par spectroscopie. Les paramètres structuraux (nature et nombre des ligands ainsi que les distances cobalt-ligands) déterminés en solution par l'EXAFS pour le site cobalt sont strictement identiques à ceux rapportés par l'étude structurale.

8.3.2.3 Les sites de liaison du zinc

Les cristaux de CnrXs-Zn ont une forme cubique, très différente de celle des cristaux de CnrXs-Co ou de CnrXs-Ni [Tableau 8.1 page 150]. Le groupe d'espace est également différent indiquant des modifications dans l'empilement cristallin et donc certainement dans la structure en elle-même. Les protomères A et B des protéines CnrXs métallée par le nickel et le cobalt cristallisées sont identiques (un seul monomère par unité asymétrique). Au contraire, les protomères A et B de la forme métallée par le zinc sont différents (un dimère par unité asymétrique). En effet, trois atomes de zinc sont présents dans chaque dimère : 2 dans le protomère A et 1 dans le protomère B [Figure 8.3.8]. Dans ce dernier, le zinc est fixé dans le site F et coordine les 3 azotes des résidus His42, His46 et His119 et les 2 oxygènes du Glu63. Toutefois, contrairement au nickel et au cobalt, il est coordiné par une géométrie bipyramidale trigonale et non octaédrique, car la

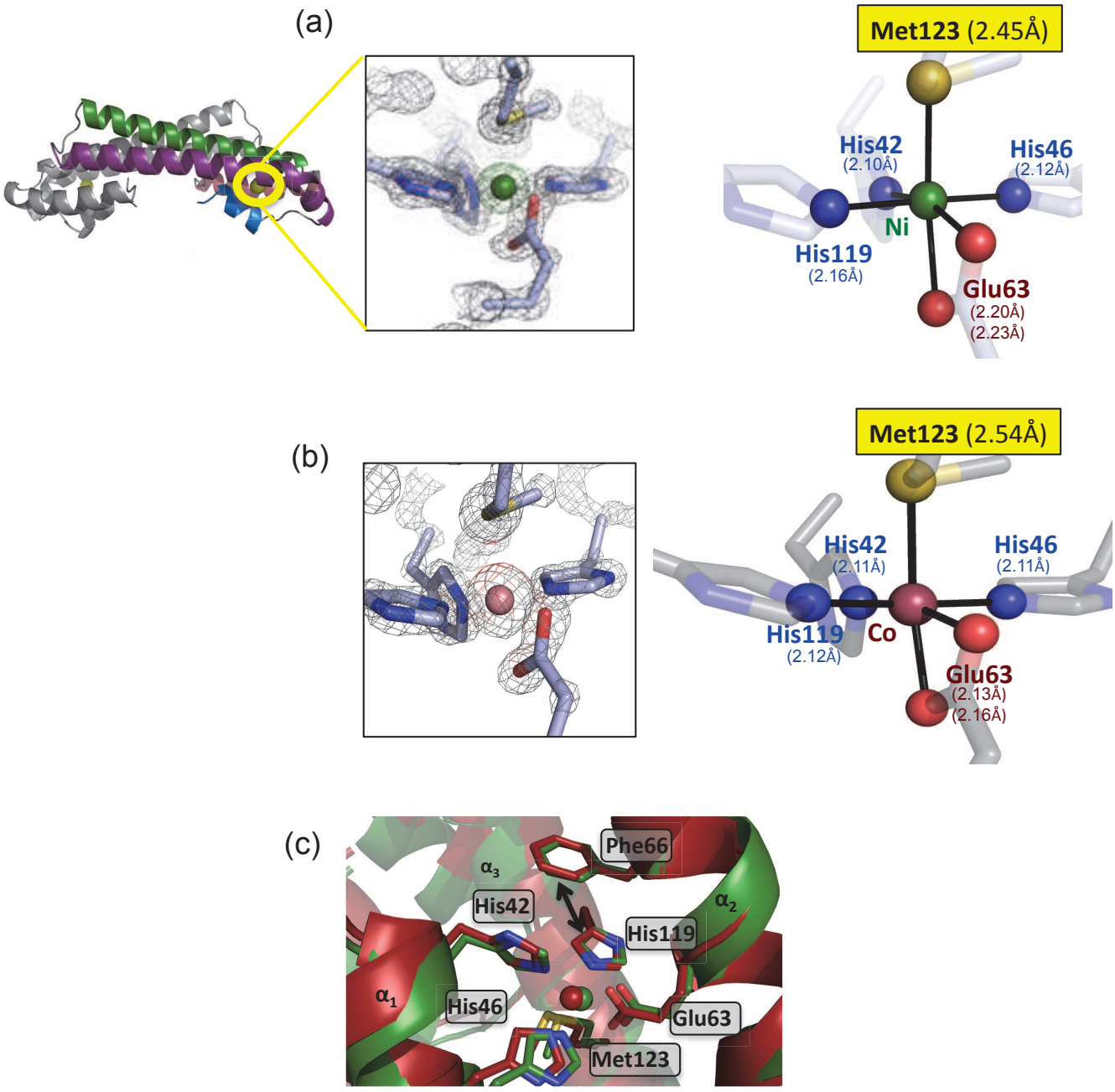


Figure 8.3.3 – Sites de liaison du nickel et du cobalt (a) Site de liaison du nickel. (b) Site de liaison du cobalt. Les panneaux de gauche montrent les cartes de densité électronique des sites métallés avec des contours à 2σ. Les panneaux de droite en proposent une représentation schématique. (c) Superposition des acides aminés qui coordinent le nickel et le cobalt. La flèche noire indique l'interaction $\pi - \pi$ entre les résidus Phe66 et His119.

méthionine est située à 3,9 Å et ne lie pas le métal [Figure 8.3.8, panneau du haut]. La protéine Se-CnrXs, contaminée par du zinc, utilise un site identique pour fixer le métal.

Dans le protomère A, le site F n'existe plus. Les résidus du site F sont répartis dans deux nouveaux sites qui permettent la fixation de deux ions zinc, chacun en coordination tétraédrique. Les résidus His38, Glu63 et His119 forment le premier site (Zn_{A1}). Le second site Zn_{A2} implique les résidus His42, His46 et Glu60. Les deux sites sont complétés par des ions chlorures provenant de la solution de cristallisation [Figure 8.3.8, panneau du bas]. En conséquence de ces réarrangements, les acides aminés situés sur α_1 sont déplacés de 6 Å le long de l'axe de l'hélice par rapport aux mêmes résidus de la forme nickel et cobalt [Figure 8.3.5].

Il est très probable, comme nous le verrons plus en détail dans la discussion que ce type de métallation soit un artefact induit par la construction de la protéine et les conditions de cristallisation. Seul le protomère B sera considéré lors de la comparaison des différentes structures obtenues.

8.3.2.4 Comparaison des sites de liaison au métal dans CnrXs-E63Q et dans les formes métallées de CnrXs

Un réseau d'interactions entre les hélices α_1, α_2 et α_3 [décrit dans le paragraphe 8.3.3], identique pour les différentes formes de CnrXs (exceptée pour le protomère ZnA) stabilise la forme globale de la protéine. Ainsi la position des C^{α} de certains des résidus ligands (Glu/Gln63, His119 et Met123) est similaire dans la forme apo et dans les formes métallées. De ce fait, la structure globale de la protéine n'est pas modifiée par l'ajout du métal [Figure 8.3.6, à gauche].

Le site F semble être préformé.. Si on regarde plus en détail le site F, on remarque que seul le résidu His119 a la même conformation dans les 4 protéines. En effet, la position de l'anneau imidazole de His119 est stabilisée par une intéraction $\pi - \pi$ avec Phe66 ; point fixe de la structure (distance 3,8 Å). Au contraire les chaînes latérales des autres acides aminés ligands ont une position "ouverte" dans CnrXs-E63Q et "fermée" dans les formes métallées. Cela suggère que His119 fonctionne comme un piège à cations et que les autres résidus du site de liaison replient leurs chaînes latérales vers le métal pour compléter la sphère de coordination.

8.3.3 Un réseau dense d'interactions stabilise le protomère et le dimère

8.3.3.1 Un réseau d'interactions hydrophobes

Stabilisation du faisceau des 4 hélices : Le repliement des 4 hélices empilées est stabilisé par des interactions hydrophobes entre des résidus très conservés dans les 23 membres de la famille CnrX [voir introduction, section 4.2.5 page 69]. Nous avons identifié les résidus Leu41, Leu45, et Val49 dans α_1, Leu51 dans la boucle qui connecte α_1 et α_2, Leu59 à l'extrémité aminoterminale

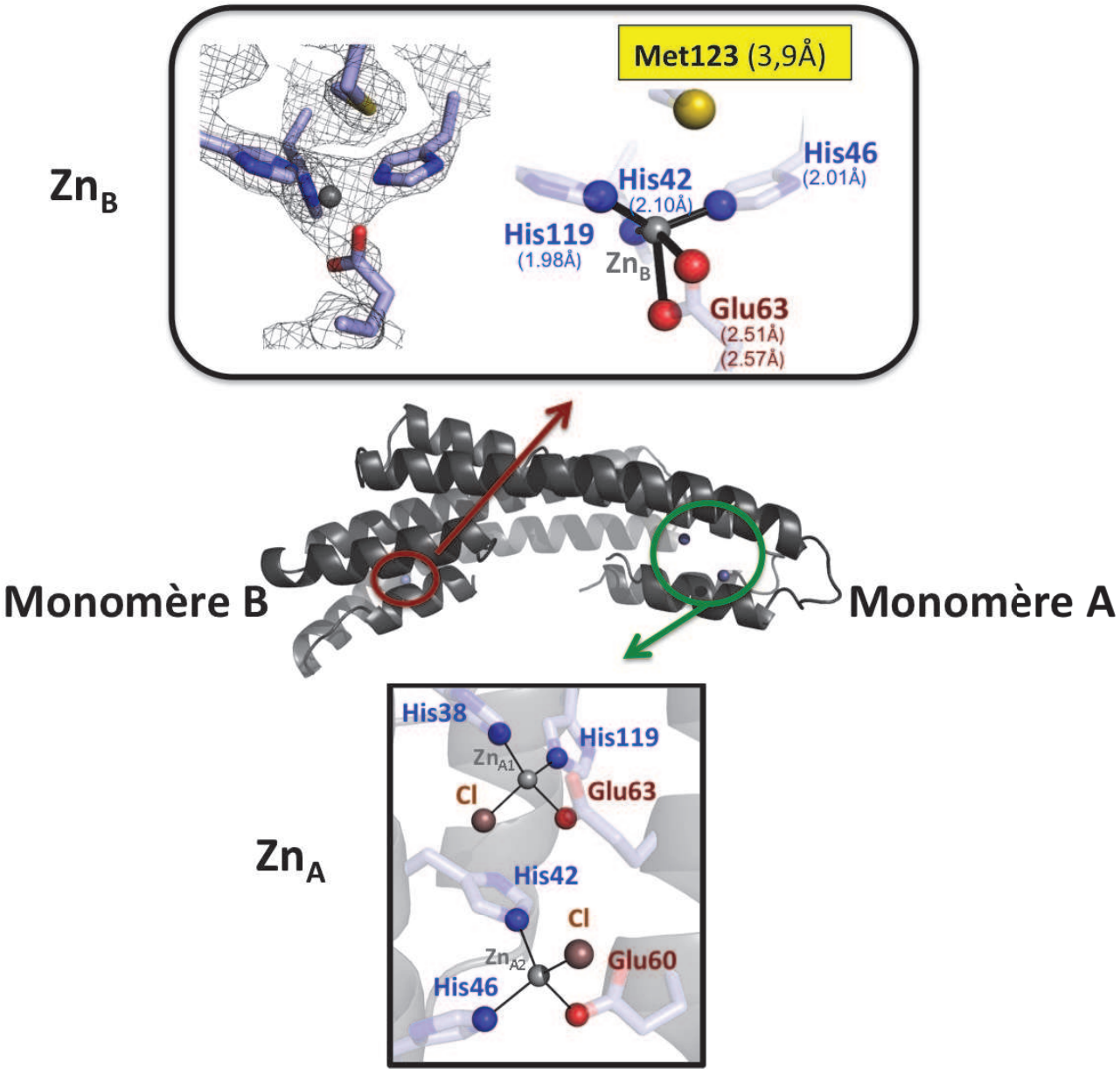


Figure 8.3.4 – Les différents sites de liaison du zinc. Au centre, la structure du dimère de CnrXs métallée par du zinc. Le panneau du haut présente le site Zn_B : le panneau de gauche montre la carte de densité électronique du site métallé avec des contours à 2σ et celui de droite en propose une représentation schématique. Le panneau du bas présente les sites Zn_A

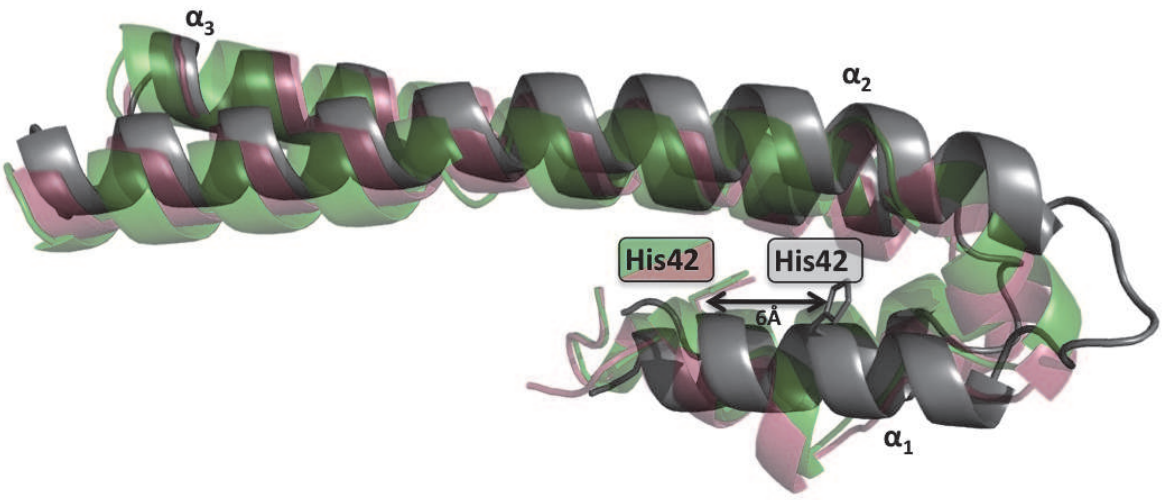


Figure 8.3.5 – Changements conformationnels induits par le métal sur le protomère A de CnrXs. Le résidu His42 est indiqué comme marqueur de translation de l'hélice α_1. Code couleur : CnrXs métallée par le nickel en vert, CnrXs métallée par le cobalt en rouge et CnrXs métallée par le zinc en gris.

	Ni	Co	Zn_{A1}	Zn_{A2}	Zn_B
Distance entre l'ion métallique et l'atome ligand (Å)					
$N^{\varepsilon 2}$ His38			2,11		
$N^{\varepsilon 2}$ His42	2,10	2,11		2,15	2,10
$N^{\varepsilon 2}$ His46	2,12	2,11		2,19	2,01
$N^{\varepsilon 2}$ His119	2,16	2,12	2,07		1,98
O_1 Glu60				2,10	
O_1 Glu63	2,20	2,13	2,11		2,51
O_2 Glu63	2,23	2,16			2,57
S^{δ} Met123	2,45	2,54			3,90
Cl			2,30	2,33	
Angles entre le métal et deux ligands consécutifs dans le plan équatorial (°)					
His42/His119	89,25	92,00			
His42/His46	88,56	87,73			
His46/Glu63	93,65	91,92			
His199/Glu63	86,29	90,22			
Angles entre les deux ligands axiaux (°)					
Met123/Glu63	155,50	158,00			

Tableau 8.3 – Géométrie des sites métalliques

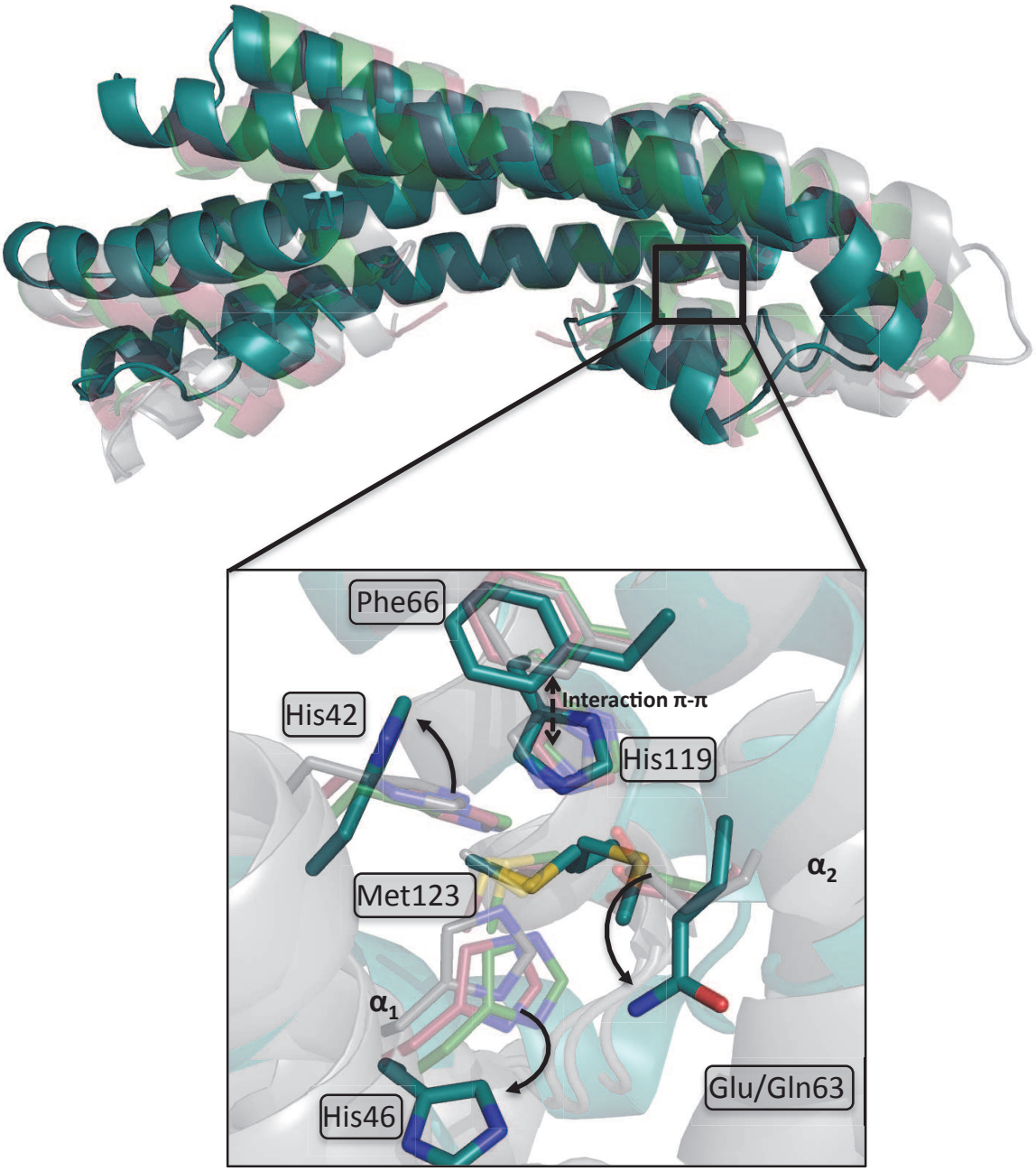


Figure 8.3.6 – Comparaison de la forme apo et des formes CnrXs métallées. En haut : superposition globale du dimère dans les différentes formes. En bas : superposition des résidus du site métallique de CnrXs cristallisée en présence de nickel, de cobalt ou de zinc et des mêmes résidus dans le mutant CnrXs-E63Q. Deux conformations de la chaîne latérale de la méthionine coexistent dans CnrXs-E63Q. La chaîne latérale des résidus ligands est dite "ouverte" dans CnrXs-E63Q et "fermée" dans les formes qui lient le métal ; excepté la chaîne latérale de His119 toujours dans une même conformation du fait de son interaction avec Phe66. Code couleur : CnrXs métallée nickel en vert, CnrXs métallée cobalt en rouge, CnrXs métallée zinc en gris et CnrXs-E63Q en bleu. Les ions métalliques ont été enlevés de la figure pour plus de clarté.

de α_2, Leu117, Val120, Phe121, Leu127 à l'extrémité carboxyterminale de α_3, Leu139 et Leu143 dans l'hélice α_4.. Ces résidus forment un coeur hydrophobe qui englobe les 4 hélices et stabilise leur position les unes par rapport aux autres [Figure 8.3.7- A].

Stabilisation du dimère : Le corps globulaire s'étend au protomère opposé à travers l'interface dimérique. Ainsi, l'épingle à cheveux constituée par les hélices α_2 et α_3 du protomère A [Figure8.3.7, panneau B, volume rose] repose sur le corps globulaire constitué par le faisceau de 4 hélices de l'autre protomère [Figure8.3.7, panneau B, volume bleu]. Les deux sites de liaison aux métaux de type F, construits par des résidus provenant des 3 hélices, forment une poche [Figure 8.3.7, surface orange] au centre de ce coeur hydrophobe.

8.3.3.2 ... complétés par des interactions non-hydrophobes

Un réseau d'interactions non-hydrophobes, commun à toutes les formes de CnrXs, stabilise en plus la structure tertiaire de la protéine. L'interaction entre les hélices α2 et α3 est articulée autour de l'interaction $\pi - \pi$ précédemment mentionnée entre Phe66 et His119 et par un pont salin entre les résidus Arg76 et Asp111. La position relative des hélices α3 et α4 est également consolidée par une liaison hydrogène entre Val 120 et Tyr135 et par un pont salin entre Arg124 et Asp136.

8.3.4 Modifications conformationnelles dépendant du métal : des effets d'ampleur variables selon les métaux

8.3.4.1 Différences entre les formes CnrXs-Ni/CnrXs-Co avec la forme CnrXs-Zn

A première vue la structure globale de CnrXs ne varie pas [Figure 8.3.6]. Toutefois, nous avons mis en évidence des modifications conformationnelles plus localisées par des calculs de RMSD (RMSD : Root-Mean-Square Deviation ou écart quadratique moyen). Le RMSD mesure le carré des distances entre les C^{α} des mêmes résidus sur les différentes structures de la protéine. Ce paramètre est utilisé pour comparer des conformations différentes.

Sur les 54 résidus présents dans le faisceau des 4 hélices, le calcul du RMSD mesure un écart de 0,24 Å entre CnrXs-Ni et CnrXs-Co, tandis qu'il est de 1,99 Å entre CnrXs-Ni et CnrXs-Zn (Zn_B). Cette divergence importante (RMSD $>$ 1 Å) a pour origine une différence dans le positionnement de l'extrémité aminoterminale de l'hélice α_2 entre les deux formes métallées [Figure 8.3.8]

Le début de l'hélice α_2 est formé par un coude incluant les sept acides aminés 60-ELKEDAF-66. En présence de zinc la position de ce coude est bien plus éloignée de l'hélice α_3 qu'en présence de nickel. Cette déviation est illustrée par la distance entre Gly126 localisé sur α_3 et Glu55 à

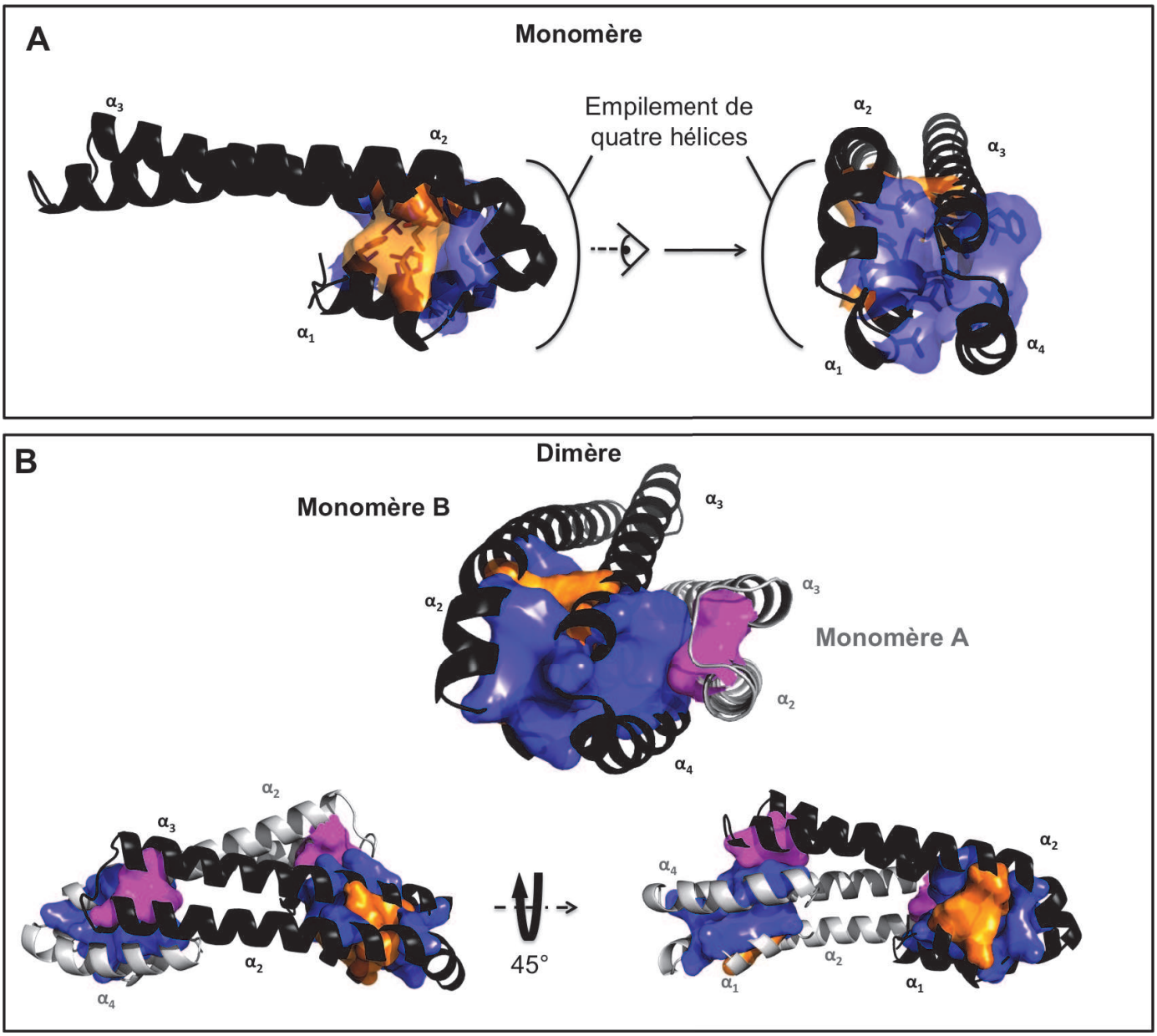


Figure 8.3.7 – Interactions hydrophobes intra et inter protomères. La structure est celle de CnrXs métallée par le nickel. Le panneau A montre un protomère de CnrXs. Les chaînes latérales des résidus hydrophobes conservés sont représentés sous forme de bâtons bleus. L'ensemble forme un corps globulaire (en bleu) qui stabilise le faisceau des 4 hélices du protomère. Le site de liaison au métal est représenté par un volume orange. La vue de droite correspond à une rotation de 90° par rapport à l'axe vertical de la vue de gauche. Le panneau B représente un dimère de CnrXs. Les résidus hydrophobes Leu84, Ile88 et Leu143 des hélices α_2 et α_3 du protomère A forment des interactions (en rose) avec le corps globulaire *via* les résidus hydrophobes Leu117 et Phe120 du protomère B. En bas, vue d'ensemble du dimère de CnrXs. Les deux vues correspondent *via* une rotation de 45° par rapport à un axe horizontal.

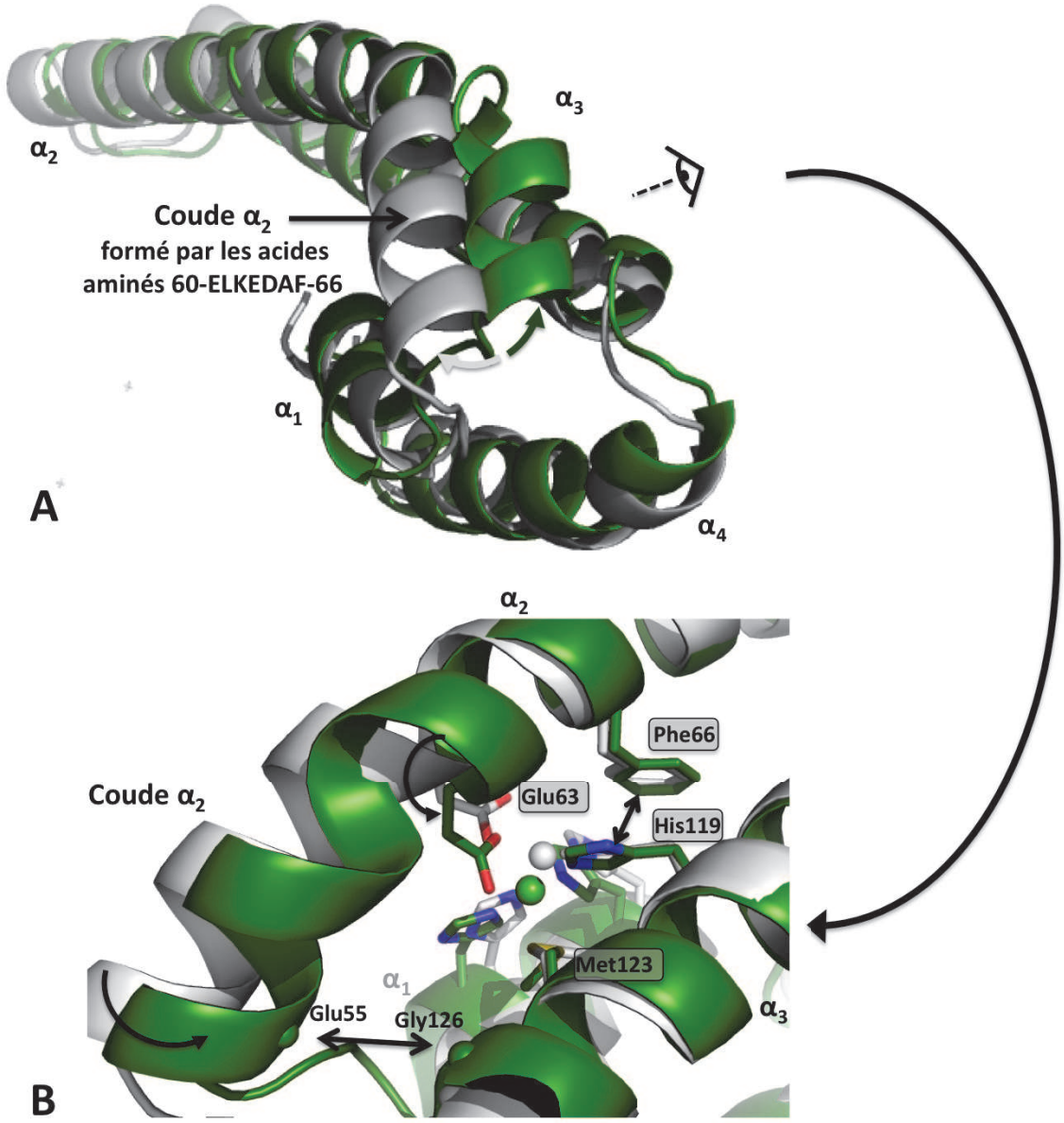


Figure 8.3.8 – Changements conformationnels lié à la métallation : superposition du protomère B de CnrXs-Zn (en blanc) et de CnrXs-Ni (en vert). A : Vue globale du protomère B. La flèche indique la différence de positionnement du coude de l'hélice α_2 entre les deux formes métallées. B :Vue rapprochée du site métallique. Certains acides aminés ligands sont indiqués, ainsi que l'interaction $\pi - \pi$ entre Phe66 et His119. Les C^{α} de Glu55 et de Gly126 qui ont permis la mesure des distance entre α_2 et α_3 sont également identifiés.

l'extrémité aminoterminale de α_2 : 11 Å dans CnrXs-Zn contre seulement 8 Å dans la forme CnrXs-Ni [Figure 8.3.8].

L'ion nickel coordine le résidu Met123 de l'hélice α_3 et le Glu63 de l'hélice α_2, un pont par l'intermédiaire du métal s'établit entre les deux hélices qui sont donc rapprochées. Le zinc, lui est dans une géométrie trigonale bipyramidale et ne lie pas la méthionine. Aucune contrainte n'impose alors à la protéine un rapprochement entre le coude de l'hélice α_2 et l'hélice α_3. De ce fait, les résidus situés entre Ala48 et Lys62 ne sont pas du tout superposables entre les deux formes. Cette modification conformationnelle est donc régulée en fonction de la nature du métal présent dans le site et de sa chimie de coordination.

Ce mouvement est aidé par les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes conservés : Val49 dans α_1, Leu51 dans la boucle qui connecte α_1 et α_2, Leu59 dans α_2, et Leu127 dans α_4. Etant plus proches dans les conformations CnrXs-Ni et CnrXs-Co que dans CnrXs-Zn [1], ces résidus forment une pince hydrophobe qui stabilise davantage les positions rapprochées de α_2 et α_3 [Figure 8.3.9].

Par l'action du coeur hydrophobe, la distortion latérale de la boucle qui connecte α_1 et α_2 et du début de α_2 se traduit également par un mouvement de translation verticale de α_1 et α_4 [Figure 8.3.10].

La fin du coude α_2 est identifiée par le résidu Phe66, un point fixe de la structure, qui maintient les positions de la fin de l'hélices α_2 et du début de α_3, quelque soit la forme métallée, par son interaction $\pi - \pi$ avec His119 de α_3. Du fait de la structure artéfactuelle du protomère Zn_A, nous ne pouvons ni évaluer les différences sur la conformation globale du dimère ni prendre en compte les modifications de la fin de α_2 et du début de α_3 qui peuvent être induites par le corps globulaire hydrophobe du protomère A.

Le recrutement de la chaine latérale de Met123 dans la sphère de coordination du nickel et du cobalt est donc le marqueur qui permet de distinguer la forme inactive de la forme active de la protéine. On peut l'assimiler à un interrupteur moléculaire dont la présence dans la sphère de coordination du métal caractérise la forme active de la protéine.

8.3.4.2 Différences de conformation des protéines CnrXs-Ni et CnrXs-Co

Les ions nickel et cobalt ont des sphères de coordination très similaires [voir section 8.3.2.2 page 153]. La différence essentielle est la distance du métal à la méthionine qui est plus longue pour l'ion cobalt que pour le nickel (2,54 Å contre 2,45 Å), indiquant que la nature de l'ion métallique influe sur sa position dans le site comme cela avait été montré pour la protéine RcnR [voir introduction, section 3.1.2 page 44]. Ce petit écart est propagé par le réseau d'interactions décrit précédemment et va affecter la structure globale des dimères.

1. Ce rapprochement peut être illustré par la distance séparant Leu59 (α_2) et Leu127 (α_3) qui mesure 6,79 Å dans CnrXs-Zn contre seulement 3,52 Å pour la forme nickel.

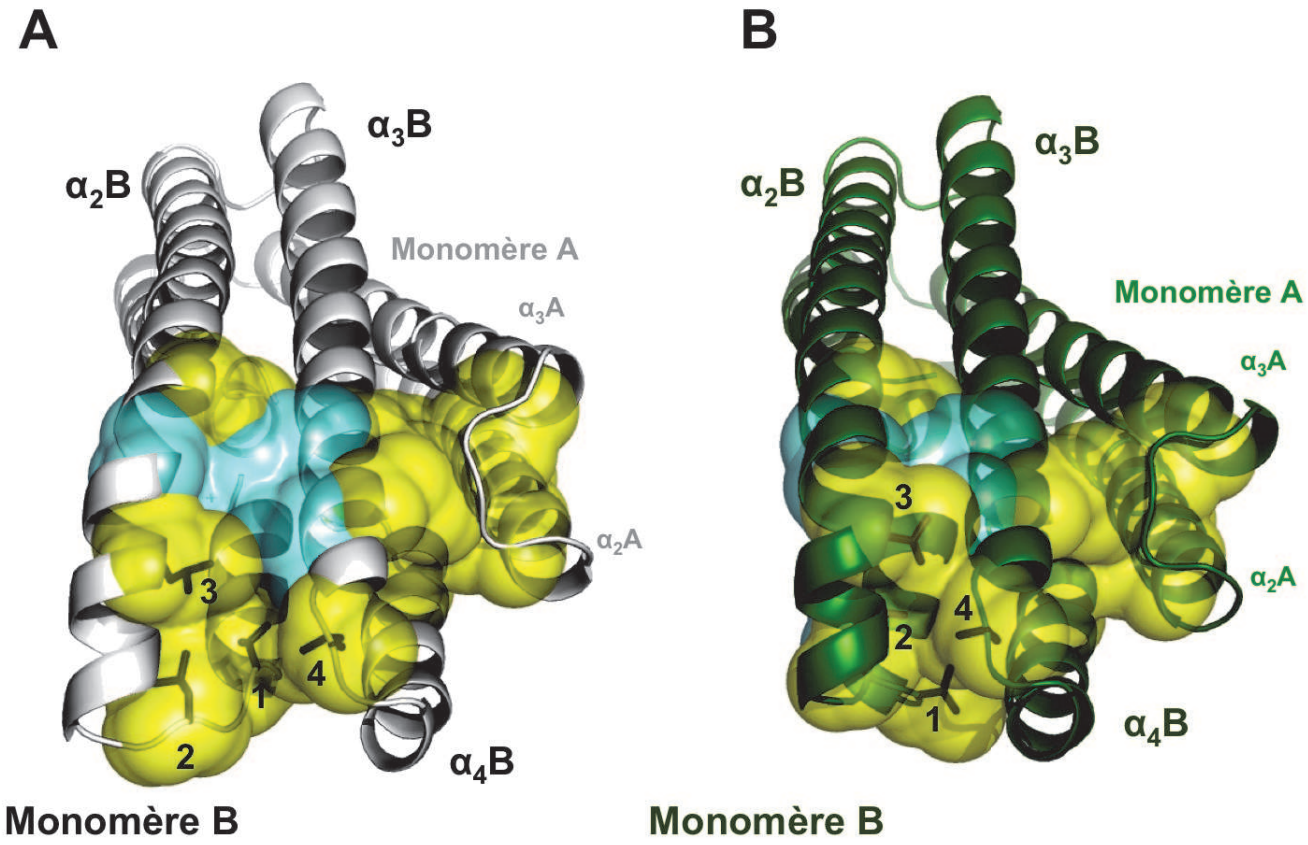


Figure 8.3.9 – Changements conformationnels liés à la métallation : la forme nickel est stabilisée par une pince hydrophobe. Le mouvement du coude de l'hélice α_2 rapproche les 4 résidus hydrophobes Val49 (1), Leu51 (2), Leu59 (3) et Leu127 (4), indiqués sous forme de bâtons noirs sur la figure) et les associent en une pince hydrophobe. Elle est incluse dans le coeur hydrophobe (délimité par une surface jaune) qui connecte le faisceau des 4 hélices et qui entoure le site de liaison au métal (volume bleu).

Certes, comme je l'ai fait remarquer, la conformation du faisceau des 4 hélices est assez proche dans les formes CnrXs-Ni et CnrXs-Co [2] [section 8.3.4.1 page 159]. Toutefois, certaines différences sont visibles dans la forme cobalt :

-La courbure de la partie aminoterminale de α_2 et la partie carboxyterminale de α_3 est plus accentuée que dans la forme nickel.

-Les hélices α_1 et α_4 sont légèrement plus repliées vers la face concave de la protéine. Cette modification est illustrée par la mesure des distances entre les C^{α} de Asp40 (α_1) et de Arg70 (α_3) et, de Gln113 (α_3) et Gln148 (α_4) qui sont plus faibles en présence de cobalt (12,1 Å / 5,5 Å) qu'en présence de nickel (12,4 Å / 5,9 Å) [Figure 8.3.11-B].

-Les extrémités aminoterminales du protomère A (Glu40) et carboxyterminales du protomère B (Glu148) sont plus proches qu'en présence de nickel (16,63 Å contre 17,35 Å) [Figure 8.3.11-C]

2. On rappelle un RMSD de 0,24 Å entre les deux formes, RMSD $<$ 0,3 Å indiquant des conformations très proches.

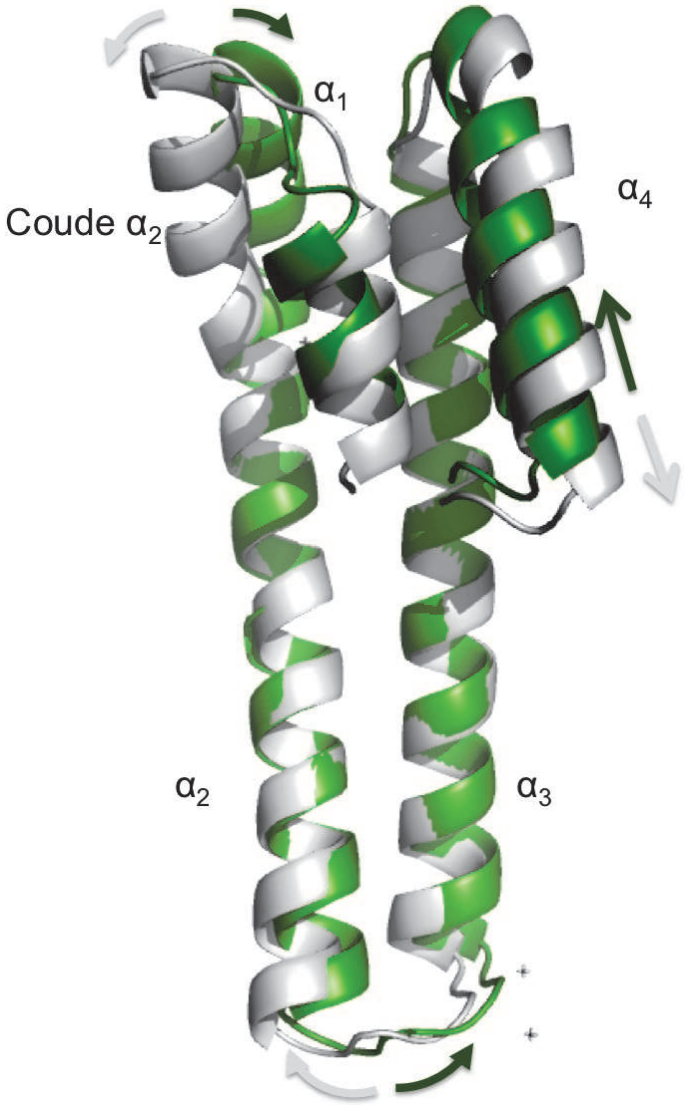


Figure 8.3.10 – Changements conformationnels lié à la métallation : superposition du protomère B de CnrXs-Zn (en blanc) et de CnrXs-Ni (en vert) qui montre les mouvements de α_1 et α_2.

-La position des hélices α_2 et α_3 (à l'emplacement du faisceau des 4 hélices) est légèrement plus resserrée que dans la forme nickel (distance entre Lys62 (α_2) et Gln122 (α_3) de 7,28 Å pour la forme cobalt contre 7,58 Å pour le nickel).

-Les deux protomères sont plus proches. Les hélices α_3 des protomères A et B sont rapprochées, cela est illustré par la distance entre Glu99 (α_3A) et Arg114 (α_3B) qui est de 7,7 Å pour le cobalt et de 9,5 Å pour le nickel.

Cet ensemble de légères modifications engendre une conformation de la protéine métallée cobalt légèrement plus compacte que la forme nickel. Ainsi, lorsqu'on passe d'une forme à l'autre *in silico*, on voit que la détection du métal est couplée à une sorte de respiration de la protéine (conformation élargie avec le nickel →conformation compacte avec le cobalt).

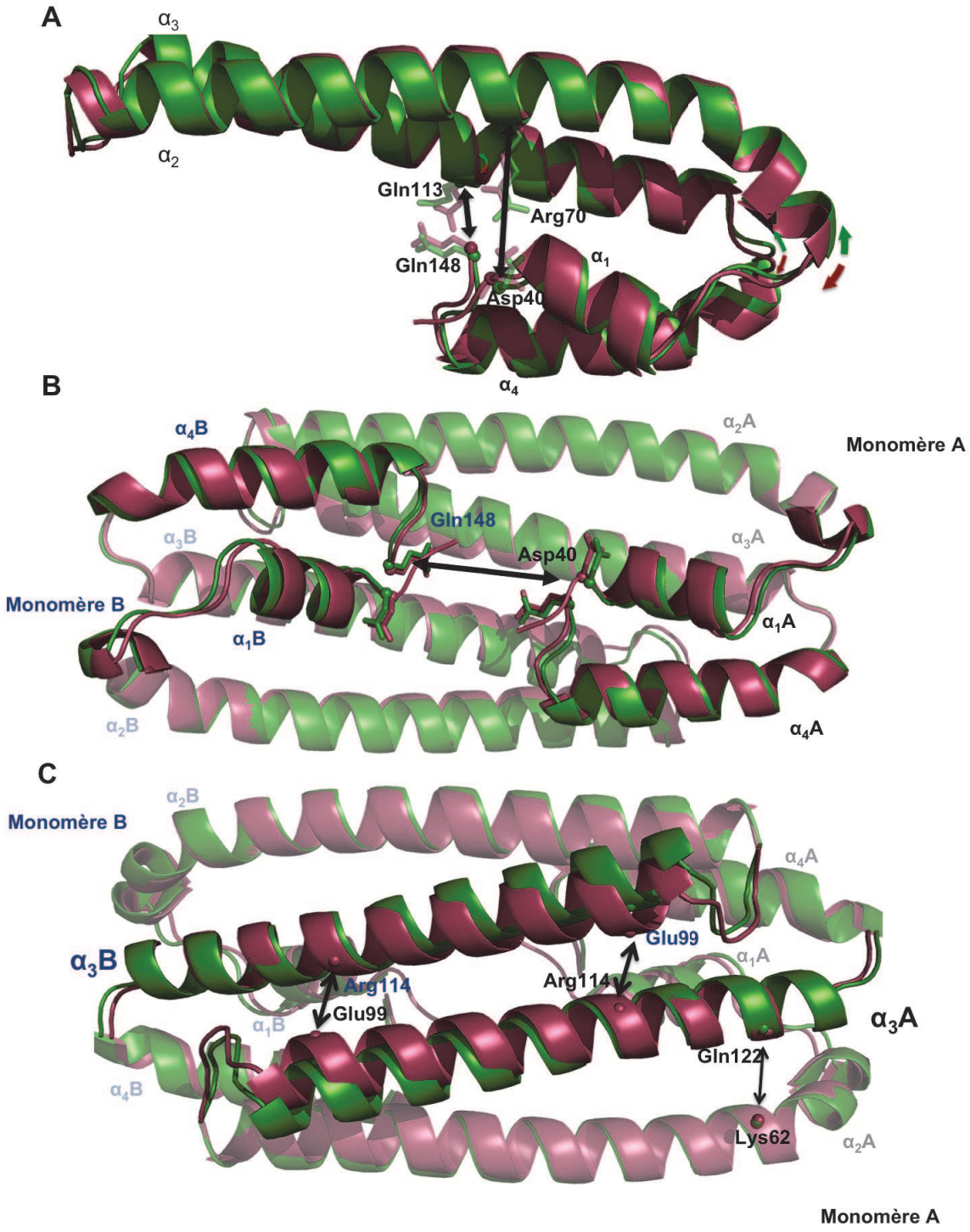


Figure 8.3.11 – Changements conformationnels lié à la métallation : superposition de CnrXs-Co (en rouge bordeau) et de CnrXs-Ni (en vert). A : vue d'un protomère. Les flèches rouges et vertes indiquent la différence de positionnement relatif des hélices α_2 et α_3 entre les deux formes métallées. B et C : vue globale des dimères. Les résidus utilisés dans le texte pour illustrer les différences de conformations ont été identifiés sur la figure.

Si on exclut la séquence Ala48-Lys62 dont la structure est très affectée par l'ajout du zinc, le RMSD calculé sur tous les autres résidus du protomère B (93 C^{α}) mesure un écart de 0,69 Å entre CnrXs-Co et CnrXs-Zn et un écart de 0,91 Å entre CnrXs-Ni et CnrXs-Zn. Donc, dans ces conditions, la forme cobalt est plus proche de la forme zinc. Ainsi les changements de conformation locaux associés au recrutement de la méthionine se propage moins bien dans la forme cobalt que dans la forme nickel, laissant la majorité de la conformation de CnrXs-Co finalement assez proche de la forme liée au zinc.

CnrX est capable de distinguer entre la liaison du nickel qui est un inducteur fort et la liaison du cobalt, un inducteur plus faible. Cette distinction repose principalement sur la distance du métal à la méthionine qui est plus grande de 0,1 Å pour le cobalt. Les différences locales entre la forme nickel et la forme cobalt sont certe modestes pour chaque protomère, mais suffisent à moduler notablement le dimère entier.

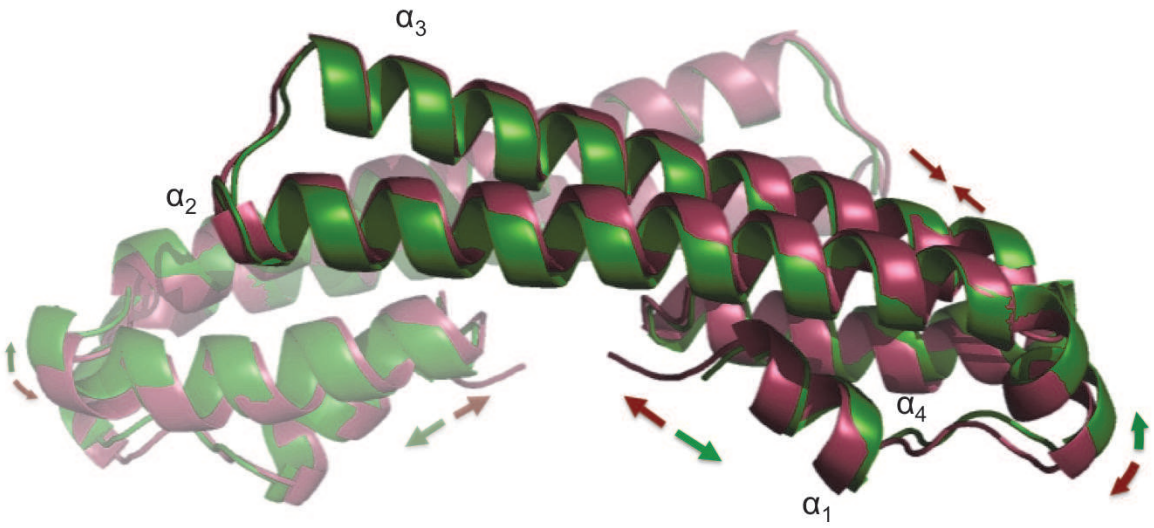


Figure 8.3.12 – Changements conformationnels lié à la métallation : superposition de CnrXs-Co (en rouge) et de CnrXs-Ni (en vert).

8.4 Discussion

CnrX est le premier maillon de la cascade de signalisation CnrYXH. L'interaction entre un ion métallique spécifique et la partie périplasmique de cette protéine senseur est l'élément déclencheur du processus de transduction du signal. La question de la détection du métal par CnrXs, le domaine périplasmique de liaison au métal, a été en partie résolue par la caractérisation spectroscopique des sites métalliques. La manière dont CnrXs sélectionne un ion métallique parmi les autres n'est cependant toujours pas complètement comprise. Il semble que l'affinité joue pour départager le nickel et le cobalt (métaux inducteurs du système) du zinc (métal non inducteur). Toutefois, le nickel semble avoir une affinité similaire à celle du cobalt alors que son pouvoir d'induction est supérieur. La question reste donc entière autant que celle de la nature du signal déclenché par CnrX pour permettre à CnrY de relarguer CnrH.

Dans le but d'apporter des éléments de réponses à ces questions nous avons étudié les effets des métallations sur CnrXs en déterminant la structure de différentes formes métallées de la protéine.

Toutes les formes métallées de la protéine possèdent 2 sites de liaison au métal par dimère. Ainsi contrairement à la forme soluble de CnrXs qui fixe 4 ions cobalt, la forme cristalline n'en montre que deux, les deux autres n'étant pas présents dans le cristal. Une combinaison de plusieurs facteurs comme les contraintes cristallines, l'empilement cristallin et la plus basse affinité de ce site peuvent, peut-être, expliquer pourquoi l'ion métallique présent dans le site S est éjecté au moment de la cristallisation. La caractérisation structurale du cobalt présent dans le site S aurait été un important recours pour étayer ou invalider notre hypothèse sur la formation de complexes binucléaires. Malheureusement, aucune des conditions de cristallisation ne nous a jamais permis de visualiser ce site ni dans CnrXs ni dans NccXs dont nous avons résolu la structure.

8.4.1 A l'état basal, CnrXs est lié au zinc

Dans l'étude précédente portant sur CnrXs et publiée par Pompidor *et al.* (2008), la structure de la protéine présumée apo avait été déterminée à 1,74 Å de résolution. Toutefois, cette forme était contaminée par une quantité de cuivre sous-stoechiométrique provenant de la purification. L'unité asymétrique contenait un mélange de forme CnrXs métallée et de forme apo. La structure de l'apoprotéine avait été résolue par remplacement moléculaire à partir de la protéine métallée cuivre. Nous n'avions pas dans ce travail trouvé de corrélation entre le changement conformationnel et le déclenchement du signal. Ce lien a pu nous échapper pour plusieurs raisons :

(i) la structure de l'apoprotéine est possiblement biaisée à cause du modèle cuivre utilisé pour le phasage, entraînant des difficultés pour comparer les deux formes protéiques,

(ii) le cuivre est un contaminant dans cette protéine, son taux d'occupation du site est de 60%, 30%, 30% et 0% selon les monomères de l'unité asymétrique, sa concentration est donc potentiellement trop faible pour voir des changements et,

(iii) les ions cuivre sont de faibles inducteurs, les différences de conformations avec l'apoprotéine peuvent être minimes.

Afin d'obtenir une véritable apoprotéine, nous avons changé le protocole d'extraction et de purification de la protéine en ajoutant de l'EDTA à chaque phase exceptée la dernière étape de filtration sur gel. La protéine ainsi obtenue ne contient pas de cuivre comme indiquée par l'étude RPE. Toutefois, la fluorescence des rayons X enregistrée sur le cristal montre que la protéine contient du zinc (silencieux en RPE) et d'après la structure ce zinc est lié dans un site semblable au site F.

Pour être certains d'éviter les contaminations nous avons donc utilisé le mutant CnrXs-E63Q comme substitut de l'apoprotéine. Ce mutant possède la même structure globale que les formes métallées de la protéine. Le site métallique est préformé et c'est le résidu His119 qui, dans la même position dans toutes les formes, semble être l'élément qui attire le métal dans le site. Une fois le métal en place, les chaînes latérales des acides aminés ligands se replient pour coordiner le métal. Ce mécanisme n'est bien entendu qu'une hypothèse, d'autant que se pose la question de la réalité physiologique de la forme apo de la protéine. En effet CnrXs sauvage est contaminée par du zinc provenant certainement du tampon dans lequel il est à l'état de trace. Or, *C. metallidurans* CH34 est une bactérie adaptée aux biotopes industriels qui a d'ailleurs été isolée pour la première fois dans un bassin de décantation d'une usine produisant du zinc (Mergeay *et al.*, 1978). De plus, il ressort d'une étude sur la composition du sol français, que le zinc est l'élément trace le plus présent devant les autres ions métalliques comme le cobalt et le nickel (Saby *et al.*, 2009). Il semblerait donc que *C. metallidurans* CH34, en tant qu'espèce qui colonise des environnements riches en métaux, soit en contact permanent avec des concentrations non négligeables en zinc naturel ou anthropogénique. En conséquence de quoi, lorsque la protéine périplasmique CnrX est exprimée à un niveau basal (non induit), elle existe probablement dans un état lié au zinc. Comme le Zn n'induit pas de réponse biologique, nous pensons que la forme métallée zinc représente la forme au repos de la protéine et que la forme apo a peu de chance d'exister *in vivo*. Cette hypothèse est valable puisque nous avons montré que les ions inducteurs, le cobalt et le nickel peuvent déplacer le zinc pour activer le système [voir résultats et discussions, section 7.7.1]

Une des grandes différences entre cette protéine et les métallorégulateurs cytoplasmiques qui ont été beaucoup étudiés, est la quantité de métal présent dans leur environnement proche. En effet, les métallorégulateurs ne sont confrontés qu'à des concentrations minimales en zinc libre (10^{-15} M, Outten et O'Halloran (2001)) ou en cuivre libre (10^{-21} M, Changela *et al.* (2003)) ; tandis que CnrX doit faire face à un environnement périplasmique dont la composition en métaux reflète celle du milieu extérieur du fait de la diffusion libre des cations métalliques à travers les porines de la membrane externe (Nies, 2007; Nikaido et Vaara, 1985). Ainsi nous pouvons comparer la situation de CnrX à celle de métalloenzymes périplasmiques telles que MncA et CucA, enzymes dépendant respectivement du Mn^{2+}et du Cu^{2+} (Tottey *et al.*, 2008; Waldron *et al.*, 2010).. Le repliement de ces protéines *in vitro* en présence d'extraits solubles périplasmiques génère obligatoirement des formes métallées zinc inactives. Les ions manganèse et cuivre ayant des affinités comparables à celle du zinc *in vitro*, *in vivo* l'insertion du métal se fait dans le cytoplasme pour éviter toute contamination (Tottey *et al.*, 2008; Waldron *et al.*, 2010). Il est très probable que CnrX fixe du zinc dans un premier temps et que celui-ci soit remplacé dans un deuxième temps par du nickel ou du cobalt lorsque leur concentration augmente [voir résultats et discussions, section 7.7.1]. La sélectivité de CnrX pour les métaux inducteurs semble donc être en partie liée à l'affinité du métal pour la protéine.

La structure de la protéine liée au zinc a été déterminée. Elle montre la liaison de 3 ions zinc par dimère de protéine ; 2 dans le protomère A et 1 dans le protomère B. Nous pensons qu'en dépit d'importants changements conformationnels subis par le protomère A, les sites Zn_A seraient des artefacts. En effet :

(i) l'étude *in vivo* sur des mutants de CnrX indique que His38, un des ligands de Zn_{A1}, n'est pas indispensable pour la fonction de la protéine (Grass *et al.*, 2005),

(ii) au contraire de tous les résidus impliqués dans le site de liaison du nickel, du cobalt et du cuivre, His38 et Glu60, résidus qui rendent la relocalisation du zinc possible, ne sont pas conservés dans les protéines de la famille de CnrX,

(iii) les sites Zn_A ne sont pas observés dans la forme contaminée zinc Se-CnrXs, faisant de cette coordination un cas isolé et,

(iiii) nous avons déjà mis en évidence un site artéfactuel dans la première partie dû à la forme tronquée de la protéine que l'on utilise.

Pour toutes ces raisons nous n'avons considéré dans l'étude structurale que le protomère B.

8.4.2 Quelles sont les bases de la sélectivité de CnrXs ?

Les sites métalliques des différentes formes de la protéine ne sont pas identiques. Ainsi, tandis que le zinc est pentacoordiné par 3 azotes et 2 oxygènes, le nickel et le cobalt recrutent en plus le soufre du seul résidu méthionine de la séquence en tant que sixième ligand. Cela modifie

totalement la géométrie du site de liaison au métal qui, de trigonale bipyramidale pour le zinc, devient octaédrique pour accueillir le nickel et le cobalt. Ces de géométriques sont en accord avec les préférences de coordination de chaque ion métallique ; le nombre de ligands de coordination pour le zinc est généralement de 4 ou 5 dans des géométries tétraédriques distordues ou trigonales bipyramidales (Auld, 2001) tandis que le nickel et le cobalt présentent principalement 6 directions de coordination dans une géométrie octaédrique (Rulísek et Vondrásek, 1998). Ces changements de géométrie contraignent la protéine à des modifications sur la position de l'hélice α_2, modifications répercutées via le coeur hydrophobe sur les hélices α_1 et α_4 induisant ainsi des dispositions différentes de la partie aminoterminale de la protéine. Grâce à l'interaction $\pi - \pi$ stabilisatrice entre les points fixes Phe66 (sur α_2) et His119 (sur α_3) ces changements sont restreints au faisceau de 4 hélices et ne sont pas transmis à l'extrémité carboxyterminale α_2 et aminoterminale de α_3.

L'exploitation de la chimie de coordination des métaux est donc, après l'affinité, la seconde composante de la sélectivité de CnrX. La géométrie du site de liaison au métal est la plupart du temps le facteur principal permettant la sélection d'un ion métallique spécifique par une protéine (Chen et He, 2008; Waldron et Robinson, 2009). Prenons l'exemple de la protéine NikR que nous avions présenté dans l'introduction. NikR n'est active qu'en présence de nickel mais elle peut lier le Cu(I) le Co(II) ou le Zn(II) avec des affinités qui suivent la série d'Irving-Williams [3]. Toutefois, chaque ion est coordiné à ses ligands par des géométries différentes : trigonale pour le Cu(I), octaédrique pour le Co(II), tétraédrique pour le Zn(II) et planaire carrée pour le nickel. Seule cette dernière géométrie conduit aux changements de conformation nécessaires à l'activation de la protéine expliquant la sélectivité restreinte de NikR (Leitch *et al.*, 2007).

Le recrutement de la chaine latérale de Met123 par l'ion métallique marque la différence entre la forme inactive (CnrXs-Zn) et la forme active de la protéine. La distance métal-soufre est également un très bon indicateur du pouvoir inducteur de la forme métallée. En effet comme on le voit sur la figure 8.4.1 plus la distance S-métal diminue (S-Cu = 2,77 Å > S-Co= 2,54 Å > S-Ni = 2,45 Å), plus le pouvoir inducteur du métal augmente (Cu<Co<Ni). Comme nous l'avons observé par la comparaison de CnrXs-Co et CnrXs-Ni, la légère différence sur la distance S-métal est amplifiée et est associée à des orientations relatives des deux protomères qui sont différentes.. Le dimère de CnrXs peut ainsi être décrit comme contracté en présence de cobalt et relaxé en présence de nickel. Si on considère l'ion nickel comme la référence pour un maximum d'induction, il apparaît que le cobalt stabilise seulement quelques caractéristiques structurales nécessaires à l'induction mais que CnrXs-Co est structuralement plus proche de CnrXs-Zn que de CnrXs-Ni.

3. $Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$

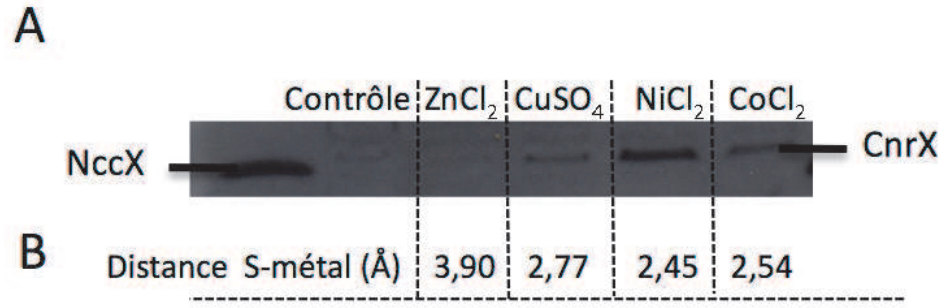


Figure 8.4.1 – Comparaison du pouvoir inducteur des différents métaux et de la distance S-métal. A : Immunodétection d'extrait totaux de cellule de C. metallidurans CH34 cultivées en présence de différents métaux (2 mM $CoCl_2$, 0,6 mM $NiCl_2$, 0,1 mM $CuSO_4$ ou 0,8 mM $ZnSO_4$ [voir section 6.1 page 105]. B Distance soufre-cation déterminée par l'analyse des structures métallées de CnrXs

8.4.3 Existent-ils des homologues de CnrXs ?

A part NccX, CnrX n'a que peu d'homologie de séquence avec des protéines caractérisées [voir introduction, section 4.2.2.3 page 70]. Toutefois, en recherchant dans la base de données structurales DALI (http ://ekhidna.biocenter. helsinki.fi/dali_server/) nous avons trouvé certaines protéines dont le repliement est semblable à celui de CnrXs [Figure 8.4.2]. D'importantes similarités structurales existent :

-Avec la famille des métallorégulateurs cytoplasmiques de type CsoR qui comprend le régulateur transcriptionnel CsoR et la protéine homologue RcnR [voir introduction, section 3.1.2 page 44]. CsoR est un métallorégulateur à cuivre dont la structure a été déterminée chez deux organismes différents (*Mycobacterium tuberculosis* (Liu *et al.*, 2007) et *Thermus thermophilus* (Sakamoto *et al.*, 2010). Sa structure tout en hélice α est très semblable à celle de CnrXs (identité de séquence 15 %, RMSD sur 74 résidus : 2,38 Å avec CsoR de *M. tuberculosis,* [PDB : 2HH7]). La protéine homologue RcnR est un métallorégulateur à nickel et à cobalt. Aucune structure de cette protéine n'est connue , mais beaucoup de résultats spectroscopiques ont été obtenus (Iwig *et al.*, 2008). CsoR coordine le Cu(I) avec trois ligands (2 résidus cystéine et 1 résidus histidine) dans une géométrie trigonale. Le nickel et le cobalt, lorsqu'ils se fixent à RcnR recrutent, en plus de ces ligands, des résidus de la région aminoterminale de la protéine afin d'être coordinés par une géométrie octaédrique. Dans le cas de ces protéines homologues, dans ce cas aussi la sélectivité des protéines est conduite par la chimie de coordination des métaux liés [voir introduction, section 3.1.2 page 44].

- Avec CpxP (identité de séquence 10 %, RMSD sur 90 résidus : 2,97 Å avec CpxP de *E. coli* [PDB : 3QZC]). CpxP est une protéine périplasmique qui contrôle l'activité de CpxA, l'histidine kinase du système à deux composants CpxAR, qui répond à divers stress d'enveloppe. CpxP a

également une fonction d'adaptateur protéolytique et facilite la dégradation de certaines protéines mal repliées (Zhou *et al.*, 2011; Thede *et al.*, 2011).

-Avec Spy (identité de séquence 6,8 %, RMSD sur 88 résidus : 2,68 Å avec Spy de *E. coli* [PDB : 3O39]) une protéine périplasmique, massivement produite dans les sphéroplastes, et pour laquelle un rôle de chaperon a été proposé récemment (Kwon *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2011).

-Avec ZraP (identité de séquence 10,5 %, RMSD sur 76 résidus : 2,06 Å avec ZraP de *E. coli* [PDB : 3LAY]) une protéine associée à la résistance au zinc. ZraP est une protéine périplasmique qui lie le métal dont l'expression est induite par HydHG (ou ZraRS) système à deux composants répondant au zinc ou au plomb (Leonhartsberger *et al.*, 2001). Chaque protomère de ZraP possède deux grandes hélices qui correspondent aux hélices α_2 et α_3 de CnrXs. Les protomères de ZraP s'assemblent en décamère pour former un tonneau.

L'analyse des structures montre des similarités frappantes dans le repliement de ces différentes protéines. La plupart, sauf ZraP, sont des protéines dimériques et toutes montrent un repliement tout en hélices alpha, avec les hélices antiparallèles repliées en épingle à cheveux. Toutes ces protéines ont un lien avec la réponse au stress chez les bactéries. Ainsi la similarité des structures pourrait pointer des fonctions périplasmiques ou cytoplasmiques communes dans la détection d'un stress quel qu'il soit. Cette hypothèse a été présentée dans une publication récente qui mettait en lumière les analogies de structure entre CnrXs, Spy, CpxP et ZraP mais sans toutefois s'intéresser à CsoR (Thede *et al.*, 2011).

8.4.4 Comment le signal est-il transmis à CnrY ?

CnrX est un modèle d'étude original par rapport aux autres métallorégulateurs car il s'agit d'un senseur périplasmique lié à la membrane et en interactions avec une (CnrY) ou plusieurs (CnrYH) protéines. Ainsi, pour étudier la transmission du signal reçu par CnrX, nous devons abandonner le domaine de recherche des métallorégulateurs pour nous pencher sur celui des voies de signalisation de type ECF. Les voies de régulation de ce type prennent en charge différents stress. Leur seul rôle connu jusqu'à présent dans l'homéostasie des métaux (hormis le rôle de résistance conféré par CnrYXH) est celui de la régulation du transport de fer par l'intermédiaire de sidérophores (systèmes Fec (Braun *et al.*, 2006), et Fpv (Beare *et al.*, 2003)) ou d'hémophores (système Has (Benevides-Matos et Biville, 2010)) dans les cas de carence cellulaire. Cette régulation fait intervenir les récepteurs du sidérophore/hémophore qui jouent aussi des rôles de senseurs et qui transmettent le signal lié à la présence de fer au facteur anti σ et au facteur σ_{ECF}. Contrairement à CnrX qui fait intervenir des protéines de petites tailles, le transport du fer est régulé par des protéines beaucoup plus imposantes (HasR de *Serratia marcescens* : 899 acide aminés (aa) / CnrX : 148 aa, HasI (anti σ) : 166 aa / CnrY : 95 aa, HasS (σ_{ECF}) : 317 aa / CnrH 191 aa). Dans tous ces systèmes d'import du fer, la transmission du signal entre le

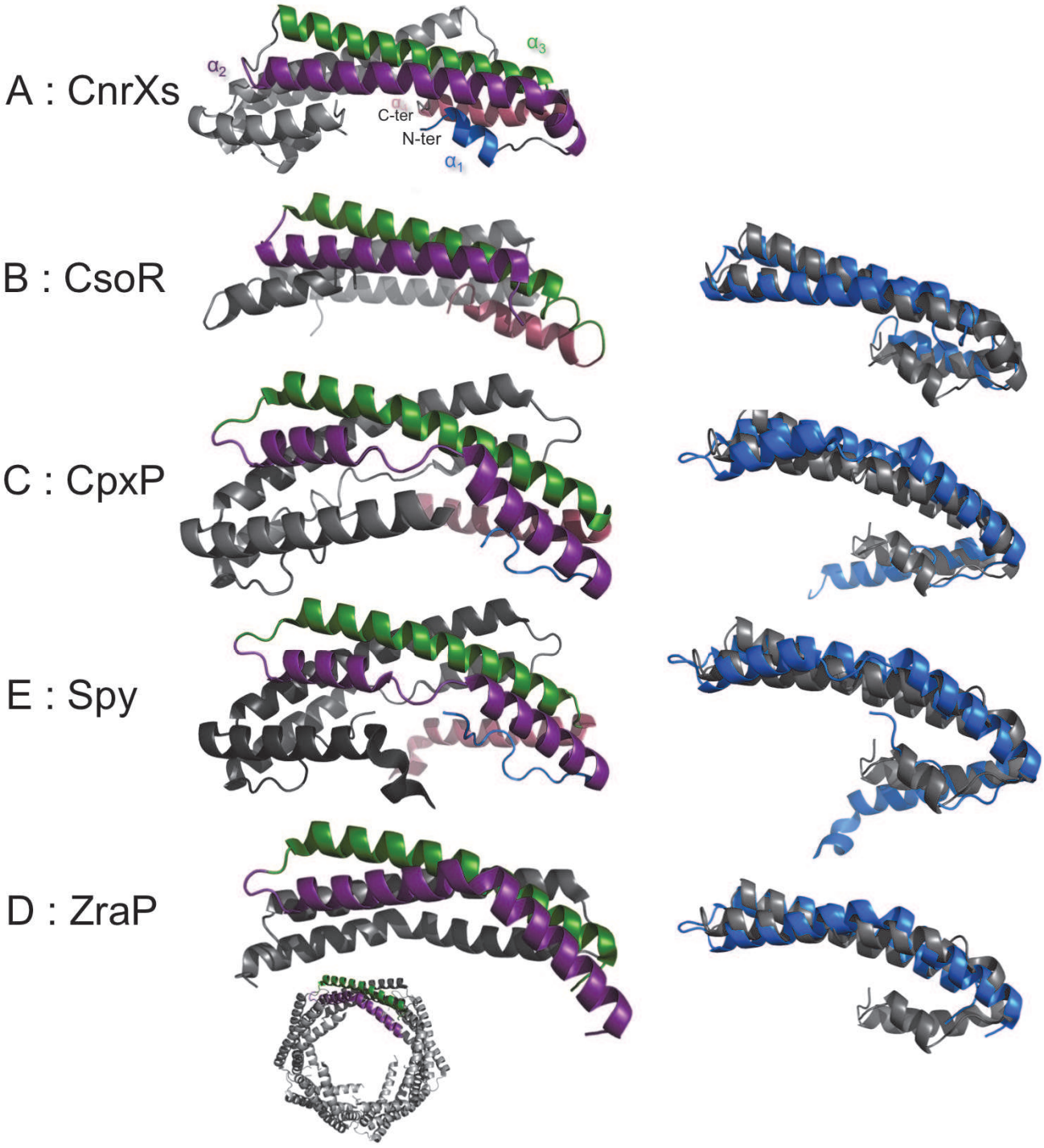


Figure 8.4.2 – Comparaison de la structure de CnrXs (A) avec CsoR (B), CpxP (C), Spy (D), ZraP (E). A gauche, la structure de chacune des protéines. Les domaines des différentes protéines sont colorées de manière à correspondre, *via* une superposition structurale, à la couleur des hélices de CnrXs. Code couleur : hélice α_1 en bleu, hélice α_2 en violet, hélice α_3 en vert, hélice α_4 en rouge. A droite, superposition de CnrXs avec les différentes protéines. Code couleur : CnrXs en gris, la protéine comparée en bleu.

senseur et le facteur anti-σ est réalisée à travers des modifications conformationnelles d'un des domaines du récepteur.

On peut donc faire l'hypothèse que les changements de conformation de CnrX induits par la liaison d'ions métalliques vont agir sur CnrY. Une interaction fonctionnelle entre CnrX et CnrY a été démontrée (Grass *et al.*, 2000)) et une interaction physique entre CnrX et CnrY a également été montrée à travers des expériences de double hybride (Grass *et al.*, 2005). Il est de ce fait possible que la propagation du signal puisse s'effectuer à travers la modulation de l'interaction entre CnrX et CnrY selon le métal détecté dans le périplasme.

Les segments transmembranaires de CnrX contiennent la séquence consensus GxxxG qui est connue pour intervenir dans les interactions entre des hélices transmembranaires (Senes *et al.*, 2004) [voir introduction, section 4.2.2.3 page 70]. Ce motif avec 2 résidus glycine séparés par 3 acides aminés forme une surface plane sur une face de l'hélice. Cet arrangement permet aux deux hélices de se rapprocher. L'association est aussi favorisée par des interactions entre les paires de résidus voisins du motif, à travers des liaisons entre les hydrogènes des C^{α} d'une des hélices et les atomes d'oxygène de l'autre (Melnyk *et al.*, 2004). Donc, même si les séquences aminoterminales de CnrXs ne sont pas observées, on peut imaginer qu'elles convergent pour construire un domaine transmembranaire avec les deux hélices qui se croisent dans la membrane. On visualise bien ainsi comment l'interface dimérique est distribuée entre la membrane et le domaine périplasmique [Figure 8.4.3].

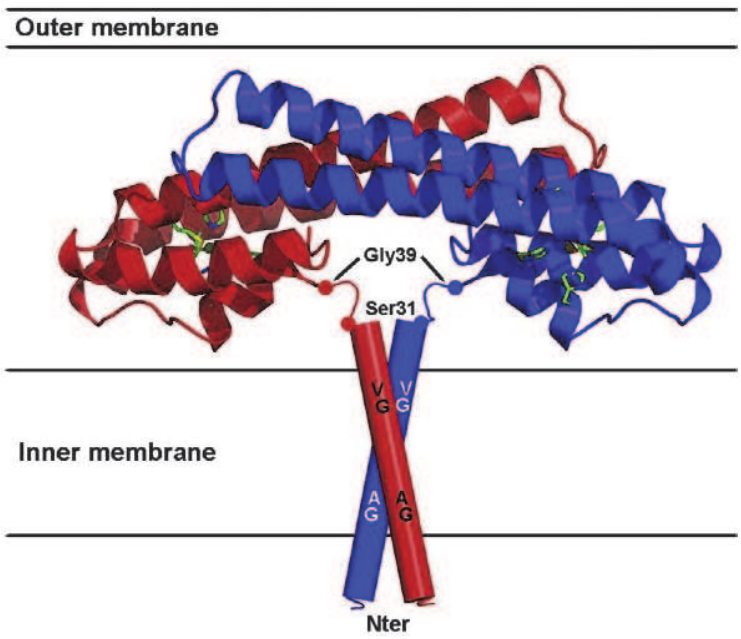


Figure 8.4.3 – Modèle de la protéine membranaire CnrX. Gly39 est le premier acide aminé défini structurallement de CnrXs dont la séquence commence à Ser31.

L'interaction entre CnrX et CnrY peut impliquer les domaines périplasmiques des deux protéines et/ou leurs hélices transmembranaires.

(i) Si on considère une interaction membranaire, il est facilement envisageable que les hélices transmembranaires de CnrY soient sensibles aux mouvements α_1 de CnrXs probablement transmis au domaine membranaire de CnrX.

(ii) Si on considère une interaction périplasmique, on peut présumer que la partie périplasmique hydrophobe de CnrY (20 acides aminées hydrophobes sur 31) pourrait interagir avec la cavité hydrophobe de CnrXs. Les changements conformationnels liés à la détection du métal affecteraient cette cavité et modifieraient les interactions entre CnrX et CnrY menant à la libération de CnrH.

Cette analyse structurale qui nous a permis de caractériser les bases moléculaires de la perception du stress métallique par CnrX ouvre maintenant la voie à d'autres études visant à comprendre le mécanisme de transduction du signal entre CnrX et CnrY.

Quatrième partie

Conclusions et perspectives

Toute réponse adaptative repose sur le couplage d'un système de détection à la mise en place des effecteurs appropriés. Chez les bactéries, elle repose le plus souvent sur le déclenchement de la transcription d'un certain nombre de gènes codant pour des protéines plus ou moins impliquées dans la gestion du stress ressenti. Quand la réponse à un stress environnemental perçu au niveau de l'enveloppe est associée à une réponse transcriptionnelle appropriée, cela signifie que l'information sur la qualité et l'intensité de ce stress a été transférée à la cellule avant que son intégrité soit perturbée. L'initiation de la transcription des gènes bactériens dépend de protéines appelées des facteurs sigma (σ) qui s'associent au cœur catalytique de l'ARN polymérase et confèrent à l'holoenzyme ainsi formée la capacité de reconnaître des promoteurs donnés. Les facteurs σ qui régulent la réponse de la bactérie à un stimulus provenant de l'environnement constituent un groupe large et hétérogène qui est désigné comme le type ECF (Extracytoplasmic Function). Les facteurs sigma de type ECF ont été reconnus récemment comme un des mécanismes majeurs de transduction du signal chez les bactéries (Staroń *et al.*, 2009). La régulation de l'activité des facteurs σ de type ECF a lieu la plupart du temps au niveau de la membrane. Au repos, chaque facteur σ_{ECF} est séquestré par un partenaire appelé facteur anti-σ. Le dispositif est complété par un senseur dont la conformation ou l'activité est sensible à un facteur de stress donné.

Chez *Cupriavidus metallidurans* CH34, la réponse au stress causé par les cations métalliques Co(II) et Ni(II) est codée par les gènes *cnrYXH* et *cnrCBA*. La résistance proprement dite repose sur l'extraction du métal par la pompe à efflux CnrCBA, dont la production est régulée par les produits des gènes *cnrYXH*. Notre groupe étudie la voie de signalisation transmembranaire CnrYXH qui contrôle donc la réponse à ce stress. En l'absence de stress, CnrH, un facteur σ_{ECF}, est séquestré à la membrane par le complexe membranaire CnrXY. La fixation du métal sur CnrX conduit CnrY à relâcher CnrH qui s'associe à l'ARN polymérase, lui donnant ainsi la capacité de se lier aux promoteurs des gènes *cnrY* et *cnrC*.

Dans le cadre de cette thèse nous avons voulu caractériser l'étape initiale de la signalisation, à savoir la phase de déclenchement du signal et comprendre ainsi comment des événements localisés à la membrane cytoplasmique, c'est-à-dire la fixation du métal sur CnrX, pouvait moduler la séquestration de CnrH par le complexe CnrXY. Cette question principale regroupe plusieurs interrogations : comment les métaux sont détectés par CnrX ? par quel(s) mécanisme(s) la résistance induite par ce système est restreinte au cobalt et au nickel ? Quelle est la nature du signal transmis aux autres protéines de la chaîne de régulation ? Les études biochimiques, spectroscopiques et structurales que nous avons menées sur la protéine CnrXs pendant 3 ans nous ont permis de répondre à ces questions.

Nous avons dans une première partie confirmé que le nickel, le cobalt et même le cuivre étaient capables d'induire une réponse biologique tandis que le zinc n'avait pas cette capacité. Ainsi, comme on pouvait le pressentir, CnrX ne détecte pas tous les métaux de la même manière

et cette étape préliminaire d'étude *in vivo* a formé la base de notre réflexion sur la sélectivité de CnrXs ; c'est à dire la manière dont la nature du métal influe sur la réponse biologique.

Dans une seconde partie nous avons caractérisé les sites de liaison au métal du domaine senseur de CnrX, CnrXs. Seulement deux des quatre sites caractérisés par les méthodes de spectroscopie sont retrouvés dans la protéine entière. Nous avons produit un mutant de CnrXs ne possédant que ces deux sites. Ceux-ci sont totalement identiques à ceux de la protéine membranaire. La protéine mutée soluble est donc un modèle spectroscopique parfait de la protéine entière.

Dans une troisième partie nous avons étudié l'effet des différents métaux sur la structure de CnrXs, mettant ainsi en lumière la nature du signal transmis par CnrXs ainsi que les bases moléculaires de la sélectivité de la protéine pour le nickel et le cobalt. La protéine en absence de stress est liée au zinc qui est un des métaux les plus présents dans le périplasme. L'ion zinc est coordiné dans la protéine par 3 azotes et 2 oxygènes. Au-delà d'un seuil de certain seuil de concentration des ions Ni^{2+} et/ou Co^{2+}, ces ions chassent le zinc de la protéine. En effet, l'affinité de la protéine pour le nickel et le cobalt étant très forte (de l'ordre du nM), dès qu'ils accèdent au périplasme de la cellule, ils vont interagir avec CnrX. L'affinité est donc la première composante de la sélectivité de CnrX. Lorsque le nickel et le cobalt se fixent à la protéine ils recrutent le soufre de Met123 comme sixième ligand, induisant un changement considérable dans la géométrie du site métallique (bipyramidal/octaédrique) qui fait évoluer la structure de la protéine vers une conformation active. La chimie de coordination de l'ion métallique est ainsi la deuxième composante de la sélectivité de CnrX. De plus nous avons mis en évidence que la distance soufre-métal était corrélée au pouvoir inducteur de la forme métallée. De ce fait la distance soufre-métal semble être le troisième paramètre, il peut être qualifié de paramètre de sélectivité fonctionnelle de CnrX.

Met123 est donc l'élément clé de la régulation : il joue le rôle d'interrupteur moléculaire et de modulateur de la réponse biologique. Afin d'aller plus loin dans cette hypothèse et comprendre le rôle exact de ce résidu clé nous avons voulu étudier les effets de son absence par mutation. Pour cela nous avons produit et purifié les protéines CnrXs-M123A et CnrXs-H32A-M123A que nous avons caractérisées par différentes méthodes. Le double mutant CnrXs-H32A-M123A a été utilisé dans les expériences de spectroscopie car il ne contient que le site F. Les résultats sont présentés en conclusion du manuscrit car ils ne sont que préliminaires.

Chapitre 9

Rôle de Met123

9.1 Est-ce que Met123 est un résidu essentiel pour la liaison du métal *in vitro* ?

9.1.1 Titrage de CnrXs-H32A-M123A par le cobalt suivi par spectroscopie UV-visible

Lorsque nous ajoutons du cobalt dans une solution de CnrXs-H32A-M123A, le spectre UV-visible montre une bande d'absorption principale à 540 nm ($\varepsilon_{540nm} = 80$ $M^{-1}.cm^{-1}$) [Figure 9.1.1]. Le signal sature après l'ajout de 2 équivalents de cobalt par dimère de protéine. La longueur d'onde d'absorption et l'intensité du signal obtenu laisse donc envisager que le site métallé serait de coordination penta ou octaédrique. La protéine semble donc toujours lier le cobalt malgré l'absence de la méthionine. Ce spectre toutefois, est très différent de celui de CnrXs-H32A par sa longueur d'onde maximale d'absorption (495 nm contre 540 nm), mais aussi par son allure générale indiquant que la mutation a un effet considérable sur la sphère de coordination du cobalt dans la protéine.

9.1.2 Analyse RPE de la CnrXs-H32A-M123A métallée cobalt

Le spectre RPE de la protéine CnrXs-H32A-M123A métallée par 2 équivalents de cobalt est caractéristique d'un Co(II) haut spin [Figure 9.1.2]. Son allure est semblable à celle du spectre du cobalt dans le tampon ou de CnrXs-E63Q enregistré sous anaérobiose avec une raie à bas champs sans rhombicité ni structure d'hyperfin. Ainsi, nous ne pouvons pas conclure par cette expérience que le cobalt se lie à la protéine. Toutefois s'il s'y fixe cela pourrait être dans la même coordination que le cobalt du site S : liaison de 5 ou 6 ligands dont au moins une molécule d'eau dans une géométrie peu contrainte.

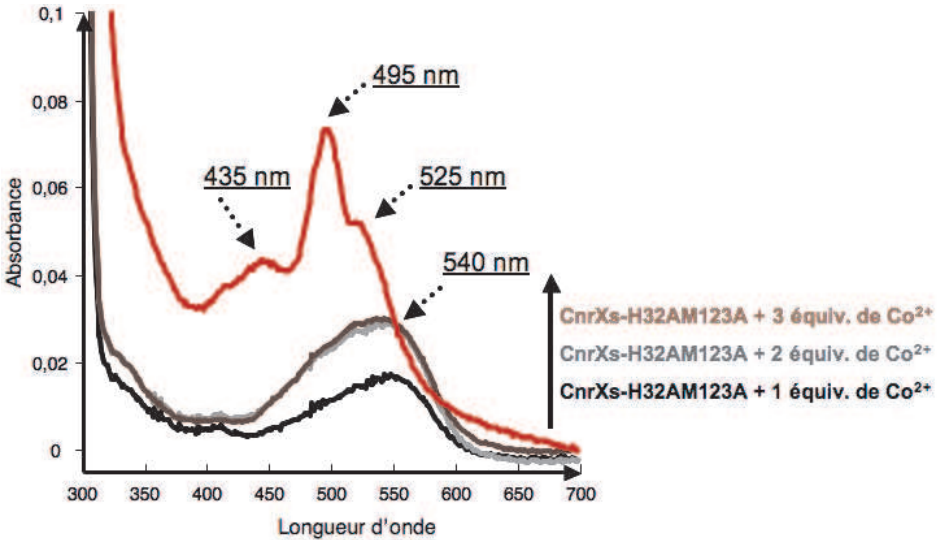


Figure 9.1.1 – Spectres d'absorption UV-visible de CnrXs-H32A-M123A à 198 μM sans métal (apo) et en présence de concentrations croissantes de cobalt. Le spectre de la protéine CnrXs-H32A [530 μM] métallée par 2 équivalents de cobalt est montré en comparaison (spectre rouge). Condition : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$

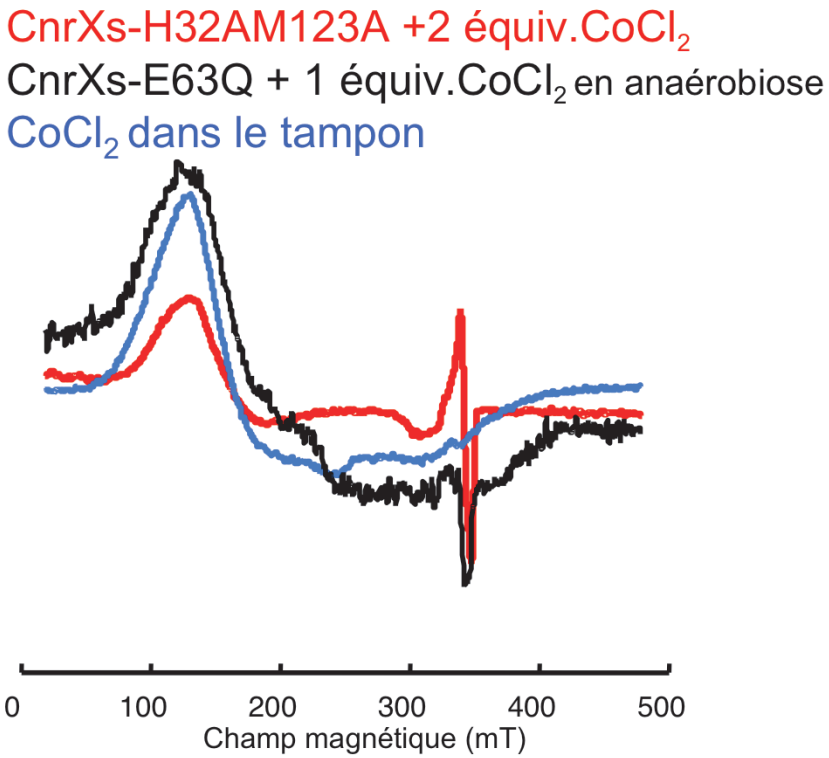


Figure 9.1.2 – Analyse par RPE en bande X de la liaison du cobalt à CnrXs-H32A-M123A (355μM). Les spectres de la forme métallée sous anaérobiose de CnrXs-E63Q (en noir, 470 μM) et du $CoCl_2$ dans le tampon (en bleu, 485 μM) sont indiqués à titre de comparaison. Le signal marqué d'une astérisque marque la présence d'une contamination dans la cavité RPE. Conditions : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Sel métallique $CoCl_2$.

9.1.3 Analyse XAS de CnrXs-H32A-M123A métallée cobalt

9.1.3.1 Partie XANES

Le XANES de CnrXs-H32AM123A métallée par 2 ions cobalt (CnrXs-H32A-M123A-Co) présente un pic au niveau du pré-seuil, vers 7710 eV, de même amplitude que celui des formes métallées CnrXs-H32A et NccX indiquant que le cobalt n'est pas en coordination tétraédrique [Figure 9.1.3-A]. Le seuil d'absorption est aussi situé au même endroit pour les 3 protéines signifiant que seul du Co(II) est présent dans l'échantillon.

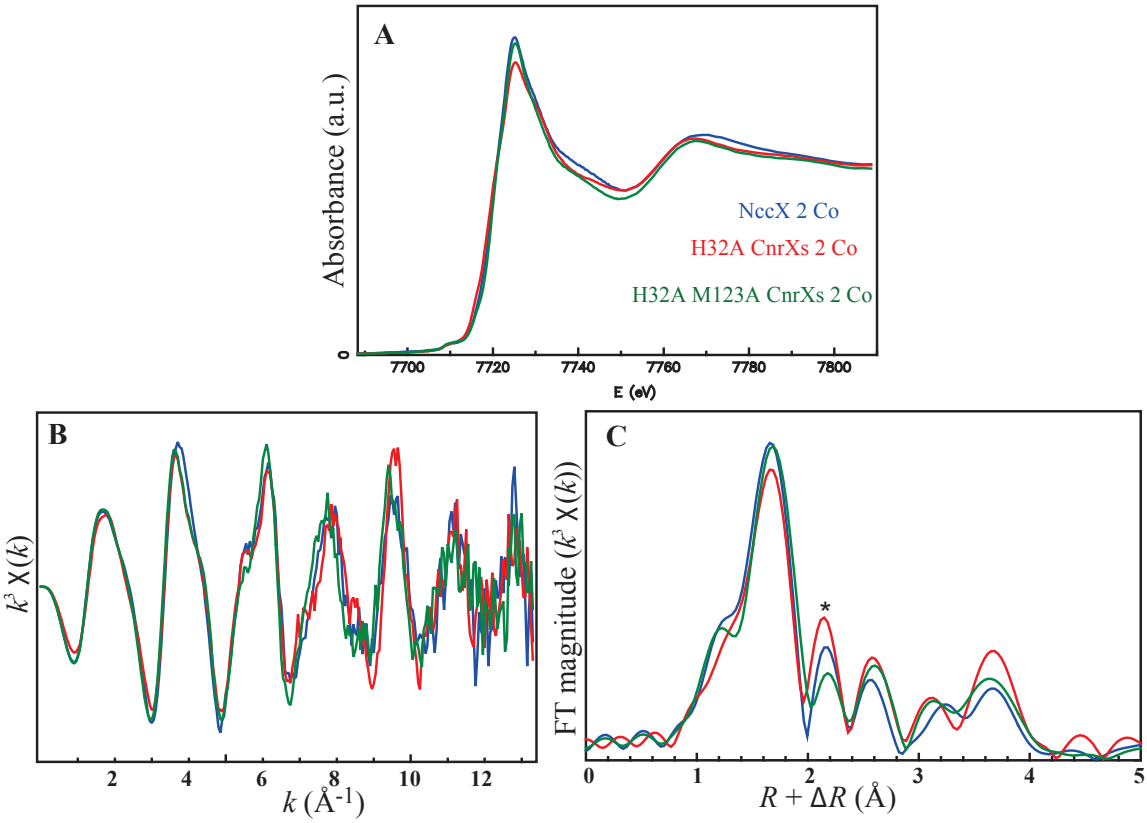


Figure 9.1.3 – Spectres XANES et EXAFS au seuil K du cobalt pour la protéine CnrXs-H32AM123A-Co. Les spectres de CnrXs-H32A et NccX métallées par 2 ions cobalt sont montrés en comparaison. A : Spectres XANES B : Spectres EXAFS C : Module des transformées de Fourier des spectres EXAFS. Le pic correspondant à la position du soufre dans la première couche de coordination est indiqué par un astérisque.

9.1.4 Partie EXAFS

Le spectre EXAFS de CnrXs-H32A-M123A-Co est proche de ceux des formes métallées de NccX et de CnrXs-H32A [Figure 9.1.3-B et C]. On confirme donc qu'en absence de méthionine le cobalt se fixe dans un site similaire au site F. L'amplitude du pic S (identifié par un astérisque sur la figure) est plus faible que dans les deux autres protéines. Il n'est cependant pas inexistant, car ce pic contient non seulement la contribution du soufre mais aussi des lobes secondaires du

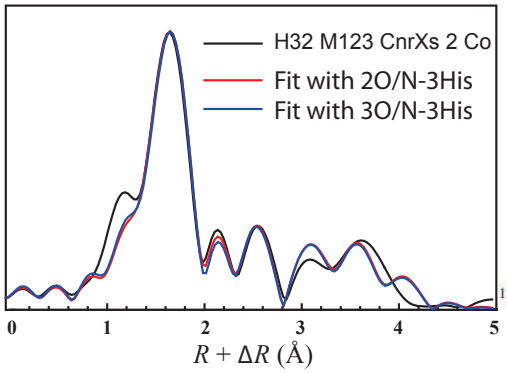
pic O/N à $R + \Delta R$ = 1,6 Å. L'amplitude des pics de diffusion multiple (à $R + \Delta R$ = 3-4Å) qui caractérise le nombre des ligands histidines est similaire pour CnrXs-H32A-M123A-Co et NccX-Co. Trois résidus histidines maximum sont donc ligands de l'ion cobalt dans la protéine CnrXs-H32A-M123A.

Par différentes simulations nous avons montrer que la première couche de coordination du Co(II) dans le site de CnrXs-H32A-M123A pouvait contenir 3His-2O/N ou 3His-3O/N [Figure 9.1.4]. Deux éléments nous indiquent toutefois que le cobalt serait plutôt dans une coordination octaédrique :

(i) Une étude des structures de complexes de Co(II) dans la CSD montre que la coordinence 6 est la plus fréquente [1]

(ii) Les distances His-Co et O/N-Co obtenues après affinement sont de 2,11 et 2,14 Å. Or, il existe une corrélation entre ces distances atome-métal et le nombre de coordinations de l'ion métallique. D'après le graphique 9.1.5 les distances entre 2,11 et 2,14 Å correpondraient plus à des sites octaédriques que pentaédriques.

Ainsi d'après ces données et malgré l'absence de Met123, il semble que le cobalt soit toujours lié dans un site similaire au site F avec 3 atomes d'azote (provenant certainement de His42, His46 et His199) et 2 atomes d'oxygène (du Glu63). Un sixième ligand remplace l'atome de soufre ; il s'agit soit d'un oxygène qui pourrait provenir d'un carboxylate ou d'une molécule d'eau soit d'un azote provenant de la chaîne carbonnée par exemple.



	Atom	N	R (Å)	σ² (Å²)	R factor
H32M123 CnrXs 2Co	His[1]	3*	2.11	0.009	9.7 ′ 10⁻⁴
	O/N	2*	2.14	0.003	
H32M123 CnrXs 2Co	His[1]	3*	2.11	0.011	9.1 ′ 10⁻⁴
	O/N	3*	2.14	0.004	

[1] Including multiple scattering within the imidazole ring. * Fixed values.

Figure 9.1.4 – Structure du site de liaison au cobalt de CnrXs-H32A-M123A. A gauche, simulation du module de la transformée de Fourier du spectre EXAFS de CnrXsH32A-M123A par différents types de coordinations. A droite, environnement structural du cobalt dans CnrXs-H32A-M123A obtenu après l'analyse des données EXAFS. N : Nombre d'atomes, R : distance inter-atomique, σ^2 : facteur Debye Waller, facteur R : résiduel entre la simulation et l'expérience.

9.1.5 Analyse de la structure de CnrXs-M123A métallée nickel

Nous avons ensuite déterminé la structure de CnrXs-M123A métallée par 4 équivalents de nickel (CnrXs-M123A-Ni) par cristallographie aux rayons X. Il n'était pas nécessaire d'utiliser le

1. On trouve 161 structures avec Co-2N/2O, 84 avec Co-3N/2O, 170 avec Co-3N/3O et 428 avec Co-4N/2O.

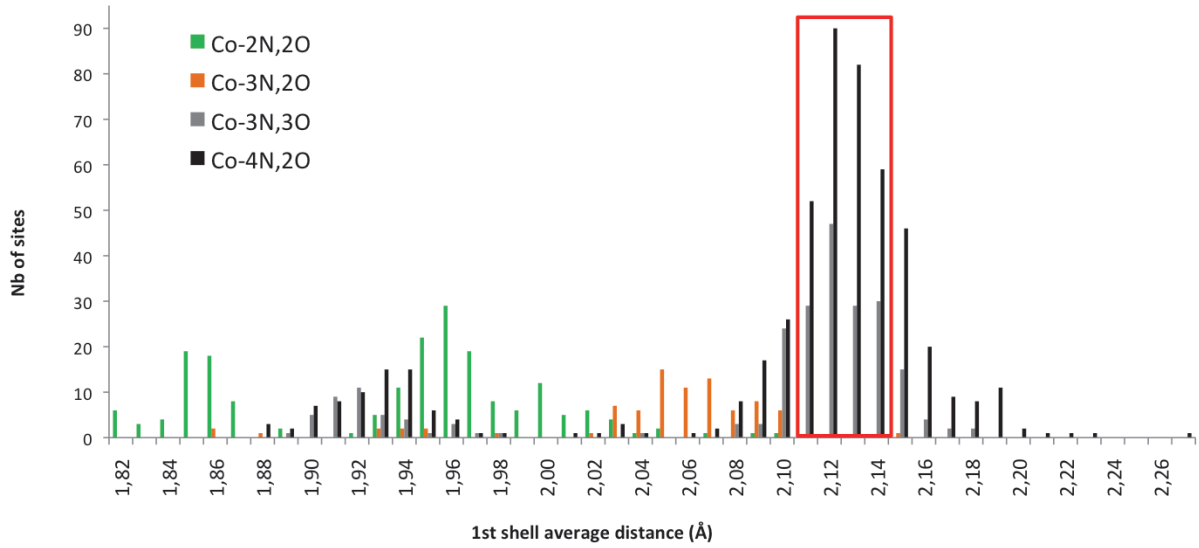


Figure 9.1.5 – Distances ligand-cobalt en fonction de la coordination du cobalt dans les complexes de la CSD. Il y a une corrélation claire entre ces deux paramètres. Les distances entre 2,11 Å et 2,14 Å (cadre rouge) correspondent à des complexes de cobalt octaédriques (3N/3O ou 4N/2O)

double mutant CnrXs-H32A-M123A pour cette expérience, puisque le site S n'est pas observable dans les structures. La structure a été résolue à 2,1 Å. L'unité asymétrique est composée de deux dimères de protéine. Le monomère B est le monomère le mieux résolu.

Nous sommes très loin d'avoir analysé la structure en détail. Les résultats que j'apporte ici sont uniquement préliminaires. Des études plus poussées sur la comparaison des structures avec les formes métallées sont en cours.

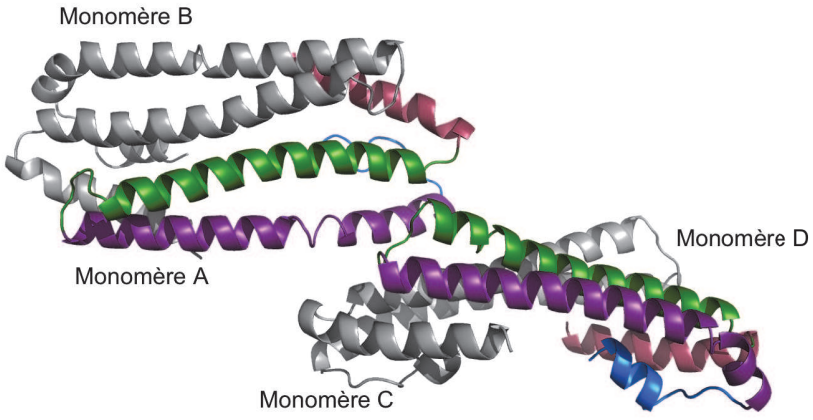


Figure 9.1.6 – Structure de CnrXs-H32AM123A-Ni

Le taux d'occupation du nickel n'est pas égal pour tous les monomères (monomère A : 50%, monomère B : 100%, monomère C : 50%, monomère D : 80%). Selon les monomères observés les ligands du métal et les distances métal-ligands sont différents [Figure 9.1]. Le nickel est dans

une coordination octaédrique dans le monomère B et le monomère D tandis que seuls 3 ligands dans le monomère A et 4 ligands dans le monomère C sont visibles. Quelque soit la géométrie du site de liaison, les résidus ligands du nickel ont déjà été caractérisés comme tels dans la protéine sauvage. Aucun site supplémentaire n'a donc été observé dans cette étude. Dans le cas où le nickel présente 6 directions de coordination, la méthionine est remplacée par une molécule d'eau, en accord avec les données EXAFS. Toutefois, la comparaison s'arrête là puisque les distances ligands-métal sont très différentes dans les deux expériences. En effet, la moyenne des distances trouvée par l'analyse cristallographique entre His-Ni et O-Ni est de 2,44 et de 2,57 Å contre 2,10 et 2,13 Å pour les distances His-Co et O-Co déterminée par l'EXAFS. La nature du métal présent dans le site métallique peut affecter ces distances qui ne sont donc pas immédiatement comparables.

Malgré ces différences nous pouvons conclure qu'en absence de Met123, le nickel et le cobalt sont toujours capables de se lier au site F. Il est probable que ces deux ions soient en coordination octaédrique, avec le soufre remplacé par une molécule d'eau. Pour confirmer ces données il serait utile de résoudre la structure de CnrXs-M123A en très fort excès de nickel afin d'obtenir des sites métalliques homogènes et donc plus informatifs.

	CnrXs-M123A-Ni				CnrXs-Ni	EXAFS * CnrXs-H32A M123A
	Monomère					
	A	B	C	D		
His42	----	1.98	2.26	2.28	2.10	
His46	----	2.14	----	2.40	2.12	2.10
His119	2.79	3.41	2.67	2.11	2.16	
Glu63O1	2.04	1.95	1.83	2.23	2.20	
Glu63O2	3.68	2.48	3.54	3.06	2.23	2.13
Met or H_2O		2.24		2.66	2.45	
F66-H119	3.86	3.73	3.84	3.35	3.59	

*L'EXAFS a été enregistré sur un échantillon de CnrXs-H32AM123A métallée par 2 équivalents de **cobalt**

Tableau 9.1 – Tableau des distances métal-ligands déterminées par l'analyse de la structure de CnrXs-M123A-Ni, de CnrXs-Ni et par l'analyse des données EXAFS de CnrXs-H32AM123A-Co.

9.2 Est ce que Met123 est indispensable à la fonction de la protéine *in vivo* ?

D'après nos résultats préliminaires, Met123 n'est pas indispensable à la liaison du métal. Ces données ne sont pas incompatibles avec notre hypothèse de départ puisqu'il est tout à fait imaginable que ce résidu influence la régulation sans être un ligand obligatoire du métal. En effet, son rôle crucial d'interrupteur moléculaire n'est pas nécessaire pour que CnrX coordine le métal mais bien pour que la protéine sélectionne le bon métal et transmette l'information de la perception du stress. Nous collaborons avec l'équipe de D. Nies et C. Grosse (Laboratoire de microbiologie moléculaire, Université de Halle, Allemagne) afin de caractériser *in vivo* différents mutants de CnrX dont CnrXs-M123A. Le but est d'utiliser une souche de CH34 mutée dans le gène de CnrX pour étudier par des techniques de génétique moléculaire [voir introduction, section 4.2.1 page 63] le rôle de tel ou tel résidu. Pour cela il est prévu qu'ils construisent le mutant $cnrYX_{M123A}H$ et qu'ils comparent les CMI [2] de différents métaux pour la bactérie sauvage et la bactérie qui contient la protéine mutée. Parallèlement, ils vont vérifier par immunodétection la production de la protéine CnrX grâce aux anticorps que nous leur avons fournis. Cette expérience complémentaire permet de lier les variations de résistance aux métaux avec la production de CnrX et donc l'activité de la voie de signalisation Cnr. Cette collaboration en est à son début et les expériences sont toujours en cours.

2. Concentration Minimale Inhibitrice

Chapitre 10

Autres perspectives

Notre groupe étudie la voie de signalisation transmembranaire CnrYXH qui contrôle la réponse au cobalt et au nickel chez *C. metallidurans* CH34. Par cette étude nous avons posé les bases moléculaires de la perception du stress métallique par le domaine senseur de CnrX. Cette analyse structurale et spectroscopique ouvre maintenant la voie à d'autres études visant à comprendre le mécanisme de transmission du signal entre CnrX et CnrY.

La caractérisation des protéines membranaires NccX et CnrX ne fait que débuter, mais il serait remarquable de comprendre comment la liaison du métal dans la partie périplasmique joue sur les hélices transmembranaires. Pour cela, l'obtention des structures cristallines serait un outil de choix. Toutefois, il est évident que la purification, la cristallisation et la résolution de structures de protéines membranaires forment un projet ambitieux. Nous avons purifié NccX et réussi à obtenir des cristaux de NccX diffractant à 3,5 Å. La résolution de la structure nous apportera des informations essentielles sur les hélices transmembranaires et l'interface de dimérisation dans la membrane.

L'étude des interactions entre CnrX et CnrY est un projet qui découle directement des résultats obtenus pendant cette thèse. Des expériences de co-purification des parties périplasmiques de CnrX et de CnrY ont débuté pour évaluer si ces deux domaines peuvent interagir et si leur association est régulée par la liaison des métaux sur CnrXs. A plus long terme, la co-cristallisation des deux molécules avec différents métaux peut être envisageable pour connaître les détails structuraux de la modulation de cette interaction par les ions.

Les bases moléculaires de l'interaction entre un facteur σ et de son facteur anti-σ ont déjà été décrites à plusieurs reprises (SpoIIAB :σ_F (Campbell *et al.*, 2002), RseA :σ_E(Campbell *et al.*, 2003), FlgM :σ_{28}(Sorenson *et al.*, 2004), ChrR :σ_E (Campbell *et al.*, 2007b)). Il s'agit pour nous de compléter les observations rapportées dans ces études, en travaillant sur l'interaction entre le facteur anti-σ CnrY qui ne présente d'homologie avec aucune protéine connue et le facteur σ associé CnrH. Par des études biochimiques et cristallographiques nous voulons comparer la structure du complexe CnrH :CnrY avec les complexes déjà caractérisés pour illustrer la

variété des situations rencontrées et mettre en évidence des principes communs qui gouvernent l'inhibition d'un facteur σ par son facteur anti-σ.

Le projet *cnr* est essentiellement à finalité fondamentale. Cependant des pistes de valorisations potentielles existent.

Les bactéries résistant à de fortes concentrations de métaux lourds sont volontiers enrôlées dans des projets de biorémédiation ou des systèmes de dosage environnemental, les biosenseurs pouvant être cellulaires ou non. La contribution de cette thèse aux connaissances sur la sélectivité et les résultats futurs du groupe sur les mécanismes de transduction de signal transmembranaire, pourraient permettre de modifier les domaines senseurs et effecteurs avec pour conséquence par exemple, la conception de senseurs spécifiques à certains métaux.

Par ailleurs, la caractérisation de la réponse de CH34 au stress par le nickel/cobalt concerne des mécanismes plus généraux qui sont aussi à l'œuvre dans la virulence bactérienne. Celle-ci doit parfois être considérée comme la réponse de la bactérie à son agresseur. CnrH appartient à la famille des facteurs σ_{ECF} comportant entre autres σ_E et PvdS (voir introduction, section 3.3 page 51]. σ_E joue un rôle central dans la virulence de certains pathogènes (dont *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Vibrio cholerae*) en protégeant la bactérie des défenses de l'hôte lui permettant ainsi de s'adapter aux conditions de vie dans l'organisme colonisé (Raivio, 2005). De même, PvdS activé par la présence de sidérophore dans le milieu permet la transcription de facteur de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* (Beare *et al.*, 2003).

L'étude du mécanisme de détection des métaux par CnrX et de la transmission du signal contribueront ainsi à faire progresser d'autres domaines d'investigation en rapport avec la transduction du signal à travers la membrane cytoplasmique.

Bibliographie

Ades, S., Connolly, L., Alba, B., et Gross, C. (1999) The Escherichia coli ςE-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-ς factor. *Genes & development* **13** : 2449.

Ades, S. E. (2004) Control of the alternative sigma factor sigmaE in Escherichia coli. *Curr Opin Microbiol* **7** : 157–62.

Ahn, B.-E., Cha, J., Lee, E.-J., Han, A.-R., Thompson, C. J., et Roe, J.-H. (2006) Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in Streptomyces coelicolor. *Mol Microbiol* **59** : 1848–58.

An, Y. J., Ahn, B.-E., Han, A.-R., Kim, H.-M., Chung, K. M., Shin, J.-H., Cho, Y.-B., Roe, J.-H., et Cha, S.-S. (2009) Structural basis for the specialization of Nur, a nickel-specific Fur homolog, in metal sensing and DNA recognition. *Nucleic Acids Res* **37** : 3442–51.

Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L., et Thornton, J. M. (2008) Metal ions in biological catalysis : from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* **13** : 1205–18.

Angerer, A. et Braun, V. (1998) Iron regulates transcription of the Escherichia coli ferric citrate transport genes directly and through the transcription initiation proteins. *Arch Microbiol* **169** : 483–490.

Anton, A., Grosse, C., Reissmann, J., Pribyl, T., et Nies, D. H. (1999) CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in Ralstonia sp. strain CH34. *J Bacteriol* **181** : 6876–81.

Argüello, J. M., Eren, E., et González-Guerrero, M. (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals* **20** : 233–48.

Atkins, P. et Jones, L. (1997) Chemistry : molecules, matter, and change, vol. 3. WH Freeman and Company New York.

Auld, D. (2001) Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* **14** : 271–313.

Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., et Miller, S. I. (2005) Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122** : 461–72.

Bahlawane, C., Dian, C., Muller, C., Round, A., Fauquant, C., Schauer, K., de Reuse, H., Terradot, L., et Michaud-Soret, I. (2010) Structural and mechanistic insights into Helicobacter pylori NikR activation. *Nucleic Acids Res* **38** : 3106–18.

Banci, L., Bencini, A., Benelli, C., Gatteschi, D., et Zanchini, C. (1982) Spectral-structural correlations in high-spin cobalt (II) complexes. *Structures versus Special Properties* : 37–86.

Banci, L., Bertini, I., Del Conte, R., Markey, J., et Ruiz-Dueñas, F. J. (2001) Copper trafficking : the solution structure of Bacillus subtilis CopZ. *Biochemistry* **40** : 15660–8.

Beare, P. A., For, R. J., Martin, L. W., et Lamont, I. L. (2003) Siderophore-mediated cell signalling in Pseudomonas aeruginosa : divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol Microbiol* **47** : 195–207.

Bearson, B. L., Wilson, L., et Foster, J. W. (1998) A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects Salmonella typhimurium against inorganic acid stress. *J Bacteriol* **180** : 2409–17.

Benevides-Matos, N. et Biville, F. (2010) The Hem and Has haem uptake systems in Serratia marcescens. *Microbiology* **156** : 1749–57.

Benevides-Matos, N., Wandersman, C., et Biville, F. (2008) HasB, the Serratia marcescens TonB paralog, is specific to HasR. *J Bacteriol* **190** : 21–27.

Bennett, B. (2002) EPR of Co(II) as a structural and mechanistic probe of metalloprotein active sites : characterisation of an aminopeptidase. *Curr Top Biophys* **26** : 49–57.

Bertini, I., Gray, H., Lippard, S., et Valentine, J. (1994) Bioinorganic chemistry. University science books.

Bloom, S. L. et Zamble, D. B. (2004) Metal-selective DNA-binding response of Escherichia coli NikR. *Biochemistry* **43** : 10029–38.

Bogel, G., Schrempf, H., et Ortiz de Orué Lucana, D. (2009) The heme-binding protein HbpS regulates the activity of the Streptomyces reticuli iron-sensing histidine kinase SenS in a redox-dependent manner. *Amino Acids* **37** : 681–91.

Borremans, B., Hobman, J. L., Provoost, A., Brown, N. L., et van Der Lelie, D. (2001) Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of Ralstonia metallidurans CH34. *J Bacteriol* **183** : 5651–8.

Braun, V. (1997) Surface signaling : novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. *Arch Microbiol* **167** : 325–331.

Braun, V., Mahren, S., et Sauter, A. (2006) Gene regulation by transmembrane signaling. *Biometals* **19** : 103–13.

Breece, R. M., Costello, A., Bennett, B., Sigdel, T. K., Matthews, M. L., Tierney, D. L., et Crowder, M. W. (2005) A five-coordinate metal center in Co(II)-substituted VanX. *J Biol Chem* **280** : 11074–81.

Brennan, B., Alms, G., Nelson, M., Durney, L., et Scarrow, R. (1996) Nitrile hydratase from Rhodococcus rhodochrous J1 contains a non-corrin cobalt ion with two sulfur ligands. *J Am Chem Soc* **118** : 9194–9195.

Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A., et Bouloc, P. (2009) Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in Escherichia coli. *PLoS Genetics* **5** : e1000651.

Busenlehner, L. S., Pennella, M. A., et Giedroc, D. P. (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors : Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **27** : 131–43.

Cabiscol, E., Tamarit, J., et Ros, J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3** : 3–8.

Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrysperre, W., et De Bruyne, C. (1988a) Xylose isomerase from Streptomyces violaceoruber : Structural and catalytic roles of bivalent metal ions. *Enzyme and microbial technology* **10** : 695–700.

Callens, M., Tomme, P., Kersters-Hilderson, H., Cornelis, R., Vangrysperre, W., et De Bruyne, C. K. (1988b) Metal ion binding to D-xylose isomerase from Streptomyces violaceoruber. *Biochem J* **250** : 285–90.

Campbell, D. R., Chapman, K. E., Waldron, K. J., Tottey, S., Kendall, S., Cavallaro, G., Andreini, C., Hinds, J., Stoker, N. G., Robinson, N. J., et Cavet, J. S. (2007a) Mycobacterial cells have dual nickel-cobalt sensors : sequence relationships and metal sites of metal-responsive repressors are not congruent. *J Biol Chem* **282** : 32298–310.

Campbell, E., Greenwell, R., Anthony, J., Wang, S., Lim, L., Das, K., Sofia, H., Donohue, T., et Darst, S. (2007b) A conserved structural module regulates transcriptional responses to diverse stress signals in bacteria. *Molecular cell* **27** : 793–805.

Campbell, E., Masuda, S., Sun, J., Muzzin, O., Olson, C., Wang, S., et Darst, S. (2002) Crystal structure of the Bacillus stearothermophilus anti-[sigma] factor SpoIIAB with the sporulation [sigma] factor [sigma] F. *Cell* **108** : 795–807.

Campbell, E., Tupy, J., Gruber, T., Wang, S., Sharp, M., Gross, C., et Darst, S. (2003) Crystal structure of Escherichia coli [sigma] E with the cytoplasmic domain of its anti-[sigma] RseA. *Molecular cell* **11** : 1067–1078.

Carrington, P. E., Chivers, P. T., Al-Mjeni, F., Sauer, R. T., et Maroney, M. J. (2003) Nickel coordination is regulated by the DNA-bound state of NikR. *Nat Struct Biol* **10** : 126–30.

Carter, E. L., Flugga, N., Boer, J. L., Mulrooney, S. B., et Hausinger, R. P. (2009) Interplay of metal ions and urease. *Metallomics* **1** : 207–21.

Cavazza, C., Martin, L., Laffly, E., Lebrette, H., Cherrier, M., Zeppieri, L., Richaud, P., Carrière, M., et Fontecilla-Camps, J. (2011) Histidine 416 of the periplasmic binding protein NikA is essential for nickel uptake in Escherichia coli. *FEBS letters* .

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** : 38441–8.

Cezairliyan, B. et Sauer, R. (2007) Inhibition of regulated proteolysis by RseB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** : 3771.

Chaba, R., Alba, B., Guo, M., Sohn, J., Ahuja, N., Sauer, R., et Gross, C. (2011) Signal integration by DegS and RseB governs the σE-mediated envelope stress response in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** : 2106.

Champier, L., Duarte, V., Michaud-Soret, I., et Covès, J. (2004) Characterization of the MerD protein from Ralstonia metallidurans CH34 : a possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the mer operon. *Molecular microbiology* **52** : 1475–1485.

Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C., O'Halloran, T., et Mondragón, A. (2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* **301** : 1383.

Chen, P. R. et He, C. (2008) Selective recognition of metal ions by metalloregulatory proteins. *Curr Opin Chem Biol* **12** : 214–21.

Cherrier, M., Cavazza, C., Bochot, C., Lemaire, D., et Fontecilla-Camps, J. (2008) Structural Characterization of a Putative Endogenous Metal Chelator in the Periplasmic Nickel Transporter NikA. *Biochemistry* **47** : 9937–9943.

Cherrier, M. V., Martin, L., Cavazza, C., Jacquamet, L., Lemaire, D., Gaillard, J., et Fontecilla-Camps, J. C. (2005) Crystallographic and spectroscopic evidence for high affinity binding of FeEDTA(H2O) to the periplasmic nickel transporter NikA. *J Am Chem Soc* **127** : 10075–82.

Cheung, J., Bingman, C. A., Reyngold, M., Hendrickson, W. A., et Waldburger, C. D. (2008) Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J Biol Chem* **283** : 13762–70.

Chimento, D. P., Mohanty, A. K., Kadner, R. J., et Wiener, M. C. (2003) Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB. *Nat Struct Biol* **10** : 394–401.

Chivers, P. T. et Sauer, R. T. (1999) NikR is a ribbon-helix-helix DNA-binding protein. *Protein Sci* **8** : 2494–500.

Cho, U. S., Bader, M. W., Amaya, M. F., Daley, M. E., Klevit, R. E., Miller, S. I., et Xu, W. (2006) Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *J Mol Biol* **356** : 1193–206.

Choudhury, S. B., Lee, J. W., Davidson, G., Yim, Y. I., Bose, K., Sharma, M. L., Kang, S. O., Cabelli, D. E., et Maroney, M. J. (1999) Examination of the nickel site structure and reaction mechanism in Streptomyces seoulensis superoxide dismutase. *Biochemistry* **38** : 3744–52.

Chung, H. J., Choi, J. H., Kim, E. J., Cho, Y. H., et Roe, J. H. (1999) Negative regulation of the gene for Fe-containing superoxide dismutase by an Ni-responsive factor in Streptomyces coelicolor. *J Bacteriol* **181** : 7381–4.

Collins, C. M. et D'Orazio, S. E. (1993) Bacterial ureases : structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol Microbiol* **9** : 907–13.

Cornelis, P., Matthijs, S., et Van Oeffelen, L. (2009) Iron uptake regulation in Pseudomonas aeruginosa. *Biometals* **22** : 15–22.

Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernède, X., Lindahl, P. A., et Fontecilla-Camps, J. C. (2003) Ni-Zn-[Fe4-S4] and Ni-Ni-[Fe4-S4] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat Struct Biol* **10** : 271–9.

De Las Peñas, A., Connolly, L., et Gross, C. A. (1997) The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in Escherichia coli is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol* **24** : 373–85.

De Pina, K., Desjardin, V., Mandrand-Berthelot, M. A., Giordano, G., et Wu, L. F. (1999) Isolation and characterization of the nikR gene encoding a nickel-responsive regulator in Escherichia coli. *J Bacteriol* **181** : 670–4.

DeLano, W. (2002) The PyMOL molecular graphics system .

Dian, C., Schauer, K., Kapp, U., McSweeney, S. M., Labigne, A., et Terradot, L. (2006) Structural basis of the nickel response in Helicobacter pylori : crystal structures of HpNikR in Apo and nickel-bound states. *J Mol Biol* **361** : 715–30.

Diels, L. et Mergeay, M. (1990) DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. *Applied and environmental microbiology* **56** : 1485.

Diels, L., Van Roy, S., Taghavi, S., et Van Houdt, R. (2009) From industrial sites to environmental applications with Cupriavidus metallidurans. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96** : 247–58.

Drennan, C. L., Doukov, T. I., et Ragsdale, S. W. (2004) The metalloclusters of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase : a story in pictures. *J Biol Inorg Chem* **9** : 511–5.

Eitinger, T. et Friedrich, B. (1991) Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high-affinity nickel transport gene from Alcaligenes eutrophus. *J Biol Chem* **266** : 3222–7.

Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L., et Smith, J. A. (2005) Secondary transporters for nickel and cobalt ions : theme and variations. *Biometals* **18** : 399–405.

Elias, M., Dupuy, J., Merone, L., Mandrich, L., Porzio, E., Moniot, S., Rochu, D., Lecomte, C., Rossi, M., Masson, P., Manco, G., et Chabriere, E. (2008) Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities. *J Mol Biol* **379** : 1017–28.

Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., et Thauer, R. K. (1997) Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase : the key enzyme of biological methane formation. *Science* **278** : 1457–62.

Ernst, F., Stoof, J., Horrevoets, W., Kuipers, E., Kusters, J., et van Vliet, A. (2006) NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the Helicobacter pylori outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infection and immunity* **74** : 6821.

Escolar, L., Pérez-Martín, J., et de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box : transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181** : 6223–6229.

Eshaghi, S., Niegowski, D., Kohl, A., Martinez Molina, D., Lesley, S. A., et Nordlund, P. (2006) Crystal structure of a divalent metal ion transporter CorA at 2.9 angstrom resolution. *Science* **313** : 354–7.

Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M. K., Hughes, C., et Koronakis, V. (2004) Three's company : component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol* **14** : 741–7.

Faber, F., Egli, T., et Harder, W. (1993) Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in Escherichia coli K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiol Lett* **111** : 189–195.

Ferguson, A. D., Amezcua, C. A., Halabi, N. M., Chelliah, Y., Rosen, M. K., Ranganathan, R., et Deisenhofer, J. (2007) Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** : 513–518.

Ferguson, A. D., Chakraborty, R., Smith, B. S., Esser, L., van der Helm, D., et Deisenhofer, J. (2002) Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* **295** : 1715–9.

Fielding, A. J., Kovaleva, E. G., Farquhar, E. R., Lipscomb, J. D., et Que, L., Jr (2011) A hyperactive cobalt-substituted extradiol-cleaving catechol dioxygenase. *J Biol Inorg Chem* **16** : 341–55.

Flynn, J. M., Levchenko, I., Sauer, R. T., et Baker, T. A. (2004) Modulating substrate choice : the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev* **18** : 2292–301.

Fontecilla-Camps, J. C. (2009) Structure and Function of [NiFe]-Hydrogenases. *Met Ions Life Sci* **6** : 151–78.

Frémy (1852) Recherches sur le cobalt. *Ann chim phys* : 257–31.

Fu, C., Olson, J. W., et Maier, R. J. (1995) HypB protein of Bradyrhizobium japonicum is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** : 2333–7.

García Véscovi, E., Soncini, F. C., et Groisman, E. A. (1996) Mg2+ as an extracellular signal : environmental regulation of Salmonella virulence. *Cell* **84** : 165–74.

Ghigo, J. M., Létoffé, S., et Wandersman, C. (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of Serratia marcescens reconstituted in Escherichia coli. *J Bacteriol* **179** : 3572–3579.

Godwin, H. A. (2001) The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol* **5** : 223–7.

Gomis-Rüth, F. X. (2003) Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol* **24** : 157–202.

González-Guerrero, M. et Argüello, J. M. (2008) Mechanism of Cu+-transporting ATPases : soluble Cu+ chaperones directly transfer Cu+ to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** : 5992–7.

González-Guerrero, M., Eren, E., Rawat, S., Stemmler, T. L., et Argüello, J. M. (2008) Structure of the two transmembrane Cu+ transport sites of the Cu+ -ATPases. *J Biol Chem* **283** : 29753–9.

Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K., et Vandamme, P. (2001) Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as Ralstonia campinensis sp. nov., Ralstonia metallidurans sp. nov. and Ralstonia basilensis Steinle et al. 1998 emend. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **51** : 1773.

Grass, G., Fricke, B., et Nies, D. H. (2005) Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. *Biometals* **18** : 437–48.

Grass, G., Grosse, C., et Nies, D. H. (2000) Regulation of the cnr cobalt and nickel resistance determinant from Ralstonia sp. strain CH34. *J Bacteriol* **182** : 1390–1398.

Groisman, E. A. (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183** : 1835–1842.

Grosse, C., Friedrich, S., et Nies, D. H. (2007) Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in Cupriavidus metallidurans strain CH34. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12** : 227–240.

Grosse, C., Grass, G., Anton, A., Franke, S., Santos, A. N., Lawley, B., Brown, N. L., et Nies, D. H. (1999) Transcriptional organization of the czc heavy-metal homeostasis determinant from Alcaligenes eutrophus. *J Bacteriol* **181** : 2385–93.

Gruber, T. M. et Gross, C. A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57** : 441–66.

Haferburg, G., Kloess, G., Schmitz, W., et Kothe, E. (2008) "Ni-struvite" - a new biomineral formed by a nickel resistant Streptomyces acidiscabies. *Chemosphere* **72** : 517–23.

Härle, C., Kim, I., Angerer, A., et Braun, V. (1995) Signal transfer through three compartments : transcription initiation of the Escherichia coli ferric citrate transport system from the cell surface. *EMBO J* **14** : 1430–1438.

Hartwig, A. (2001) Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions : differential effects on structure and function. *Antioxid Redox Signal* **3** : 625–34.

He, M., Clugston, S., Honek, J., et Matthews, B. (2000) Determination of the structure of Escherichia coli glyoxalase I suggests a structural basis for differential metal activation. *Biochemistry* **39** : 8719–8727.

Heinrich, J. et Wiegert, T. (2009) Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors. *Res Microbiol* **160** : 696–703.

Helmann, J. D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46** : 47–110.

Helmann, J. D. et Chamberlin, M. J. (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57** : 839–872.

Higgins, C. (2001) ABC transporters : physiology, structure and mechanism-an overview. *Res Microbiol* **152** : 205–210.

Hobman, J., Yamamoto, K., et Oshima, T. (2007) Transcriptomic responses of bacterial cells to sublethal metal ion stress. *Molecular microbiology of heavy metals* : 73–115.

Holm, R., Kennepohl, P., et Solomon, E. (1996) Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chem Rev* **96** : 2239–2314.

Horner, D. S., Heil, B., Happe, T., et Embley, T. M. (2002) Iron hydrogenases–ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **27** : 148–53.

Housecroft, C. et Constable, E. (2006) Chemistry : an introduction to organic, inorganic, and physical chemistry. Prentice Hall.

Imperi, F., Mettrick, K., Shirley, M., et Tiburzi, F. (2008) Iron Transport and Signaling in Pseudomonads. *Pseudomonas : model organism, pathogen, cell factory* .

Irving, H. et Williams, R. (1948) Order of stability of metal complexes. *Nature* **162** : 746–747.

Iwig, J., Rowe, J., et Chivers, P. (2006) Nickel homeostasis in Escherichia coli–the rcnR-rcnA efflux pathway and its linkage to NikR function. *Mol Microbiol* **62** : 252–262.

Iwig, J. S., Leitch, S., Herbst, R. W., Maroney, M. J., et Chivers, P. T. (2008) Ni(II) and Co(II) sensing by Escherichia coli RcnR. *J Am Chem Soc* **130** : 7592–7606.

Izadi-Pruneyre, N., Huché, F., Lukat-Rodgers, G., Lecroisey, A., Gilli, R., Rodgers, K., Wandersman, C., et Delepelaire, P. (2006) The heme transfer from the soluble HasA hemophore to its membrane-bound receptor HasR is driven by protein-protein interaction from a high to a lower affinity binding site. *Journal of Biological Chemistry* **281** : 25541.

Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P., et Karplus, P. A. (1995) The crystal structure of urease from Klebsiella aerogenes. *Science* **268** : 998–1004.

Janssen, P. J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M. A., Leys, N., Vallaeys, T., Lapidus, A., Monchy, S., Médigue, C., Taghavi, S., McCorkle, S., Dunn, J., van der Lelie, D., et Mergeay, M. (2010) The complete genome sequence of Cupriavidus metallidurans strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One* **5** : e10433.

Jeoung, J.-H. et Dobbek, H. (2007) Carbon dioxide activation at the Ni,Fe-cluster of anaerobic carbon monoxide dehydrogenaseFe cluster of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase. *Science* **318** : 1461–4.

Juhin, A., De Groot, F., Vankó, G., Calandra, M., et Brouder, C. (2010) Angular dependence of core hole screening in LiCoO_ {2} : A DFT+ U calculation of the oxygen and cobalt K-edge x-ray absorption spectra. *Physical Review B* **81** : 115115.

Juhnke, S., Peitzsch, N., Hübener, N., Grosse, C., et Nies, D. H. (2002) New genes involved in chromate resistance in Ralstonia metallidurans strain CH34. *Arch Microbiol* **179** : 15–25.

Kanehara, K., Ito, K., et Akiyama, Y. (2002) YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes Dev* **16** : 2147–55.

Kanehara, K., Ito, K., et Akiyama, Y. (2003) YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA. *EMBO J* **22** : 6389–98.

Kehres, D. G. et Maguire, M. E. (2002) Structure, properties and regulation of magnesium transport proteins. *Biometals* **15** : 261–70.

Kim, E. J., Chung, H. J., Suh, B., Hah, Y. C., et Roe, J. H. (1998) Expression and regulation of the sodF gene encoding iron- and zinc-containing superoxide dismutase in Streptomyces coelicolor Müller. *J Bacteriol* **180** : 2014–20.

Kim, I., Stiefel, A., Plantör, S., Angerer, A., et Braun, V. (1997) Transcription induction of the ferric citrate transport genes via the N-terminus of the FecA outer membrane protein, the Ton system and the electrochemical potential of the cytoplasmic membrane. *Mol Microbiol* **23** : 333–344.

Kobayashi, M. et Shimizu, S. (1999) Cobalt proteins.

Koch, D., Nies, D., et Grass, G. (2007) The RcnRA (YohLM) system of Escherichia coli : a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *Biometals* **20** : 759–771.

Kräutler, B. (2005) Vitamin B12 : chemistry and biochemistry. *Biochem Soc Trans* **33** : 806–10.

Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., et Ramos, J. L. (2010) Bacterial sensor kinases : diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* **64** : 539–59.

Krieg, S., Huché, F., Diederichs, K., Izadi-Pruneyre, N., Lecroisey, A., Wandersman, C., Delepelaire, P., et Welte, W. (2009) Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 1045–1050.

Kwon, E., Kim, D. Y., Gross, C. A., Gross, J. D., et Kim, K. K. (2010) The crystal structure Escherichia coli Spy. *Protein Sci* **19** : 2252–9.

Larrabee, J. A., Chyun, S. A., et Volwiler, A. S. (2008) Magnetic circular dichroism study of a dicobalt(II) methionine aminopeptidase/fumagillin complex and dicobalt II-II and II-III model complexes. *Inorg Chem* **47** : 10499–10508.

Lee, H., Hsu, F.-F., Turk, J., et Groisman, E. A. (2004) The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in Salmonella enterica. *J Bacteriol* **186** : 4124–33.

Lee, M. H., Pankratz, H. S., Wang, S., Scott, R. A., Finnegan, M. G., Johnson, M. K., Ippolito, J. A., Christianson, D. W., et Hausinger, R. P. (1993) Purification and characterization of Klebsiella aerogenes UreE protein : a nickel-binding protein that functions in urease metallocenter assembly. *Protein Sci* **2** : 1042–52.

Leitch, S., Bradley, M. J., Rowe, J. L., Chivers, P. T., et Maroney, M. J. (2007) Nickel-specific response in the transcriptional regulator, Escherichia coli NikR. *J Am Chem Soc* **129** : 5085–95.

Leonhartsberger, S., Huber, A., Lottspeich, F., et Böck, A. (2001) The hydH/G Genes from Escherichia coli code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J Mol Biol* **307** : 93–105.

Lever, A. (1984) Inorganic electronic spectroscopy, vol. 2. Elsevier (Amsterdam and New York).

Lewis, R. et Evans, W. (2006) Chemistry. Palgrave Macmillan.

Li, C., Peck, H. D., Jr, LeGall, J., et Przybyla, A. E. (1987) Cloning, characterization, and sequencing of the genes encoding the large and small subunits of the periplasmic [NiFe]hydrogenase of Desulfovibrio gigas. *DNA* **6** : 539–51.

Li, Y. et Zamble, D. B. (2009) Nickel homeostasis and nickel regulation : an overview. *Chem Rev* **109** : 4617–4643.

Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R. A., et Schlegel, H. G. (1993) Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant cnr from pMOL28 of Alcaligenes eutrophus CH34. *J Bacteriol* **175** : 767–778.

Lindahl, P. A. (2002) The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family : light at the end of the tunnel ? *Biochemistry* **41** : 2097–105.

Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S. K., Zhang, L., George, G. N., Talaat, A. M., Sacchettini, J. C., et Giedroc, D. P. (2007) CsoR is a novel Mycobacterium tuberculosis copper-sensing transcriptional regulator. *Nat Chem Biol* **3** : 60–8.

Llamas, M. A., Mooij, M. J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Ratledge, C., et Bitter, W. (2008) Characterization of five novel Pseudomonas aeruginosa cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* **67** : 458–72.

Llamas, M. A., Sparrius, M., Kloet, R., Jiménez, C. R., Vandenbroucke-Grauls, C., et Bitter, W. (2006) The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **188** : 1882–91.

Lonetto, M., Gribskov, M., et Gross, C. (1992) The sigma 70 family : sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of bacteriology* **174** : 3843.

Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E., et Buttner, M. J. (1994) Analysis of the Streptomyces coelicolor sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** : 7573–7577.

Long, F., Su, C.-C., Zimmermann, M. T., Boyken, S. E., Rajashankar, K. R., Jernigan, R. L., et Yu, E. W. (2010) Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature* **467** : 484–8.

Lu, M. et Fu, D. (2007) Structure of the zinc transporter YiiP. *Science* **317** : 1746–8.

Lutkenhaus, J. F. (1977) Role of a major outer membrane protein in Escherichia coli. *J Bacteriol* **131** : 631–7.

Ma, Z., Cowart, D., Ward, B., Arnold, R., DiMarchi, R., Zhang, L., George, G., Scott, R., et Giedroc, D. (2009a) Unnatural Amino Acid Substitution as a Probe of the Allosteric Coupling Pathway in a Mycobacterial Cu (I) Sensor. *J Am Chem Soc* : 983–990.

Ma, Z., Jacobsen, F. E., et Giedroc, D. P. (2009b) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem Rev* **109** : 4644–4681.

Maret, W. et Vallee, B. (1993) Cobalt as probe and label of proteins. *Methods in enzymology* **226** : 52.

Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J., et Jahn, D. (2002) Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol* **58** : 275–85.

Mascher, T., Helmann, J. D., et Unden, G. (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70** : 910–38.

Mascher, T., Margulis, N., Wang, T., Ye, R., et Helmann, J. (2003) Cell wall stress responses in Bacillus subtilis : the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular microbiology* **50** : 1591–1604.

Mecsas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J., et Gross, C. A. (1993) The activity of sigma E, an Escherichia coli heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* **7** : 2618–28.

Melnyk, R. A., Kim, S., Curran, A. R., Engelman, D. M., Bowie, J. U., et Deber, C. M. (2004) The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix-helix interactions is modulated by long-range communication. *J Biol Chem* **279** : 16591–7.

Mergeay, M. (1995) Heavy metal resistances in microbial ecosystems. *KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT(THE NETHERLANDS) 1995* .

Mergeay, M. (2000) Bacteria adapted to industrial biotopes : metal-resistant Ralstonia. *Bacterial Stress Responses* : 403–414.

Mergeay, M., Houba, C., et Gerits, J. (1978) Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions : evidence from curing in a Pseudomonas [proceedings]. *Archives internationales de physiologie et de biochimie* **86** : 440.

Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H., Gerits, J., Charles, P., et Van Gijsegem, F. (1985) Alcaligenes eutrophus CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* **162** : 328.

Mertz, W. (1981) The essential trace elements. *Science* **213** : 1332–8.

Mettrick, K. A. et Lamont, I. L. (2009) Different roles for anti-sigma factors in siderophore signalling pathways of Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol* **74** : 1257–71.

Michailidis, M. et Martin, R. (1969) Oxygenation and oxidation of cobalt (II) chelates of amines, amino acids, and dipeptides. *Journal of the American Chemical Society* **91** : 4683–4689.

Miller, F., Simplicio, J., et Wilkins, R. (1969) Kinetics of the rapid interaction of some cobalt (II) chelates with oxygen. *Journal of the American Chemical Society* **91** : 1962–1967.

Miller, S. I., Kukral, A. M., et Mekalanos, J. J. (1989) A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls Salmonella typhimurium virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** : 5054–8.

Misra, T. K. (1992) Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* **27** : 4–16.

Missiakas, D., Mayer, M. P., Lemaire, M., Georgopoulos, C., et Raina, S. (1997) Modulation of the Escherichia coli sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol* **24** : 355–71.

Mitra, R. S. et Bernstein, I. A. (1977) Nature of the repair process associated with the recovery of Escherichia coli after exposure to Cd2+. *Biochem Biophys Res Commun* **74** : 1450–5.

Mitra, R. S. et Bernstein, I. A. (1978) Single-strand breakage in DNA of Escherichia coli exposed to Cd2+. *J Bacteriol* **133** : 75–80.

Miyanaga, A., Fushinobu, S., Ito, K., et Wakagi, T. (2001) Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase. *Biochem Biophys Res Commun* **288** : 1169–74.

Mobley, H. L., Garner, R. M., et Bauerfeind, P. (1995) Helicobacter pylori nickel-transport gene nixA : synthesis of catalytically active urease in Escherichia coli independent of growth conditions. *Mol Microbiol* **16** : 97–109.

Monchy, S. (2007) Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez Cupriavidus metallidurans CH34. *Thèse de doctorat à l'Université Libre de Bruxelles* .

Monchy, S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaeys, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., et Mergeay, M. (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of Cupriavidus metallidurans are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol* **189** : 7417–25.

Monchy, S., Vallaeys, T., Bossus, A., et Mergeay, M. (2006) Metal efflux P1-ATPase genes of Cupriavidus metallidurans CH34 : a transcriptomic approach. *Int J Environ Anal Chem* **86** : 677–692.

Munkelt, D., Grass, G., et Nies, D. H. (2004) The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from Wautersia metallidurans CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol* **186** : 8036–43.

Mura, C., Katz, J. E., Clarke, S. G., et Eisenberg, D. (2003) Structure and function of an archaeal homolog of survival protein E (SurEalpha) : an acid phosphatase with purine nucleotide specificity. *J Mol Biol* **326** : 1559–75.

Nagababu, E. et Rifkind, J. M. (2004) Heme degradation by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* **6** : 967–78.

Nascimento, A. et Chartone-Souza, E. (2003) Operon mer : bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research* **2** : 92–101.

Navarro, C., Wu, L. F., et Mandrand-Berthelot, M. A. (1993) The nik operon of Escherichia coli encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol Microbiol* **9** : 1181–91.

Nies, A., Nies, D. H., et Silver, S. (1989) Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in Alcaligenes eutrophus. *J Bacteriol* **171** : 5065–5070.

Nies, D. (1995) The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from Alcaligenes eutrophus functions as a cation-proton antiporter in Escherichia coli. *J Bacteriol* **177** : 2707.

Nies, D. (2007) Bacterial transition metal homeostasis. *Molecular microbiology of heavy metals* : 117–142.

Nies, D., Rehbein, G., Hoffmann, T., Baumann, C., et Grosse, C. (2006) Paralogs of Genes Encoding Metal Resistance Proteins in Cupriavidus metallidurans Strain CH34. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **11** : 82–93.

Nies, D. H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27** : 313–339.

Nikaido, H. et Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **49** : 1.

Ochs, M., Veitinger, S., Kim, I., Welz, D., Angerer, A., et Braun, V. (1995) Regulation of citrate-dependent iron transport of Escherichia coli : fecR is required for transcription activation by FecI. *Mol Microbiol* **15** : 119–32.

O'Halloran, T. et Walsh, C. (1987) Metalloregulatory DNA-binding protein encoded by the merR gene : isolation and characterization. *Science* **235** : 211–4.

Olson, J. W. et Maier, R. J. (2002) Molecular hydrogen as an energy source for Helicobacter pylori. *Science* **298** : 1788–90.

Ortiz de Orué Lucana, D., Bogel, G., Zou, P., et Groves, M. R. (2009) The oligomeric assembly of the novel haem-degrading protein HbpS is essential for interaction with its cognate two-component sensor kinase. *J Mol Biol* **386** : 1108–1122.

Ortiz de Orué Lucana, D. et Groves, M. R. (2009) The three-component signalling system HbpS-SenS-SenR as an example of a redox sensing pathway in bacteria. *Amino Acids* **37** : 479–486.

Ortiz de Orué Lucana, D., Roscher, M., Honigmann, A., et Schwarz, J. (2010) Iron-mediated oxidation induces conformational changes within the redox-sensing protein HbpS. *J Biol Chem* **285** : 28086–96.

Ortiz de Orué Lucana, D., Tröller, M., et Schrempf, H. (2003) Amino acid residues involved in reversible thiol formation and zinc ion binding in the Streptomyces reticuli redox regulator FurS. *Mol Genet Genomics* **268** : 618–27.

Ortiz de Orué Lucana, D., Zou, P., Nierhaus, M., et Schrempf, H. (2005) Identification of a novel two-component system SenS/SenR modulating the production of the catalase-peroxidase CpeB and the haem-binding protein HbpS in Streptomyces reticuli. *Microbiology* **151** : 3603–14.

Osterberg, S., Del Peso-Santos, T., et Shingler, V. (2011) Regulation of Alternative Sigma Factor Use. *Annu Rev Microbiol* .

Outten, C. E. et O'Halloran, T. V. (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292** : 2488–92.

Paget, M. S. B. et Helmann, J. D. (2003) The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol* **4** : 203.

Parkinson, J. S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73** : 857–871.

Pearson, R. (1966) Acids and bases. *Science* **151** : 172–177.

Pennella, M. A., Shokes, J. E., Cosper, 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** : 3713–3718.

Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., et Ferrin, T. (2004) UCSF Chimera visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* **25** : 1605–1612.

Phillips, C., Schreiter, E., Guo, Y., Wang, S., Zamble, D., et Drennan, C. (2008) Structural basis of the metal specificity for nickel regulatory protein NikR. *Biochemistry* **47** : 1938–1946.

Plewniak, F., Bianchetti, L., Brelivet, Y., Carles, A., Chalmel, F., Lecompte, O., Mochel, T., Moulinier, L., Muller, A., Muller, J., *et al.* (2003) PipeAlign : a new toolkit for protein family analysis. *Nucleic acids research* **31** : 3829.

Pompidor, G., Girard, E., Maillard, A., Ramella-Pairin, S., Bersch, B., Kahn, R., et Covès, J. (2009) Biostructural analysis of the metal-sensor domain of CnrX from Cupriavidus metallidurans CH34. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96** : 141–148.

Pompidor, G., Maillard, A. P., Girard, E., Gambarelli, S., Kahn, R., et Covès, J. (2008) X-ray structure of the metal-sensor CnrX in both the apo- and copper-bound forms. *FEBS Lett* **582** : 3954–8.

Poole, K. et McKay, G. A. (2003) Iron acquisition and its control in Pseudomonas aeruginosa : many roads lead to Rome. *Front Biosci* **8** : 661–686.

Potvin, E., Sanschagrin, F., et Levesque, R. C. (2008) Sigma factors in Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiol Rev* **32** : 38–55.

Proudfoot, M., Kuznetsova, E., Brown, G., Rao, N. N., Kitagawa, M., Mori, H., Savchenko, A., et Yakunin, A. F. (2004) General enzymatic screens identify three new nucleotidases in Escherichia coli. Biochemical characterization of SurE, YfbR, and YjjG. *J Biol Chem* **279** : 54687–94.

Quan, S., Koldewey, P., Tapley, T., Kirsch, N., Ruane, K. M., Pfizenmaier, J., Shi, R., Hofmann, S., Foit, L., Ren, G., Jakob, U., Xu, Z., Cygler, M., et Bardwell, J. C. A. (2011) Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nat Struct Mol Biol* **18** : 262–9.

Raivio, T. (2005) MicroReview : Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Molecular microbiology* **56** : 1119–1128.

Ranquet, C., Ollagnier-de Choudens, S., Loiseau, L., Barras, F., et Fontecave, M. (2007) Cobalt stress in Escherichia coli. *J Biol Chem* **282** : 30442.

Ratledge, C. et Dover, L. G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54** : 881–941.

Ravel, B. et Newville, M. (2005) ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS : data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of Synchrotron Radiation* **12** : 537–541.

Reyes-Caballero, H., Campanello, G. C., et Giedroc, D. P. (2011) Metalloregulatory proteins : Metal selectivity and allosteric switching. *Biophys Chem* .

Robinson, N., Whitehall, S., et Cavet, J. (2001) Microbial metallothioneins. *Advances in microbial physiology* **44** : 183–213.

Roderick, S. L. et Matthews, B. W. (1993) Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from Escherichia coli : a new type of proteolytic enzyme. *Biochemistry* **32** : 3907–12.

Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Gelfand, M. S., et Eitinger, T. (2006) Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters : evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *J Bacteriol* **188** : 317–27.

Rodrigue, A., Effantin, G., et Mandrand-Berthelot, M. (2005) Identification of rcnA (yohM), a nickel and cobalt resistance gene in Escherichia coli. *J Bacteriol* **187** : 2912.

Rossi, M. S., Paquelin, A., Ghigo, J. M., et Wandersman, C. (2003) Haemophore-mediated signal transduction across the bacterial cell envelope in Serratia marcescens : the inducer and the transported substrate are different molecules. *Mol Microbiol* **48** : 1467–1480.

Rouch, D., Lee, B., et Morby, A. (1995) Understanding cellular responses to toxic agents : a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J Ind Microbiol* **14** : 132–141.

Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M., et Coves, J. (2001) Mobilization of selenite by Ralstonia metallidurans CH34. *Applied and environmental microbiology* **67** : 769.

Royant, A., Carpentier, P., Ohana, J., McGeehan, J., Paetzold, B., Noirclerc-Savoye, M., Vernede, X., Adam, V., et Bourgeois, D. (2007) Advances in spectroscopic methods for biological crystals. 1. Fluorescence lifetime measurements. *Journal of Applied Crystallography* **40** : 1105–1112.

Rulísek, L. et Vondrásek, J. (1998) Coordination geometries of selected transition metal ions (Co2+, Ni2+, Cu2+, Zn2+, Cd2+, and Hg2+) in metalloproteins. *J Inorg Biochem* **71** : 115–127.

Saby, N., Thioulouse, J., Jolivet, C., Ratié, C., Boulonne, L., Bispo, A., et Arrouays, D. (2009) Multivariate analysis of the spatial patterns of 8 trace elements using the French soil monitoring network data. *Science of the Total Environment* **407** : 5644–5652.

Saier Jr, M., Tam, R., Reizer, A., et Reizer, J. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11** : 841–847.

Sakamoto, K., Agari, Y., Agari, K., Kuramitsu, S., et Shinkai, A. (2010) Structural and functional characterization of the transcriptional repressor CsoR from Thermus thermophilus HB8. *Microbiology* **156** : 1993–2005.

Schaefer, W. (1968) Structure of decaammine-. mu.-peroxo-dicobalt disulfate tetrahydrate. *Inorganic Chemistry* **7** : 725–731.

Schauer, K., Gouget, B., Carrière, M., Labigne, A., et De Reuse, H. (2007) Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol Microbiol* **63** : 1054–1068.

Schauer, K., Rodionov, D., et de Reuse, H. (2008) New substrates for TonB-dependent transport : do we only see the 'tip of the iceberg' ? *Trends Biochem Sci* **33** : 330–338.

Scherer, J. et Nies, D. H. (2009) CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in Cupriavidus metallidurans CH34. *Mol Microbiol* **73** : 601–21.

Schmidt, T. et Schlegel, H. G. (1994) Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of Alcaligenes xylosoxidans 31A. *J Bacteriol* **176** : 7045–54.

Schmitt, M. P. (1999) Identification of a two-component signal transduction system from Corynebacterium diphtheriae that activates gene expression in response to the presence of heme and hemoglobin. *J Bacteriol* **181** : 5330–5340.

Schreiter, E. R., Sintchak, M. D., Guo, Y., Chivers, P. T., Sauer, R. T., et Drennan, C. L. (2003) Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat Struct Biol* **10** : 794–9.

Scott, J. et Palmer, S. (1988) Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnology letters* **10** : 21–24.

Senes, A., Engel, D. E., et DeGrado, W. F. (2004) Folding of helical membrane proteins : the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* **14** : 465–79.

Shima, S. et Thauer, R. (2005) Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8** : 643–648.

Snavely, M. D., Florer, J. B., Miller, C. G., et Maguire, M. E. (1989) Magnesium transport in Salmonella typhimurium : 28Mg2+ transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *J Bacteriol* **171** : 4761–6.

Sohn, J., Grant, R. A., et Sauer, R. T. (2007) Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell* **131** : 572–83.

Solomon, E. I., Szilagyi, R. K., DeBeer George, S., et Basumallick, L. (2004) Electronic structures of metal sites in proteins and models : contributions to function in blue copper proteins. *Chem Rev* **104** : 419–58.

Sorenson, M., Ray, S., et Darst, S. (2004) Crystal structure of the flagellar [sigma]/anti-[sigma] complex [sigma] 28/FlgM reveals an intact [sigma] factor in an inactive conformation. *Molecular cell* **14** : 127–138.

Stadtman, E. R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **62** : 797–821.

Staroń, A., Sofia, H. J., Dietrich, S., Ulrich, L. E., Liesegang, H., et Mascher, T. (2009) The third pillar of bacterial signal transduction : classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol Microbiol* .

Stauff, D. L., Torres, V. J., et Skaar, E. P. (2007) Signaling and DNA-binding activities of the Staphylococcus aureus HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *J Biol Chem* **282** : 26111–26121.

Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, S. L., Robinson, C. V., Ilag, L. L., von Heijne, G., et Daley, D. O. (2005) Protein complexes of the Escherichia coli cell envelope. *J Biol Chem* **280** : 34409–19.

Su, C.-C., Long, F., et Yu, E. W. (2011a) The Cus efflux system removes toxic ions via a methionine shuttle. *Protein Sci* **20** : 6–18.

Su, C.-C., Long, F., Zimmermann, M. T., Rajashankar, K. R., Jernigan, R. L., et Yu, E. W. (2011b) Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of Escherichia coli. *Nature* **470** : 558–62.

Summers, A. O. (2009) Damage control : regulating defenses against toxic metals and metalloids. *Curr Opin Microbiol* **12** : 138–44.

Takishima, K., Suga, T., et Mamiya, G. (1988) The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *Eur J Biochem* **175** : 151–65.

Thede, G. L., Arthur, D. C., Edwards, R. A., Buelow, D. R., Wong, J. L., Raivio, T. L., et Glover, J. N. M. (2011) Structure of the periplasmic stress response protein CpxP. *J Bacteriol* **193** : 2149–57.

Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., et Higgins, D. (1997) The CLUSTAL_X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* **25** : 4876.

Thornalley, P. J. (2003) Glyoxalase I–structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans* **31** : 1343–8.

Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L., et van der Lelie, D. (2001) A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environ Pollut* **113** : 19–26.

Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L., et van Der Lelie, D. (2000) Regulation of the cnr cobalt and nickel resistance determinant of Ralstonia eutropha (Alcaligenes eutrophus) CH34. *J Bacteriol* **182** : 1399–1409.

Tiburzi, F., Imperi, F., et Visca, P. (2008) Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol* **67** : 213–227.

Tottey, S., Harvie, D. R., et Robinson, N. J. (2005) Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones. *Acc Chem Res* **38** : 775–83.

Tottey, S., Waldron, K., Firbank, S., Reale, B., Bessant, C., Sato, K., Cheek, T., Gray, J., Banfield, M., Dennison, C., *et al.* (2008) Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper-or zinc-binding. *cell* **10** : 10.

Valko, M., Morris, H., et Cronin, M. T. D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12** : 1161–208.

van der Lelie, D., Corbisier, P., Baeyens, W., Wuertz, S., Diels, L., et Mergeay, M. (1994) The use of biosensors for environmental monitoring. *Res Microbiol* **145** : 67–74.

Van Duyne, G., Standaert, R., Karplus, P., Schreiber, S., et Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *Journal of molecular biology* **229** : 105–105.

van Vliet, A. H. M., Poppelaars, S. W., Davies, B. J., Stoof, J., Bereswill, S., Kist, M., Penn, C. W., Kuipers, E. J., et Kusters, J. G. (2002) NikR mediates nickel-responsive transcriptional induction of urease expression in Helicobacter pylori. *Infect Immun* **70** : 2846–52.

Vaneechoutte, M., K
"ampfer, P., De Baere, T., Falsen, E., et Verschraegen, G. (2004) Wautersia gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including Ralstonia eutropha and related species, and proposal of Ralstonia [Pseudomonas] syzygii (Roberts et al. 1990) comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **54** : 317.

VanZile, M. L., Cosper, N. J., Scott, R. A., et Giedroc, D. P. (2000) The zinc metalloregulatory protein Synechococcus PCC7942 SmtB binds a single zinc ion per monomer with high affinity in a tetrahedral coordination geometry. *Biochemistry* **39** : 11818–29.

Vignais, P. M. et Billoud, B. (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases : an overview. *Chem Rev* **107** : 4206–72.

Vignais, P. M. et Colbeau, A. (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol* **6** : 159–88.

Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., et Fontecilla-Camps, J. C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from Desulfovibrio gigas. *Nature* **373** : 580–7.

Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B., Roseboom, W., Albracht, S., Garcin, E., Rousset, M., et Fontecilla-Camps, J. (2005) Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **10** : 239–249.

Waldron, K., Firbank, S., Dainty, S., Pérez-Rama, M., Tottey, S., et Robinson, N. (2010) Structure and Metal Loading of a Soluble Periplasm Cuproprotein. *Journal of Biological Chemistry* **285** : 32504.

Waldron, K. J. et Robinson, N. J. (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal ? *Nat Rev Microbiol* **7** : 25–35.

Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., et Robinson, N. J. (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460** : 823–30.

Wandersman, C. et Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources : from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58** : 611–647.

Wang, S. C., Dias, A. V., Bloom, S. L., et Zamble, D. B. (2004) Selectivity of metal binding and metal-induced stability of Escherichia coli NikR. *Biochemistry* **43** : 10018–28.

Weast, R. *et al.* (1984) Handbook of chemistry and physics. *Boca Raton, Florida* .

Wei, Y. et Fu, D. (2005) Selective metal binding to a membrane-embedded aspartate in the Escherichia coli metal transporter YiiP (FieF). *J Biol Chem* **280** : 33716–24.

Werth, M., Tang, S., Formicka, G., Zeppezauer, M., et Johnson, M. (1995) Magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance studies of cobalt-substituted horse liver alcohol dehydrogenase. *Inorganic Chemistry* **34** : 218–228.

Wilcox, D. (2008) Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins : An overview of recent studies. *Inorganica Chimica Acta* **361** : 857–867.

Wilken, C., Kitzing, K., Kurzbauer, R., Ehrmann, M., et Clausen, T. (2004) Crystal Structure of the DegS Stress Sensor : : How a PDZ Domain Recognizes Misfolded Protein and Activates a Protease. *Cell* **117** : 483–494.

Wilkins, R. (1971) Uptake of oxygen by cobalt (II) complexes in solution. *Bioinorganic Chemistry* .

Williams, R. et da Silva, J. (2006) The chemistry of evolution. Elsevier Amsterdam.

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J., et Lin, L. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical biochemistry* **179** : 131–137.

Wollmann, P. et Zeth, K. (2007) The structure of RseB : a sensor in periplasmic stress response of E. coli. *J Mol Biol* **372** : 927–41.

Wösten, M. M., Kox, L. F., Chamnongpol, S., Soncini, F. C., et Groisman, E. A. (2000) A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* **103** : 113–125.

Wu, C.-C., Rice, W. J., et Stokes, D. L. (2008) Structure of a copper pump suggests a regulatory role for its metal-binding domain. *Structure* **16** : 976–85.

Wu, L. F., Mandrand-Berthelot, M. A., Waugh, R., Edmonds, C. J., Holt, S. E., et Boxer, D. H. (1989) Nickel deficiency gives rise to the defective hydrogenase phenotype of hydC and fnr mutants in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **3** : 1709–18.

Wuerges, J., Lee, J.-W., Yim, Y.-I., Yim, H.-S., Kang, S.-O., et Djinovic Carugo, K. (2004) Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** : 8569–74.

Xia, Y., Lundbäck, A.-K., Sahaf, N., Nordlund, G., Brzezinski, P., et Eshaghi, S. (2011) Co2+ Selectivity of Thermotoga maritima CorA and Its Inability to Regulate Mg2+ Homeostasis Present a New Class of CorA Proteins. *J Biol Chem* **286** : 16525–32.

Youn, H., Youn, H., Lee, J., Yim, Y., Lee, J., Hah, Y., et Kang, S. (1996) Unique isozymes of superoxide dismutase in Streptomyces griseus. *Archives of biochemistry and biophysics* **334** : 341–348.

Zhang, Y. et Gladyshev, V. N. (2009) Comparative genomics of trace elements : emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chem Rev* **109** : 4828–4861.

Zhou, X., Keller, R., Volkmer, R., Krauss, N., Scheerer, P., et Hunke, S. (2011) Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein. *J Biol Chem* **286** : 9805–14.

Zhu, X., Teng, M., Niu, L., Xu, C., et Wang, Y. (2000) Structure of xylose isomerase from Streptomyces diastaticus No. 7 strain M1033 at 1.85 A resolution. *Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography* **56** : 129–136.

Zoropogui, A., Gambarelli, S., et Covès, J. (2008) CzcE from Cupriavidus metallidurans CH34 is a copper-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **365** : 735–9.

Zou, P. et Schrempf, H. (2000) The heme-independent manganese-peroxidase activity depends on the presence of the C-terminal domain within the Streptomyces reticuli catalase-peroxidase CpeB. *Eur J Biochem* **267** : 2840–9.

ANNEXES

doi:10.1016/j.jmb.2011.03.014 J. Mol. Biol. (2011) 408, 766–779

Contents lists available at www.sciencedirect.com

Journal of Molecular Biology

journal homepage: http://ees.elsevier.com.jmb

Structural Basis for Metal Sensing by CnrX

Juliette Trepreau†, Eric Girard†, Antoine P. Maillard, Eve de Rosny, Isabelle Petit-Haertlein, Richard Kahn and Jacques Covès*

Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, CNRS-CEA-UJF Grenoble 1, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France

Received 20 January 2011; received in revised form 3 March 2011; accepted 7 March 2011
Available online 15 March 2011

Edited by M. Guss

Keywords:
transmembrane signal transduction;
metal sensing;
extracytoplasmic function;
CnrX;
Cupriavidus metallidurans CH34

CnrX is the metal sensor and signal modulator of the three-protein transmembrane signal transduction complex CnrYXH of *Cupriavidus metallidurans* CH34 that is involved in the setup of *c*obalt and *n*ickel *r*esistance. We have determined the atomic structure of the soluble domain of CnrX in its Ni-bound, Co-bound, or Zn-bound form. Ni and Co ions elicit a biological response, while the Zn-bound form is inactive. The structures presented here reveal the topology of intraprotomer and interprotomer interactions and the ability of metal-binding sites to fine-tune the packing of CnrX dimer as a function of the bound metal. These data suggest an allosteric mechanism to explain how the complex is switched on and how the signal is modulated by Ni or Co binding. These results provide clues to propose a model for signal propagation through the membrane in the complex.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

All organisms have evolved sophisticated mechanisms to mediate the homeostasis of transition metal ions or to resist excessive concentrations of those metals. These mechanisms include the expression of metal transporters, intracellular chelators, and detoxification proteins, and are, most of the time, regulated by the metal ion itself. Bacterial cells contain metalloregulators to manage the intracellular demand for metal and extracellular sensors to respond to changes in environmental concentrations.[1–4] Building an appropriate response to a change in the extracellular environment requires extracytoplasmic sensing and transmembrane (TM) signaling to work together.[5–9] In bacteria, the use of extracytoplasmic function (ECF)-type sigma factors has only recently been acknowledged as a major mechanism for passing extracytoplasmic stimuli to the cytoplasm.[10] Sigma factors are dissociable subunits of the bacterial RNA polymerase that are responsible (i) for promoter recognition (hence promoter specificity) and (ii) for DNA melting at the transcription initiation site.[11,12] Therefore, sigma factors are crucial to gene expression regulation, and, indeed, sigma factor competition for the RNA polymerase core is used to orchestrate metabolic changes in response to specific stimuli that are sensed usually within the cell envelope.[5,6,8,10] A sigma factor responding to surface signaling belongs to the ECF subfamily.[13–15]

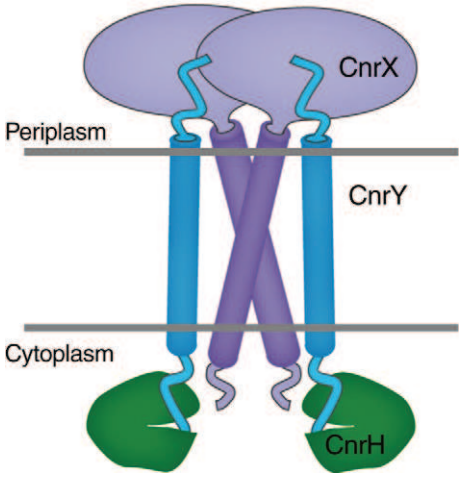
The number of ECF sigma factors coded by a given microorganism reflects the complexity of its environment or its developmental conditions.[13,14] For instance, *Escherichia coli* contains seven sigma factors; two belong to the ECF subfamily and are involved in metal homeostasis.[16] For comparison,

*Corresponding author. E-mail address: jacques.coves@ibs.fr.

† J.T. and E.G. contributed equally to this work.

Abbreviations used: TM, transmembrane; ECF, extracytoplasmic function; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ESRF, European Synchrotron Radiation Facility.

0022-2836/$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Scheme 1. Schematic representation of the CnrYXH complex. In the resting state, CnrY sequesters CnrH on the cytoplasmic side of the inner membrane. CnrX is represented as a dimer. The physical interaction of CnrY and CnrX in the periplasm, or that of CnrY and CnrH in the cytoplasm, is inferred from their functional interaction.[23,25] The stoichiometry of the complex is still unknown.

the genome of *Cupriavidus metallidurans* CH34 reveals 17 candidate genes for sigma factors, and 11 of them are ECF sigma factors presumably involved in metal homeostasis,[17] according to the outstanding heavy-metal resistance of this strain.[18,19] *C. metallidurans* CH34 has a complex genome composed of two chromosomes and two indigenous megaplasmids, pMOL28 and pMOL30.[20,21] Among these 11 ECF sigma factors, 10 are encoded by the chromosomes, and one is encoded by pMOL28.[16,17,21] The latter is the metal-responsive CnrH required for the RNA polymerase to initiate transcription at the promoter of the *cnr* (*c*obalt and *n*ickel *r*esistance) determinant.[22] The *cnr* determinant is composed of two operons: *cnrCBAT* and *cnrYXH*. *cnrCBAT* is under the control of *cnrCp* and encodes the efflux machinery made of the tripartite RND (*r*esistance, *n*odule, and cell *d*ivision) protein complex CnrCBA and the putative transporter CnrT. *cnrYXH*, under the control of *cnrYp*, is necessary for the expression and regulation of *cnrCBAT*.[23–25] It should be noted that the closely related strain *C. metallidurans* 31A contains a *n*ickel–*c*obalt–*c*admium determinant *nccYXHCBAN*, an ortholog of the *cnr* determinant from *C. metallidurans* CH34.[19]

Although NccX and CnrX share 86% similarity (76% identity), most of the studies have been performed on the *cnr* determinant or on the Cnr proteins. In the best-accepted model, CnrX is a membrane-anchored protein with a metal-sensor domain protruding in the periplasm (CnrXs). It interacts with the bitopic protein CnrY that sequesters CnrH on its cytoplasmic side (Scheme 1). It is presumed that binding of metal cation to CnrX in the periplasm triggers a signal propagated to CnrY that leads to the cytoplasmic release of CnrH by a mechanism yet to be determined.[23–27] Besides, a recent study revealed that transcription of the *cnr* genes was triggered not only by the previously identified substrates cobalt and nickel but also by other metal ions such as copper, while zinc was inoperant.[21]

Interestingly, using a CnrXs preparation in which Cu(II) was partially retained during purification, we structurally defined and compared both the apo form and the Cu-bound form of CnrXs.[26] It was concluded that the signal onset could not be explained by substantial conformational changes associated with metallation of CnrXs. However, this preliminary study poorly illustrated the mechanisms of signal sensing and propagation by CnrX, as copper was only present in substoichiometric amounts in the protein samples. In the present report, we have revisited the question of the metal-dependent signal onset by CnrX. For that matter, we have determined the structures of two CnrXs active forms binding Ni or Co ions, as well as that of inactive Zn-bound CnrXs. These structures were compared to each other and to that of the apo form represented by the E63Q mutant. We suggest a structure-based allosteric mechanism to describe metal sensing as a function of the ion bound to CnrXs, the sensor domain of CnrX. The spectroscopic properties of the cobalt ion were used to demonstrate that CnrXs is a good model of full-length membrane-bound protein, making the link

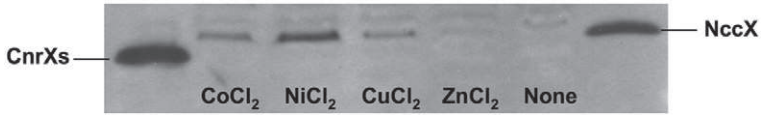


Fig. 1. Immunodetection of CnrX in *C. metallidurans* CH34 challenged with metal salts. Cells were challenged for 2 h with the indicated metal cations introduced at the following concentrations—2 mM $CoCl_2$, 0.6 mM $NiCl_2$, 0.1 mM $CuCl_2$, or 0.8 mM $ZnCl_2$—before they were collected by centrifugation. A control culture without addition of any extra heavy metal was grown in parallel. The experiments were run in duplicate. A sample of each pellet corresponding to the same total amount of protein was heated in electrophoresis denaturing buffer. Total proteins were separated by SDS-PAGE and blotted onto a PVDF membrane. CnrX was revealed by Western blot analysis with rabbit antibodies to CnrXs (1:2000 dilution). Two lanes with pure CnrXs or NccX were loaded as controls. Experiments performed with sulfate as counteranion, instead of chloride, gave similar results.

between metal sensing in the extracellular compartment and TM signal transmission.

Results

In vivo production of CnrX

C. metallidurans CH34 response to metal challenge has been thoroughly investigated in genetic and transcriptomic studies.[21,23,25] Here, *C. metallidurans* CH34 cells were challenged with different metal ions, and detection of CnrX was performed by Western blot analysis with antibodies to CnrXs. A band reacting with the CnrXs antibodies was readily detected in the cells that have been challenged with $NiCl_2$ and, to a lesser extent, in cultures challenged with $CoCl_2$ or $CuCl_2$, showing that these three metal ions are able to elicit a biological response (Fig. 1). This is supported by the previously described positive regulation loop where a self-amplifying response is triggered by the release of CnrH in the cytosol, thus supporting a sustained transcription of *cnrYXH* in response to specific metal challenge.[22–25] The detected band displayed a molecular weight similar to that of the full-length membrane-bound NccX that cross-reacts with CnrXs antibodies. This is in agreement with CnrX present as a membrane-anchored protein. Indeed, CnrX was detected only in the membranes after separation from the soluble fraction (data not shown). On the other hand, unchallenged cells and cells grown in the presence of $ZnCl_2$ contained only background levels of CnrX. These results are in agreement with a previous transcriptomic study[21] and with an *in vivo* assay based on β-galactosidase reporter activity[23] in which nickel ions were identified as preferential inducers of the *cnrX* determinant while zinc was identified consistently as a very poor inducer.

General architecture of CnrXs

With the goal of delineating the mechanism of signal sensing linked to CnrXs metallation, we have determined and compared the structures of Ni-bound, Co-bound, and Zn-bound CnrXs, as well as apo-CnrXs. CnrXs was loaded with 4 Eq of either Co (II), Ni(II), or Zn(II) prior to crystallization. Crystallization conditions are given in Table S1, and crystallographic data are summarized in Table 1 and Table S2.

In all the structures, the peptidic architecture fits to the all-α-fold previously described: each protomer resembles a four-helix bundle in the shape of a hooked hairpin (helices α1–α4 from the N-terminus

Table 1. Crystallographic data collection

	Se-CnrXs	E63Q-CnrXs	Zn-CnrXs	Co-CnrXs	Ni-CnrXs
Data statistics					
Space group	$P2_1$	$P2_1$	$I432$	$P4_12_12$	$P4_12_12$
Resolution range	46.67–1.91	46.52–1.89	44.95–2.30	33.04–1.55	32.20–1.41
(high-resolution shell) [Å]	(2.01–1.91)	(1.99–1.89)	(2.42–2.30)	(1.64–1.55)	(1.48–1.41)
Number of unique reflections	36,868	35,627	14,718	16,626	20,101
R_{merge} (%)[a]	3.5 (23.4)	6.5 (31.7)	9.1 (40.1)	4.7 (33.4)	3.7 (14.7)
$I/\sigma(I)$[b]	13.9 (3.3)	8.6 (2.5)	5.4 (2.0)	12.2 (2.4)	13.2 (5.2)
Completeness (%)	99.0 (95.9)	96.2 (91.8)	99.8 (99.0)	99.1 (95.2)	95.6 (92.1)
Redundancy (%)	6.2 (5.6)	4.2 (4.2)	11.7 (11.8)	7.2 (6.7)	13.8 (13.3)
Refinement statistics					
Number of reflections used	36,813	35,583	14,640	16,579	20,038
R_{work}/R_{free} [%]	18.73/23.82	17.21/21.96	20.70/25.93	17.62/20.38	17.95/19.78
Number of atoms					
Protein + metal	3622	3519	1768	910	892
Solvent	264	428	125	153	176
Other	21	24	5	18	4
⟨*B*-factor⟩ [Å^2]					
Protein	40.06	28.27	46.22	28.27	13.92
Solvent	43.73	36.54	42.07	39.17	25.26
Metal					
Zn_{A1}	—	—	28.25		
Zn_{A2}			44.17	20.32	6.76
Zn_B			34.29		
RMSD					
Bond lengths [Å]	0.006	0.006	0.016	0.017	0.007
Bond angles [°]	0.893	0.894	1.169	1.583	1.064
Ramachandran plot					
favourable + allowed regions [%]	99.5	99.3	100	100	100

[a] $R_{merge} = \sum_h \sum_i |\bar{I}(h) - I_i(h)| \,/\, \sum_h \sum_i |I_i(h)|$, where $I_i(h)$ is the ith measurement of reflection h and $\bar{I}(h)$ is the mean measurement of reflection h.

[b] $I/\sigma(I)$ is the signal-to-noise ratio for merged intensities.

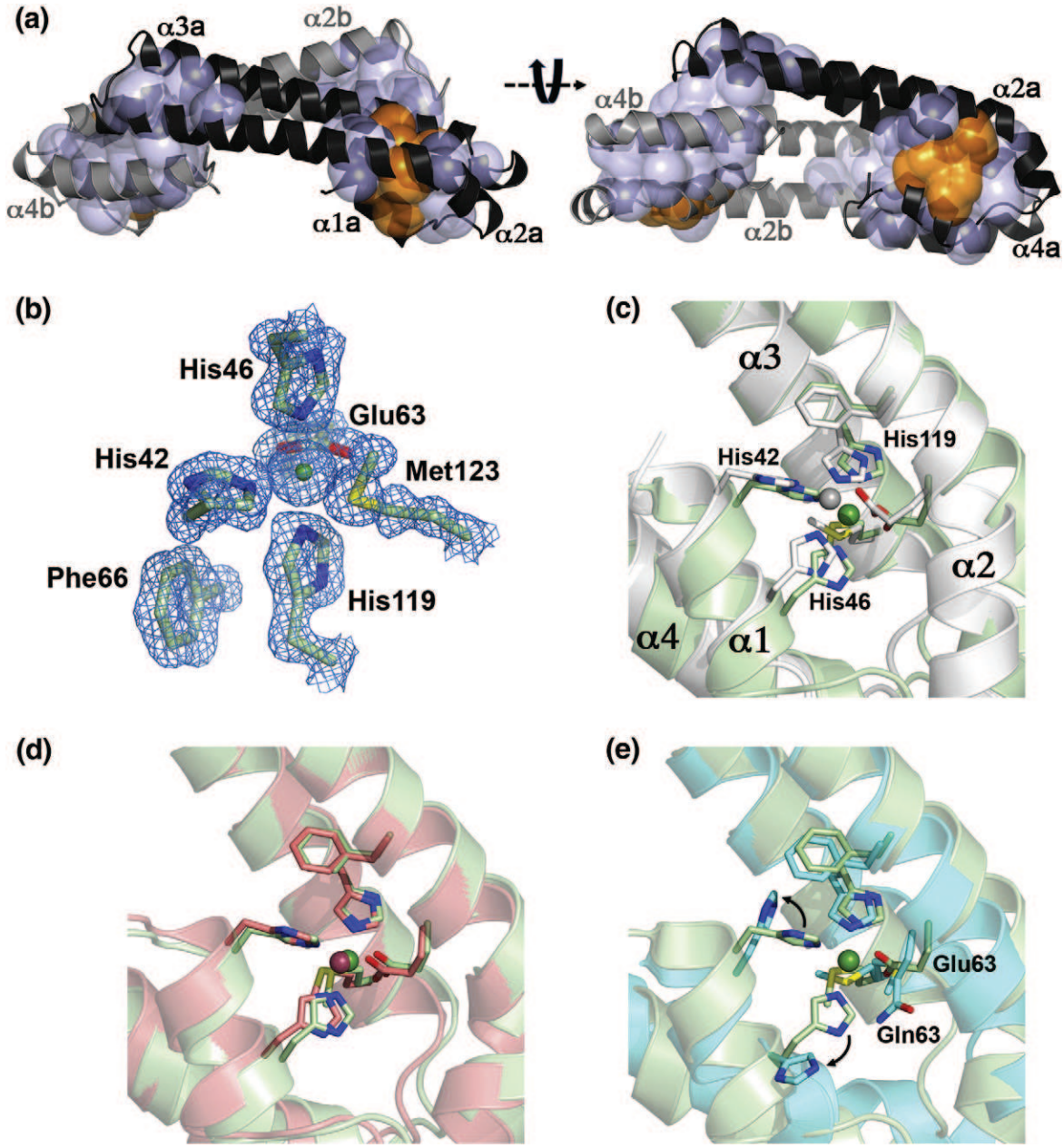


Fig. 2. CnrXs dimer and close-up views of the metal-binding site with different bound metal ions. (a) The backbone structure is that of Ni-bound CnrXs. Protomer A, black; protomer B, gray. The intraprotomer and interprotomer hydrophobic interactions involving conserved residues (Figs. S2 and S3) are represented by light-blue spheres, and orange spheres correspond to the volume occupied by the two metal-binding sites. The two views correspond to a rotation of about 45°. (b–e) Phe66 interacting with His119 is always included in the close-up views. (b) $2F_o - F_c$ electron density map contoured at 1.5σ of the Ni-binding residues and the Ni ion. (c) Superimposition of the 6-coordinate Ni-binding residues and of the 5-coordinate Zn-binding residues. (d) Superimposition of the Ni-binding and Co-binding residues. (e) Superimposition of the metal-binding residues in the presence of Ni or in E63Q-CnrXs. Note that two side-chain conformations are observed for Met123 in E63Q-CnrXs. The conformation of the side chains of the ligand residues is defined as "open" in E63Q-CnrXs and as "closed" in the metal-bound form. This is not true for His119, whose side chain constantly adopted a closed conformation owing to its interaction with Phe66. Color code for peptide backbone and side chains: Ni-bound, pale green; Co-bound, salmon; Zn-bound, white; E63Q-CnrXs, cyan. Color code for metal ions: Ni; green, Co, brown; Zn, gray.

to the C-terminus[26]). Two protomers associate to form a kidney-shaped dimer (Fig. 2a) corresponding to the biological unit. The dimer interface involves 34–36 mainly hydrophobic residues in α2, α3, and α4 helices, making it similar to the interface first described.[26] The dimerization interface represents about 18% of the total solvent-accessible surface. A common network of nonhydrophobic interactions also strongly maintains the ternary structure from Phe66 to the C-terminal amino acid (Fig. S1). A salt bridge between Arg76 and Asp111 locks the hydrophobic interactions between helix α2 and helix α3, while those between α3 and α4 are locked by both a hydrogen bond between Val120 and Tyr135 and a salt bridge between Arg124 and Asp136. The two long helices α2 and α3 also interact through Phe66 and His119 (see the text below) whose side chains interact by π–π stacking.

A mutant form of the protein represents apo-CnrXs

A selenomethionine derivative of CnrXs (Se-CnrXs) putatively representing the apo form of the protein was crystallized and its structure was determined at 1.90 Å resolution (Table 1; Table S2). In a preliminary structural study performed with Se-CnrXs, the protein was found to contain traces of copper.[26] Copper contamination was avoided in the present samples by adding ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to all the purification buffers, except for the last gel-filtration step. Electron paramagnetic resonance has been used to select Cu-free protein samples that were used for crystallization. However, X-ray fluorescence spectra recorded on Se-CnrXs crystals just before diffraction data collection showed a strong peak corresponding to zinc. Metal contamination was further confirmed by detection of anomalous signal in the diffraction data. Based on *B*-factor values, metal occupancy was estimated at 60%, 40%, 25%, and 0%, depending on the four Se-CnrXs molecules per asymmetric unit. These estimations are in agreement with the experimental quantification performed by flame atomic absorption,[28] indicating approximately 1 Eq of Zn per Se-CnrXs dimer (data not shown). In order to produce a "true" apo protein, we changed Glu63, previously identified as a metal–ligand,[26] to Gln. The structure of E63Q-CnrXs, determined at 1.90 Å resolution by molecular replacement with Se-CnrXs as a phasing model, was virtually free of metal ions (Fig. 2e), thus confirming that Zn contamination occurred at the metal-binding site already identified.

Active Ni-bound and Co-bound CnrXs

CnrXs samples loaded with 4 Eq of either Co(II) or Ni(II) prior to crystallization are virtually free of zinc, as judged from flame atomic absorption quantification. In addition, X-ray fluorescence spectra recorded on Ni-CnrXs or Co-CnrXs crystals showed only the presence of nickel or cobalt just before diffraction data collection. Both Ni-bound form and Co-bound form contain one metal ion per monomer, bound in a 3N2O1S coordination sphere (Fig. 2b and d). The residues involved in Ni or Co coordination are remarkably superimposable (Fig. 2d). Four ligands define the equatorial plane. These are the $N^{\varepsilon 2}$ atoms of His42, His46, and His119, and one O atom of Glu63 side chain. The resulting geometry is a nearly perfect square, as evidenced by the metal–ligand atom distances and the angles between the metal and two consecutive ligands (Table 2). The octahedral coordination sphere is completed with two axial ligands (the second oxygen of Glu63 carboxylate and the thioether sulfur of Met123) defining an almost perpendicular axis with respect to the square plane (Table 2). The network of intramolecular interactions between helices α2, α3, and α4 (described in Fig. S1) is common to the Ni-bound and Co-bound forms of CnrXs, and to E63Q-CnrXs (data not shown). The position of the C^{α} of the three residues Phe66, His119, and Met123, along with that of Glu/Gln63, is maintained by these interactions. In addition, the interaction between Phe66 and His119 contributes to position the $N^{\varepsilon 2}$ atoms of the imidazole ring of His119. As a consequence, His119 features the same "closed" conformation in E63Q-CnrXs as in metal-bound forms (Fig. 2e). In contrast to His119, the side chains of all the other metal–ligand residues adopt an "open" conformation in E63Q-CnrXs. This suggests that His119 functions as a metal trap and that the other residues of the binding site fold their side chains

Table 2. Geometry of metal-binding sites

	Ni	Co	Zn_{A1}	Zn_{A2}	Zn_B
Metal–ligand atom distances (Å)					
$N^{\varepsilon 2}$ His38	—	—	2.11	—	—
$N^{\varepsilon 2}$ His42	2.10	2.11	—	2.15	2.10
$N^{\varepsilon 2}$ His46	2.12	2.11	—	2.19	2.01
$N^{\varepsilon 2}$ His119	2.16	2.12	2.07	—	1.98
O1 Glu60	—	—	—	2.10	—
O1 Glu63	2.20	2.13	2.11	—	2.51
O2 Glu63	2.23	2.16	—	—	2.57
S^{δ} Met123	2.45	2.54	—	—	3.90
Cl	—	—	2.30	2.33	—
Angles between the metal and two consecutive ligands in the equatorial plane (°)					
His42/His119	89.25	92.00			
His42/His46	88.56	87.73			
His46/Glu63	93.65	91.92			
His119/Glu63	86.29	90.22			
Angle between the two axial ligands (°)					
Met123/Glu63	155.50	158.00			

towards the metal to complete the coordination sphere.

Inactive Zn-bound CnrXs

Three Zn atoms were localized in Zn-bound CnrXs: two in protomer A and one in protomer B (Fig. S1). In protomer B, the Zn atom (Zn_B) appears in a trigonal bipyramidal geometry with a 3N2O coordination sphere (Fig. 2c, Table 2; Fig. S1) that essentially differs from that of the Ni or Co atom by the lack of contribution of Met123. The Zn_B ligands are provided by the $N^{\varepsilon 2}$ atoms of His42, His46, and His119, along with the two O atoms of Glu63. It is noteworthy that only this 3N2O coordination sphere was observed in the Se-CnrXs protomers partially metalled with zinc.

In protomer A, the metal-binding site observed in all other structures determined so far no longer exists. Instead, it is split into two halves, which, in combination with α1 movement, allow Zn tetrahedral coordination. His38, along with Glu63 and His119, builds a first Zn-binding site (Zn_{A1} in Fig. S1; Table 2). The second Zn-binding site (Zn_{A2}) involves His42, His46, and Glu60 (Fig. S1; Table 2). The two coordination spheres are completed by a chloride ion coming from the crystallization solution. As a result of these rearrangements, α1 residues are shifted 6–7 Å along the α1 axis towards the N-terminus of protomer B. As will be discussed later, we assume that the metallation of protomer A is an artifact caused by both protein construct and crystallization conditions. Consequently, protomer A will not be considered for further structure comparisons.

The hydrophobic core of CnrXs bridges the metal-binding site and the dimer interface

In addition to the network of intramolecular interactions depicted in Fig. S1, the packing of the four-helix bundle defined by the N-terminal half of α2, the C-terminal half of α3, and the shorter helices α1 and α4 in each protomer is stabilized by a hydrophobic core (Figs. 2a and 3b and c). All the residues involved in the hydrophobic core display a high degree of conservation in the 23 members of the CnrX family (Figs. S2 and S3). We have identified Leu41, Leu45, and Val49 in α1; Leu51 in the loop connecting α1 and α2; Leu59 at the N-terminal extremity of α2; Val120 and Phe121 in α3; and Leu127 at the C-terminal extremity of α3. This hydrophobic core extends further to helix α4 (Leu139 and Leu143) and, across the dimer interface, to helices α2 and α3 of the opposite protomer (Leu84, Ile88, and Val98). The two metal-binding sites, made by residues from α1, α2, and α3 in each protomer, form two discrete patches on each face of the dimer and lie surrounded by the hydrophobic core. As a consequence, the four-helix bundle not only accommodates the metal-binding site but also behaves as a globular body on which the end of the α2–α3 hairpin from the opposite protomer is docked (Figs. 2a and 3b and c). Moreover, although the C-terminal half of α2 does not contribute to this patch, it interacts with α3 in the same protomer and makes several contacts with α4 in the opposite protomer. This organization of intraprotomer and interprotomer interactions explains how the metal-binding sites can tune the packing of CnrXs dimer as a function of the bound metal ion.

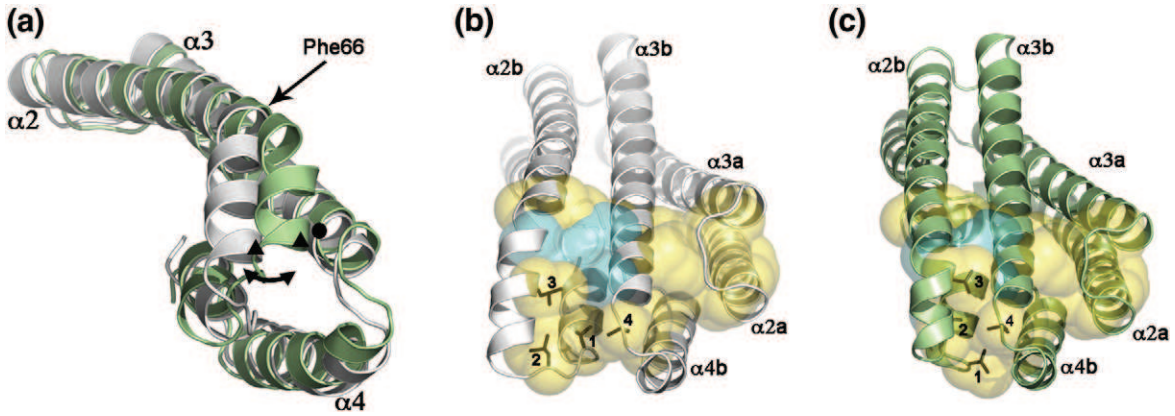


Fig. 3. Comparison of metal-bound CnrXs conformations. (a) Superimposition of the protomer B backbone of Ni-bound and Zn-bound CnrXs in pale green and white, respectively. The straight arrow points to the location of Phe66 in α2, and the double arrow indicates the metal-dependent movement of the α2 N-terminal extremity. This movement is illustrated by the distance between the two positions of Glu55 (black triangles) and that of Met123 (black dot). (b and c) This movement brings together four conserved hydrophobic residues (Figs. S2 and S3) in a hydrophobic clip. These residues—Val49 (1), Leu51 (2), Leu59 (3), and Leu127 (4)—are displayed as brown sticks. The hydrophobic core (gold spheres) connecting the four-helix bundle in protomer B and the α2–α3 hairpin of the opposite protomer surrounds the metal-binding site (blue spheres) and includes the hydrophobic clip.

Metal-dependent conformational modifications: Short-range effects *versus* long-range effects

Four or five residues from helices α1, α2, and α3 are tethered around the metal ion, and this affects the helical bundle in each CnrXs protomer, as exemplified by RMSD calculations. A common set of residues was used to describe the helical bundle, which spans residues 40–66 and 119–145. The superimposition of these residues showed that the RMSD for the helical bundle ranges from 0.24 Å (Co *versus* Ni) to 1.14 Å (E63Q *versus* Ni) to 1.99 Å (Zn_B *versus* Ni) on 54 C^{α}. This result points out the ability of Ni and Co ions to stabilize close yet distinct conformations of the bundle (RMSD<0.3 Å), while the deviation exceeds 1 Å when comparing Zn_B-bound CnrXs or apo-CnrXs to Ni-bound or Co-bound CnrXs (Fig. 4). This denotes significant

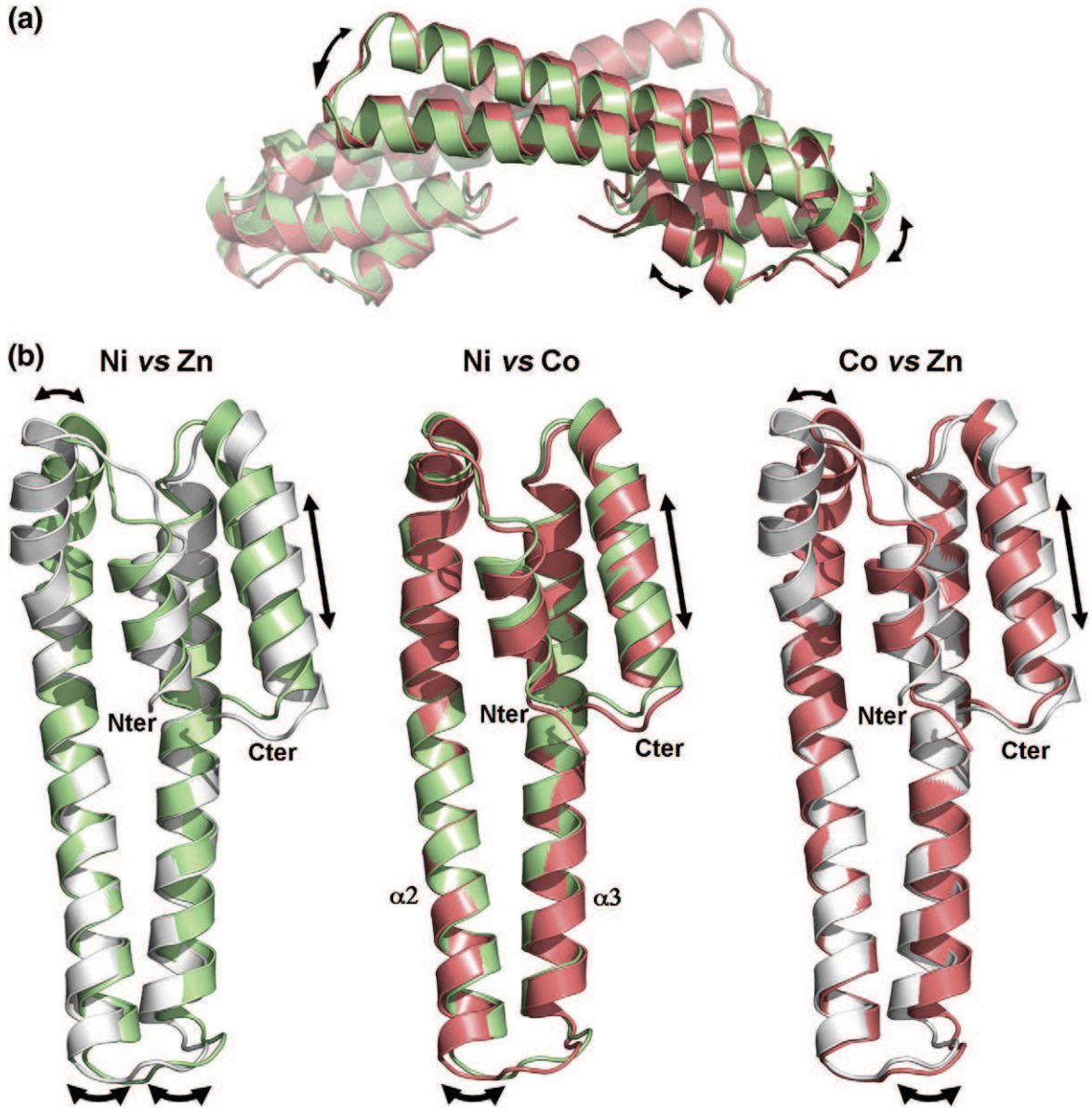


Fig. 4. Metal-induced conformational changes outside the metal-binding site. (a) Superimposition of the dimeric form of Ni-bound CnrXs (pale green) and Co-bound CnrXs (salmon). The double arrows illustrate the metal-dependent breath of the protein. (b) Protomer B has been superimposed in the different metal-bound forms. The top curved double arrows indicate the movement of the N-terminal extremity of α2 triggered by Ni or Co binding. The straight double arrows indicate the metal-dependent translation of helices α1 and α4 (for clarity, only the arrow concerning α4 was drawn). The bottom double arrows illustrate the long-range effects of the metallation leading to the metal-dependent conformational modifications of the hairpin. The color code is described in the legend to Fig. 2.

structural modifications essentially linked to the specific recruitment of the side chain of Met123 (not a Zn ligand) to complete the coordination sphere of Co or Ni ions. The long α2 helix forms a longitudinal bend in the 60-ELKEDAF-66 sequence that includes Phe66 and Glu63, described earlier as crucial for metal binding. This seven-amino-acid sequence also serves as a hinge for a lateral metal-dependent distortion illustrated by the distance between Met123 located in α3 and Glu55 at the N-terminal extremity of α2 (Fig. 3a). This distance of 11.84 Å in the presence of Zn (coordination 3N2O) is shortened to 8.80 Å or 8.67 Å in the presence of Ni or Co (coordination 3N2O1S), respectively. In connection with this observation, the RMSD calculated after the superimposition of the residues of the four-helix bundle of the metalled forms of CnrXs reflects a poor fit for residues between Ala48 and Lys62 (Fig. 4). After the exclusion of this region from the whole sequence, the RMSD calculated now on 93 C^{α} atom pairs ranges from 0.69 Å (Co *versus* Zn) to 0.91 Å (Ni/Zn). Thus, local conformational changes induced by Co(II) do not propagate as well as those induced by nickel ions (active form), leaving most CnrXs in a conformation close to the inactive Zn-bound form of CnrXs (Fig. 4b).

The changes affecting residues Ala48 to Lys62 also affect the geometry of the metal-binding site, which is trigonal bipyramidal in the presence of Zn *versus* octahedral in the presence of Ni or Co (Fig. 2). Besides, the side chains of four previously identified hydrophobic residues—Val49, Leu51, Leu59, and Leu127—come closer upon binding of Ni or Co ion and form a hydrophobic clip that stabilizes the position of the N-terminal end of α2 (Fig. 3b). The Ni-dependent or Co-dependent lateral distortion drags the loop that connects α1 and α2 and, by action on the globular hydrophobic body, causes a movement of translation for both α1 and α4 (Fig. 4).

The Met123 side-chain recruitment to the coordination sphere of Ni or Co ions is a remarkable qualitative change that switches on the sensing mechanism and thus typifies the active form of the protein. However, while the coordination spheres are almost identical and the bundle conformations are very similar in Ni-bound and Co-bound CnrXs, the protein is able to distinguish between Ni binding (strong inducer) and Co binding (weaker inducer). The distinction relies mainly in the distance from the metal ion to S^{δ} of Met123, which is longer for Co (Table 2). This subtle difference is propagated by the network of hydrophobic interactions described above, then affects the relative orientation of the protomers within the dimer. In the Co-bound form, the bending of the N-terminal part of α2 and the C-terminal part of α3 is accentuated; consequently, the dimer is more compact than the Ni-bound dimer (Fig. 4a). Another consequence is that the two short helices α1 and α4 tip towards the concave face of the kidney-shaped dimer. Thus, although the local effects of Ni *versus* Co binding in each protomer are very modest, the metal-binding site is in position to fine-tune the whole CnrXs dimer hydrophobic packing.

CnrXs is a good structural model of the full-length protein

The electronic properties of Co(II) are very dependent on ligand field strength and on the geometry of the ligands. This makes the Co(II) ions a very useful spectroscopic probe of metal-binding sites and a very good tool to compare CnrXs and the full-length protein. Unfortunately, while membrane-anchored CnrX could be strongly overproduced in *E. coli* as judged from the SDS-PAGE analysis of the purified membrane fractions (Fig. S4), solubilization and purification of this protein have so far been unsuccessful. However, this was possible with its closest homologue NccX, which was purified by a two-step procedure. With pure NccX, spectrophotometric changes were analyzed between 300 nm and 700 nm as a function of increasing amounts of $CoCl_2$. The electronic absorption difference spectra displayed in Fig. 5a show that two consecutive additions of 1 Eq of Co led to the appearance of a major *d–d* transition band centered at 495 nm with two shoulders at 435 nm and 525 nm, and that 2 Eq of Co was required to saturate NccX. On the other hand, single-crystal spectroscopy[30] performed with Co-bound CnrXs revealed that the corresponding crystals also contain high-spin Co(II) in a coordination sphere similar to that of the Co ions in NccX. Moreover, as in Co-bound NccX solution, two cobalt ions were detected per dimer in CnrXs crystals. The relationship between the *d–d* transition band intensity in the electronic spectra and the number of Co coordination can be used to deduce the geometry of the complexes. For Co-bound NccX, the wavelength maximum and the extinction coefficient value (around 75 M^{-1} cm^{-1}) are in agreement with high-spin Co(II) either in an octahedral coordination geometry or in a pentahedral coordination geometry.[31,32] Structure determination of Co-bound CnrXs allowed us to discriminate between these two hypotheses and to substantiate the octahedral geometry. Taken together, these results strongly suggest that CnrXs is a very good structural model of the NccX metal-sensor domain, as expected from the 80% sequence identity shared by the two metal-sensor domains.

Relative affinities of Ni, Co, and Zn for CnrXs

Changes in the UV–visible spectra of metal-bound CnrXs were also used to compare the relative affinities of the different metal ions for CnrXs. Because the N-terminal extremity adventitiously

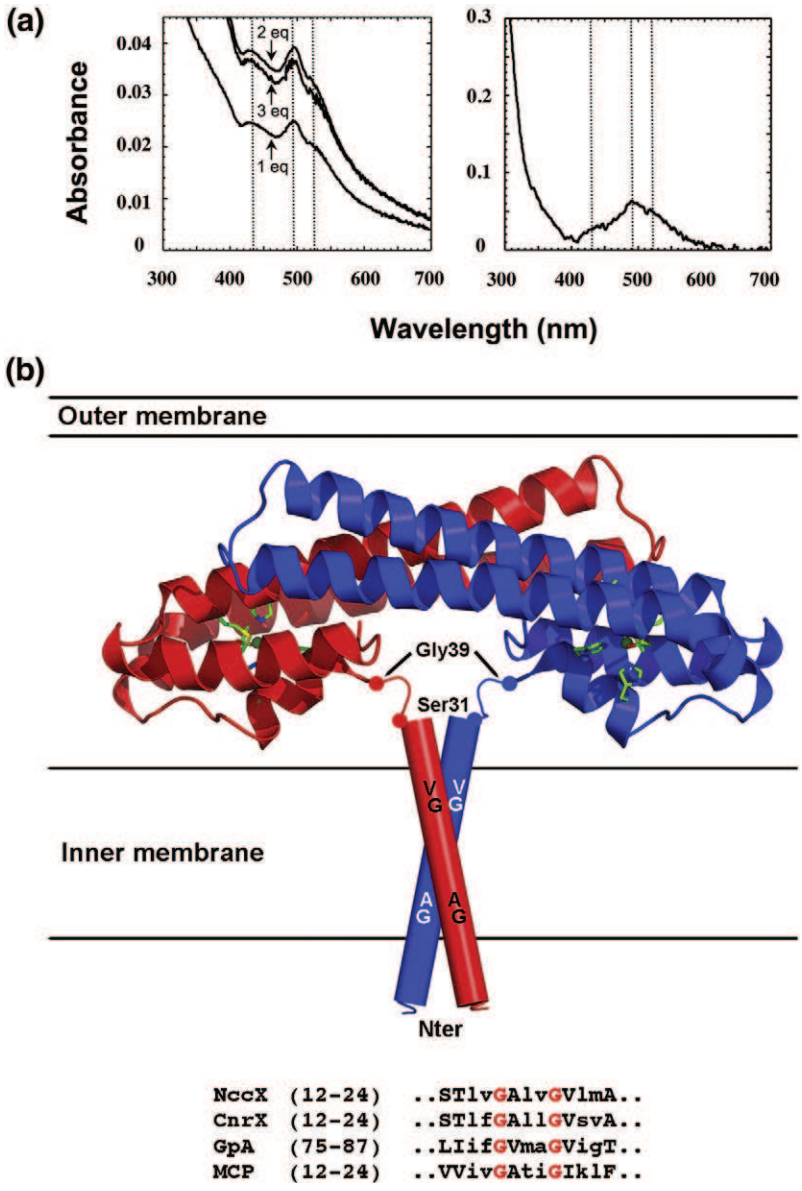


Fig. 5. (a) Visible spectroscopic characterization of Co-bound NccX and CnrXs. Left: Titration of pure NccX with iterative addition of 1 Eq of $CoCl_2$. The electronic absorption spectra obtained by subtraction of the apo protein spectrum show the saturation of the reaction after the addition of 2 Eq of Co. Right: Visible absorbance of a Co-bound CnrXs single crystal. The dotted vertical lines mark the common absorbance maximum at 495 nm and the shoulders at 435 nm and 525 nm between the two species. Note that the spectra of Co-bound H32A-CnrXs shown in Fig. S5 display the same features. (b) Model of the full-length membrane-bound CnrX. Gly39 is the first N-terminal residue to be structurally defined in the CnrXs construct that starts with Ser31.[26] This model, based on the fact that the CnrX TM segments contain the consensus sequence GxxxG, is inspired by Terwilliger *et al.*[29] The dimeric interfacial residues surrounding the GxxxG motives and demonstrated to be very important for the long-range control and tuning of the affinity and dynamics of TM helix–helix interactions[29] are in shown in upper-case letters. GpA, glycophorin A; MCP, M13 major coat protein. The Gly positions are shown in red.

binds extra metal ions in solution (data not shown), these experiments were performed with the H32A-CnrXs mutant, in which His32 was replaced with Ala. The results are depicted in Fig. S5. Figure S5a and b shows that the spectrum of Ni-bound or Co-bound H32A-CnrXs was not modified after the addition of an excess of Zn. Conversely, when the protein was first loaded with Zn (Zn is spectroscopically silent), addition of Ni or Co led to the appearance of the corresponding metal-bound H32A-CnrXs spectra (Fig. S5c and d). On the other hand, addition of Co onto Ni-loaded H32A-CnrXs (Fig. S5e) or addition of Ni onto Co-loaded H32A-CnrXs (Fig. S5f) led to complex spectra exhibiting the spectroscopic signature of the two species. Finally, addition of a stoichiometric mixture of Ni and Co to H32A-CnrXs led to the appearance of a spectrum (Fig. S5g) revealing two populations of metal-bound proteins in proportion that are difficult to estimate. Altogether, these results are consistent with Ni and Co having similar affinities for CnrXs, with this affinity being higher than the affinity of Zn for the protein.

Discussion

CnrXs is the periplasmic sensor domain of the CnrYXH complex that contributes to regulate the expression of the genes involved in cobalt and nickel in *C. metallidurans* CH34. This resistance is induced by the release of the ECF sigma factor CnrH from the

CnrYX complex upon sensing an increasing amount of Co or Ni in the environment. This suggests that the sensor domain is specific for the recognition of these metal ions. Transcriptomic and *in vivo* data indicate that Ni is a better inducer of the *cnr* cluster than Co,[21,23,25] while Zn was consistently shown to be a very poor inducer of *cnr* gene expression.[21,23] It is likely that these differences in induction level arise from the metal-dependent signal onset that leads to the release of CnrH after TM signal transduction. Gene induction was also detected after addition of Cu(II), Cd(II), and Pb(II).[21] However, no involvement of the *cnr* cluster was observed in copper or lead resistance.[33] The immunodetection of CnrX in *C. metallidurans* CH34 confirms that Ni, Co, and even Cu ions are able to elicit a biological response, and that Zn ions are not able to elicit a biological response, although they are able to bind the protein, as demonstrated in the present study.

In a previous work,[26] we determined the structure of CnrXs presumably in the apo form at 1.74 Å resolution. Actually, this form was contaminated by a substoichiometric amount of copper retained during purification. The asymmetric unit was found to contain four CnrXs molecules organized in two dimers constituted of a mixture of partially metalled CnrXs and apo-CnrXs. This heterogeneity, combined with the fact that Cu ions are very weak inducers, probably explains why a link between conformational changes and signal onset failed to be established. To perform a structural study comparing the active and the inactive metal-bound forms of the protein, we purposely loaded CnrXs with the two strongest inducers Ni and Co, or with Zn ions. Before adding the different metal ions, we had extracted and purified CnrXs in the presence of EDTA in order to obtain a protein without adventitious copper. However, a substantial amount of zinc contaminated these new CnrXs preparations, as judged from anomalous signal, fluorescence spectroscopy, and metal assessment and quantification by flame atomic absorption. This is consistent with the Irving–Williams series trends,[34] and the Zn ion comes probably from the buffer used during the last purification step performed in the absence of EDTA. This points out the difficulty of characterizing an apo form of the protein.

The structure of inactive Zn-bound CnrXs was determined from a protein loaded with 4 Eq of Zn-acetate. It revealed the binding of 3 Eq of Zn per dimer: two in protomer A and one in protomer B. Despite its potential as a conformational trigger, the remodeling of loop α1–α2 in protomer A and the accompanying 6–7 Å shift of α1 to accommodate two Zn ions are likely artifacts. Several lines of evidence support this hypothesis. First, an *in vivo* study of CnrX mutants where histidine residues were substituted by arginine residues showed that His38 replacement affects only slightly the inducibility of the *cnr* determinant, in contrast to the phenotype of His42 or His46 substitution (i.e., His38 is not involved in metal binding by the physiologic full-length CnrX protein).[24] Second, in contrast to the residues involved in canonical binding sites (Fig. S3), His38 and, to a lesser extent, Glu60, whose relocation makes zinc coordination possible, are not strictly conserved in the proteins of the CnrX family. Third, the tetrahedral geometry of Zn_A was not observed in the Zn-contaminated Se-CnrXs form, making this coordination sphere an isolated case. Finally, the degree of freedom of the N-terminal end of CnrXs is assumed to be higher than one would expect in the N-terminally membrane-embedded CnrX (Fig. 5b). The involvement of His38 and Glu60 is thus probably only possible because CnrXs is a truncated form of CnrX.

Zn ions were no longer present in the active forms containing either nickel or cobalt. Accordingly, no zinc was detected by flame atomic absorption in the CnrXs samples loaded with 4 Eq of either Co(II) or Ni(II) prior to crystallization, and the X-ray fluorescence spectra recorded on Ni-CnrXs or Co-CnrXs crystals did not show extra peaks due to metal contamination. With the exception of the contribution of Met123, the metal ion ligands are similar in the Ni-bound and Co-bound forms, as well as in Zn-bound CnrXs, as far as protomer B is concerned. In agreement with the relative affinities of the different metal ions for CnrXs and thus owing to a better affinity for the protein, Ni or Co ions were able to displace the Zn ions from the metal-binding sites.

Our study points out the pivotal roles of Phe66, His119, and Met123 in the sensing mechanism of CnrX. Phe66, which does not participate directly in metal ion binding, stabilizes the side chain of His119 by interaction with the phenyl ring. This gives to the $N^{\varepsilon 2}$ atom of the imidazole ring of His119 the crucial role of attracting metal ions. The contribution of Met123 to the metal-binding site marks the difference between the inactive state (Zn-bound) and the active state (Ni-bound or Co-bound). While the Zn ion is pentacoordinated in a 3N2O sphere, Ni or Co ions recruit the thioether sulfur of the only methionine (Met123) residue of the sequence as a sixth ligand. One of the consequences is the dramatic change in the geometry of the metal-binding site (trigonal bipyramidal in the presence of Zn *versus* octahedral in the presence of Ni or Co) observed as a function of the bound metal ion. These geometries are in agreement with the preferences of the respective metal ions.

The recruitment of Met123 as a sixth ligand for Ni or Co binding tunes the metal-binding sites by dramatically changing its geometry. It causes the translation of the two helices α1 and α4 essentially by imposing a new position on the N-terminal part

of α2. The protein in its active state can further discriminate between the strong Ni inducer and the poor Co inducer by a gradient of short-range to long-range effects that fine-tune the metal sensor. Local effects of Ni *versus* Co binding start with modest changes in the metal–ligand distances, especially for the thioether sulfur of Met123. These subtle changes affect (i) the helical bundle around the binding site, (ii) the α2–α3 helical hairpin protruding from the globular bundle, and (iii) the relative orientation of the protomers within a dimer. It ends up in the movement of helices α1 and α4. The hydrophobic core that docks the globular body of one protomer to the α2–α3 hairpin of the opposite protomer provides an efficient coupling between chemical changes (metal binding) and mechanical changes (movements of the protein) by global optimization of the intrinsic dynamics of the overall protein, as defined by Dutta and Bahar.[35] The CnrXs dimer can thus be described as "contracted" in the presence of Co and "relaxed" in the presence of Ni, suggesting that the discrimination between Ni sensing and Co sensing is coupled to a metal-dependent breath of the protein. In view of Ni conformation being the reference for maximal induction, it appears that the Co conformation stabilizes only some of the features necessary for maximal induction and that Co-bound CnrXs is structurally closer to inactive Zn-bound CnrXs. This correlates well with the fact that Co(II) is a weaker inducer of the *cnr* response than Ni(II) and may be due to a lower performance of Co(II) to promote local conformational changes that also propagate those induced by Ni(II).

The close structural similarity of CnrXs to the copper-sensing transcriptional regulator CsoR must be noted. CsoR also adopts a homodimeric anti-parallel helical bundle architecture, as shown by the recent crystal structures of the proteins from *Mycobacterium tuberculosis*[36] or *Thermus thermophilus*.[37] Besides, a spectroscopic study of CsoR from *Bacillus subtilis* was performed.[38] These three proteins are activated upon the binding of Cu(I) in a trigonal S_2N coordination site. Interestingly, *B. subtilis* and *T. thermophilus* CsoR are also capable of binding Ni(II), Zn(II), and Co(II). However, if the protein from *B. subtilis* adopts a nonnative metal coordination in these cases, *T. thermophilus* CsoR is converted into its active form. Moreover, the crystal structure of *T. thermophilus* CsoR suggests that metal binding involves the His-Cys-His-His motif found in *E. coli* RcnR, which binds both Ni(II) and Co(II) with a 6-coordinate octahedral geometry.[2,39] Although the three-dimensional structure of RcnR is still unknown, it is predicted to belong to the CsoR structural family. In RcnR, each metal coordinates a conserved Cys ligand, but with distinct M–S distances. This single-cysteine thiolate ligation would seem to be crucial for metal discrimination by RcnR, as would be the methionine thioether ligation in CnrX.

CnrX is part of a complex involved in TM signal transduction, together with the anti-sigma factor CnrY and the ECF sigma factor CnrH. A functional interaction between CnrX and CnrY has been demonstrated.[23,25] The physical interaction between CnrX and the bitopic protein CnrY has also been shown by a two-hybrid assay.[24] Thus, signal propagation could proceed through a modulation of CnrX–CnrY interaction after metal sensing in the periplasm.

The TM segments of CnrX contain the consensus sequence GxxxG. This scaffold is known to mediate TM helix–helix interactions[40–43] and is conserved in NccX. Thus, while CnrXs N-termini are unresolved in the structures presented, it is probable that they converge to build a two-helix TM domain in the CnrX dimer. Consequently, the CnrX dimer interface is distributed between the membrane and the periplasmic domains (Fig. 5b). Likewise, CnrX–CnrY interaction should involve the periplasmic domains of the two proteins and/or their TM helices.[24]

Based on this topology, signaling could originate from TM domains and/or periplasmic domains. Within the membrane, the interactions between the TM helices would be sensitive to any movement of α1 depending on the metal status of CnrX. This could affect the suggested interaction between the CnrX TM domains and the CnrY TM domains, leading to the destabilization of CnrH–CnrY. In the periplasmic side, CnrY would interact with the CnrXs hydrophobic cavity. Indeed, we can speculate that the rather hydrophobic C-terminal end of CnrY is docked in the hydrophobic cavity of the CnrXs dimer facing the membrane. Metal-induced conformational changes, a main result of this study, would affect CnrX hydrophobic cavity, thus destabilizing CnrX–CnrY interaction leading to the release of CnrH in the cytoplasm.

There are currently no structural data for whole signaling receptors, including both the sensor part of the protein (CnrXs in our model) and the TM transmitter. This study opens the way to understanding how a signal sensed in the extracellular compartment is transmitted across the membrane.

Experimental Procedures

Site-directed mutagenesis and CnrX purification

CnrXs, spanning residues 31–148, represents the soluble sensor domain of the membrane-bound protein CnrX. In this study, full-length numbering was used to identify the amino acid residues. Primers used for directed mutagenesis designed to replace Glu63 with glutamine, or His32 with alanine, are described in Supplemental Experimental

Procedures. CnrXs and the mutated proteins were overexpressed and purified as previously described,[26] with the following modifications: the solutions were buffered at pH 8.0, and they all contained 2 mM EDTA, except for the last step of gel filtration. The experimental mass of the CnrXs mutants was measured by mass spectrometry analysis, as already described,[26] and compared with the corresponding theoretical mass in order to ascertain the mutations. Throughout this article, CnrXs refers to a dimer; therefore, all concentrations given are those of the dimeric protein.

Regarding full-length proteins, the DNA fragments expected to encode CnrX have been already published.[26] The strain for NccX overproduction was constructed the same way. Details for the construct of the strain overproducing NccX and for purification of this protein are given in Supplemental Experimental Procedures.

Protein concentrations were determined using bovine serum albumin as standard and using the Micro BCA protein assay (Pierce). Routinely, experimental or theoretical molecular extinction coefficients at 280 nm were used. Metal ion quantification was performed by flame atomic absorption (Perkin-Elmer 560 Norwalk) using an external calibration curve, as described by Arnaud *et al.*[28]

Metal-dependent *in vivo* expression of CnrX

Precultures of *C. metallidurans* CH34 were obtained by growing the cells aerobically at 30 °C in the previously defined liquid mineral salts medium 284 with 2% wt/vol gluconate as the sole carbon source[44] until an A_{600} of 1 had been reached. Five precultures were used to inoculate five cylindroconical flasks containing 1 liter of fresh culture medium ($A_{600}=0.01$), which were allowed to grow in the dark at 30 °C and 150 rpm in an orbital shaker until an A_{600} of 0.5 had been reached. At this time, the chloride salt of different metal cations was introduced at the concentrations used by Monchy *et al.*: 2 mM $CoCl_2$, 0.6 mM $NiCl_2$, 0.1 mM $CuCl_2$ or 0.8 mM $ZnCl_2$.[21] Two independent experiments, as well as two control cultures without metal added, were run in parallel. After the cultures had been grown for two additional hours, the cells were collected by centrifugation. A sample of each pellet was heated in electrophoresis denaturing buffer. The total proteins were separated on SDS-PAGE and blotted onto PVDF membranes. Western blot analysis with rabbit antibodies to CnrXs was performed with the ECL™ Western Blotting Analysis System (GE Healthcare). A lane with pure NccX was loaded as control.

UV–visible spectroscopy

UV–visible spectra were recorded at room temperature in a quartz cell of 10 mm light path using a Cary 50 Bio (Varian, Inc.) spectrophotometer. The cuvette was filled with 0.125 mL of CnrXs at the concentration indicated in the corresponding legends (150–200 μM) in 50 mM Hepes (pH 8.0) and 100 mM NaCl. The first spectrum was recorded before the addition of the metal of interest. Then, small aliquots of metal ions were added from freshly prepared stock solutions of their chloride salt in water so that the dilution was considered negligible. A spectrum was recorded immediately after each addition.

Single-crystal microspectrophotometry was carried out at the Cryobench laboratory of the Institut de Biologie Structurale/European Synchrotron Radiation Facility (ESRF; Grenoble, France).[30] Absorption spectra of Co-bound CnrXs crystal were measured at 100 K using a deuterium tungsten halogen lamp (Mikropack DH2000-BAL; Ocean Optics, Dunedin, FL) and a CCD-based spectrometer (HR2000+; Ocean Optics).

Structure determination and refinement

Crystals of the different forms of CnrXs used in this study were obtained by the hanging-drop method. Crystallization conditions are given in Table S1. Before data collection, crystals were harvested in a loop, soaked in a cryoprotectant solution (Table S1), and frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at the synchrotron radiation beamlines FIP-BM30A (ESRF) and PROXIMA-1 (SOLEIL Synchrotron, Saint-Aubin, France). Data integrated using XDS[45] were scaled and converted into amplitudes using SCALA and TRUNCATE from the CCP4 package.[46] Three different space groups were obtained, depending on the bound metal (Table 1; Table S2). For Ni-CnrXs and Co-CnrXs, the asymmetric unit contained one monomer, and the dimer was recovered by crystallographic symmetry. The structures of the metal-bound forms were determined *de novo* by using the anomalous signal of the bound metal by either single-wavelength anomalous diffraction experiments or multiwavelength anomalous diffraction experiments. The coordinates of the anomalous scatterers were determined using either the procedure PHENIX.HYSS[29] or the program SHELLXD.[47] Heavy-atom refinement and initial phasing were performed using SHARP.[48] Phases from SHARP were improved by density modification using the CCP4 program DM[49] (Table S3). Automatic model building was performed using the program Buccaneer[50] from the CCP4 suite. The structure of Se-CnrXs was determined by multiwavelength anomalous diffraction. Using the automatically built model as starting point, we refined structures of CnrXs with PHENIX.REFINE (Table S2). Structure inspections and manual binding were performed using Coot.[51] Water molecules were automatically generated by the procedure PHENIX.REFINE by looking for peaks greater than 1σ on the $2F_o-F_c$ electron density map that were fulfilling the default geometric criteria. The water molecules generated were manually checked using Coot. TLS (*t*ranslation *l*ibration *s*crew) refinement was performed. TLS groups were determined using the TLSMD server.[52] The structure of Se-CnrXs was used as starting model for the determination of the E63Q-CnrXs structure. To limit bias in structure comparison, we used the same set of R_{free} flag for both structure refinements. The structure superimpositions were performed using the program LSQKAB from CCP4. For monomer comparisons, the superimposition was performed by selecting residues 65–83 and 103–122 from the H2 and H3 helices, respectively. For dimer comparisons, the superimpositions were performed through Secondary Structure Matching option. Structure figures were generated with PyMOL‡ (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA).

‡ http://www.pymol.org

Accession numbers

Coordinates and structural factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession numbers as follows: Ni-CnrXs (2y39), Co-CnrXs (2y3b), Zn-CnrXs (2y3d), Se-CnrXs (2y3g), and E63Q-CnrXs (2y3h).

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.jmb.2011.03.014

Acknowledgements

We sincerely thank Dr. Natalie Leys and her group for providing us pellets of *C. metallidurans* CH34 cells challenged with different metal ions, Dr. Josiane Arnaud for metal quantification by flame absorption spectrometry, Dr. Antoine Royant for his help during single-crystal spectroscopy, and the HTX laboratory team from the Partnership for Structural Biology for access to the nanodrop crystallization robot. The staff members of beamline FIP-BM30A at the ESRF and beamline PROXIMA-1 at the SOLEIL Synchrotron are acknowledged for their help during data collection.

References

1. Giedroc, D. P. & Arunkumar, A. I. (2007). Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Trans.* **7**, 3107–3120.
2. Ma, Z., Jacobsen, F. E. & Giedroc, D. P. (2009). Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* **109**, 4644–4681.
3. Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D. & Robinson, N. J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. *Nature*, **460**, 823–830.
4. Waldron, K. J. & Robinson, N. J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 25–35.
5. Alba, B. M. & Gross, C. A. (2004). Regulation of the *Escherichia coli* σ^E-dependent envelope stress response. *Mol. Microbiol.* **52**, 613–619.
6. Brooks, B. E. & Buchanan, S. K. (2008). Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1930–1945.
7. Masher, T., Helmann, J. D. & Unden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 910–938.
8. Raivio, T. L. & Silhavy, T. J. (2001). Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 591–624.
9. Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215.
10. Staroń, A., Sofia, H. J., Dietrich, S., Ulrich, L. E., Liesegang, H. & Mascher, T. (2009). The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol. Microbiol.* **74**, 557–581.
11. Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. & Bautz, E. K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, **221**, 43–46.
12. Murakami, K. S., Masuda, S. & Darst, S. A. (2002). Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science*, **296**, 1280–1284.
13. Helmann, J. D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* **46**, 47–110.
14. Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E. & Buttner, M. J. (1994). Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 7573–7577.
15. Paget, M. S. & Helmann, J. D. (2003). The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* **4**, 203.
16. Nies, D. H. (2004). Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. *Arch. Microbiol.* **181**, 255–268.
17. Grosse, C., Friedrich, S. & Nies, D. H. (2007). Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 227–240.
18. Janssen, P. J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A. *et al.* (2010). The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One*, **5**, e10433.
19. von Rozycki, T. & Nies, D. H. (2009). *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **96**, 115–139.
20. Mergeay, M., Monchy, S., Vallaeys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P. *et al.* (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 385–410.
21. Monchy, S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaeys, T., Taghavi, S., van der Lelie, D. & Mergeay, M. (2007). Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J. Bacteriol.* **189**, 7417–7425.
22. Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R. A. & Schlegel, H. G. (1993). Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* **175**, 767–778.
23. Grass, G., Grosse, C. & Nies, D. H. (2000). Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J. Bacteriol.* **182**, 1390–1398.
24. Grass, G., Fricke, B. & Nies, D. H. (2005). Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. *Biometals*, **18**, 437–448.
25. Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L. & van Der Lelie, D. (2000). Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J. Bacteriol.* **182**, 1399–1409.
26. Pompidor, G., Maillard, A. P., Girard, E., Gambarelli, S., Kahn, R. & Covès, J. (2008). X-ray structure of the

metal-sensor CnrX in both the apo- and copper-bound forms. *FEBS Lett.* **582**, 3954–3958.
27. Pompidor, G., Girard, E., Maillard, A., Ramella-Pairin, S., Kahn, R. & Covès, J. (2009). Biostructural analysis of the metal-sensor domain of CnrX from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Antonie van Leeuwenhoek*, **96**, 141–148.
28. Arnaud, J., Touvier, M., Galan, P., Andriollo-Sanchez, M., Ruffieux, D., Roussel, A. M. *et al.* (2010). Determinants of serum zinc concentrations in a population of French middle-age subjects (SU.VI. MAX cohort). *Eur. J. Clin. Nutr.* **64**, 1057–1064.
29. Terwilliger, T. C., Grosse-Kunstleve, R. W., Afonine, P. V., Moriarty, N. W., Zwart, P. H., Hung, L. W. *et al.* (2008). Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **64**, 61–69.
30. Royant, A., Carpentier, P., Ohana, J., McGeehan, J., Paetzold, B., Noirclerc-Savoye, M. *et al.* (2007). Advances in spectroscopic methods for biological crystals: Part 1. Fluorescence lifetime measurements. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 1105–1112.
31. Bertini, I. & Luchinat, C. (1984). High spin cobalt(II) as a probe for the investigation of metalloproteins. *Adv. Inorg. Biochem.* **6**, 71–111.
32. Maret, W. & Vallee, B. L. (1993). Cobalt as probe and label of proteins. *Methods Enzymol.* **226**, 52–71.
33. Collard, J. M., Provoost, A., Taghavi, S. & Mergeay, M. (1993). A new type of *Alcaligenes eutrophus* CH34 zinc resistance generated by mutations affecting regulation of the *cnr* cobalt–nickel resistance system. *J. Bacteriol.* **175**, 779–784.
34. Irving, H. & Williams, R. J. P. (1953). The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc.* 3192–3210.
35. Dutta, A. & Bahar, I. (2010). Metal-binding sites are designed to achieve optimal mechanical and signaling properties. *Structure*, **18**, 1140–1148.
36. Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S. K., Zhang, L., George, G. N. *et al.* (2007). CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 60–68.
37. Sakamoto, K., Agari, Y., Agari, K., Kuramitsu, S. & Shinkai, A. (2010). Structural and functional characterization of the transcriptional repressor CsoR from *Thermus thermophilus* HB8. *Microbiology*, **156**, 1993–2005.
38. Ma, Z., Cowart, D. M., Scott, R. A. & Giedroc, D. P. (2009). Molecular insights into the metal selectivity of the copper(I)-sensing repressor CsoR from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, **48**, 3325–3334.
39. Iwig, J. S., Leitch, S. L., Herbst, R. W., Maroney, M. J. & Chivers, P. T. (2008). Ni(II) and Co(II) sensing by *Escherichia coli* RcnR. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7592–7606.
40. Berger, B. W., Kulp, D. W., Span, L. M., DeGrado, J. L., Billings, P. C., Senes, A. *et al.* (2010). Consensus motif for integrin transmembrane helix association. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 703–708.
41. Melnyk, R. A., Kim, S., Curran, A. R., Engelman, D. M., Bowie, J. U. & Deber, C. M. (2004). The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix–helix interactions is modulated by long-range communication. *J. Biol. Chem.* **279**, 16591–16597.
42. Senes, A., Engel, D. E. & DeGrado, W. F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 465–479.
43. Zhu, J., Luo, B. H., Barth, P., Schonbrun, J., Baker, D. & Springer, T. A. (2009). The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: integrin alphaIIbbeta3. *Mol. Cell*, **34**, 234–249.
44. Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P. & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* **162**, 328–334.
45. Kabsch, W. (1988). Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. *J. Appl. Crystallogr.* **21**, 916–924.
46. Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **50**, 760–763.
47. Sheldrick, G. M. (2008). A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A*, **64**, 112–122.
48. De La Fortelle, E. & Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction. *Methods Enzymol.* **276**, 43–48.
49. Cowtan, K. D. & Main, P. (1996). Phase combination and cross validation in iterated density-modification calculations. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **52**, 760–763.
50. Cowtan, K. D. (2006). The Buccaneer software for automated model building. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **62**, 1002–1011.
51. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **60**, 2126–2132.
52. Painter, J. & Merritt, E. A. (2006). TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *J. Appl. Crystallogr.* **39**, 109–111.

BIOCHEMISTRY
including biophysical chemistry & molecular biology

Article

pubs.acs.org/biochemistry

Spectroscopic Characterization of the Metal-Binding Sites in the Periplasmic Metal-Sensor Domain of CnrX from *Cupriavidus metallidurans* CH34

Juliette Trepreau,[†] Eve de Rosny,[†] Carole Duboc,[‡] Géraldine Sarret,[§] Isabelle Petit-Hartlein,[†] Antoine P. Maillard,[†] Anne Imberty,[∥] Olivier Proux,[⊥] and Jacques Covès*[,†]

[†]Institut de Biologie Structurale-Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, CNRS-CEA-UJF-Grenoble-1, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France

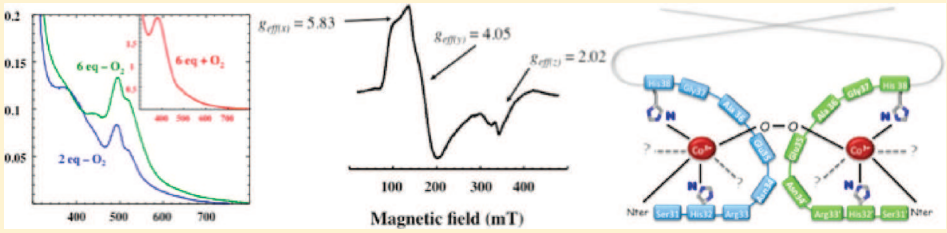
[‡]Département de Chimie Moléculaire, UMR-5250, Université Joseph Fourier Grenoble 1/CNRS, 38041 Grenoble Cedex 9 France

[§]Environmental Geochemistry Group, LGIT, University of Grenoble and CNRS, BP 53, 38041 Grenoble, Cedex 9, France

[∥]Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales - CNRS, 38041 Grenoble cedex 9, France

[⊥]CRG-FAME Beamline, European Synchrotron Radiation Facility, F-38043 Grenoble, France

Supporting Information



ABSTRACT: CnrX, the dimeric metal sensor of the three-protein transmembrane signal transduction complex CnrYXH of *Cupriavidus metallidurans* CH34, contains one metal-binding site per monomer. Both Ni and Co elicit a biological response and bind the protein in a 3N2O1S coordination sphere with a nearly identical octahedral geometry as shown by the X-ray structure of CnrXs, the soluble domain of CnrX. However, in solution CnrXs is titrated by 4 Co-equiv and exhibits an unexpected intense band at 384 nm that was detected neither by single-crystal spectroscopy nor under anaerobiosis. The data from a combination of spectroscopic techniques (spectrophotometry, electron paramagnetic resonance, X-ray absorption spectroscopy) showed that two sites correspond to those identified by crystallography. The two extra binding sites accommodate Co(II) in an octahedral geometry in the absence of oxygen and are occupied in air by a mixture of low-spin Co(II) as well as EPR-silent Co(III). These extra sites, located at the N-terminus of the protein, are believed to participate to the formation of peroxo-bridged dimers. Accordingly, we hypothesize that the intense band at 384 nm relies on the formation of a binuclear μ-peroxo Co(III) complex. These metal binding sites are not physiologically relevant since they are not detected in full-length NccX, the closest homologue of CnrX. X-ray absorption spectroscopy demonstrates that NccX stabilizes Co(II) in two-binding sites similar to those characterized by crystallography in its soluble counterpart. Nevertheless, the original spectroscopic properties of the extra Co-binding sites are of interest because they are susceptible to be detected in other Co-bound proteins.

The β-proteobacterium *Cupriavidus metallidurans* CH34 contains one of the most extensive collection of genetic determinants for metal resistance, making it the archetype of heavy-metal resistant bacteria.[1−4] Resistance mainly relies on its ability to encode redundant RND (resistance nodulation and cell division) heavy-metal efflux pumps. The setup of these detoxification complexes is generally controlled by two-component systems allowing the signal transduction from the periplasm to the cytoplasm. However, the expression of the CnrCBA efflux pump involved in cobalt and nickel resistance in *C. metallidurans* CH34 requires a three-protein transmembrane signal transduction complex called CnrYXH.[5−8] In this complex, CnrY and CnrX are membrane-anchored proteins. CnrX, which possesses a metal-sensor domain protruding in the periplasm (CnrXs), interacts with the antisigma factor CnrY. The latter sequesters CnrH, an ECF-type (extracytoplasmic function) sigma factor, on the cytoplasmic side of the membrane. Metal resistance is induced by the specific release of CnrH from the CnrYX complex upon sensing of increasing amount of Ni or Co in the environment. CnrH is required for the RNA-polymerase to initiate transcription at *cnr* promoters.

We previously determined the three-dimensional structure of CnrXs, a soluble form of CnrX spanning residues 31−148, in different metal-bound forms (Cu, Ni, Co, Zn) as well as in an

Received: July 5, 2011
Revised: September 19, 2011

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

dx.doi.org/10.1021/bi201031q | *Biochemistry* XXXX, XXX, XXX−XXX

apo-form represented by the E63Q-CnrXs mutant.[9−11] CnrXs is a dimer in which each protomer forms a four-helix bundle and contains one metal-binding site. Both Ni and Co ions elicit a biological response while Zn-bound CnrXs represents an inactive form of the complex. A dramatic change of the geometry of the metal-binding site is observed as a function of the bound metal ion: trigonal bipyramidal in the presence of Zn vs octahedral in the presence of Ni or Co. While the Zn ion is pentacoordinated in a 3N2O sphere, Ni or Co ions recruit the thioether sulfur of the only methionine (Met123) residue of the sequence as a sixth ligand. We have proposed that the recruitment of Met123 side chain is the qualitative change that switches on the sensing mechanism by remodeling the four-helix bundle around the metal-binding site.[11]

UV−vis spectra recorded during single-crystal spectroscopy analysis of Co-bound CnrXs exhibited the typical features of hexacoordinated high-spin Co(II). They are thus consistent with the X-ray structure of the metal-binding site. Morevover, these spectra are similar to those of Co-bound NccX, a membrane-bound full-length homologue of CnrX from *C. metallidurans* 31A.[3,11] This strongly suggests that CnrXs is a good structural model of the native protein. However, the Co titration of CnrXs in solution gave unforeseen and unprecedented spectra with an intense band at 384 nm saturating after the binding of 4 Co-equiv per dimer. This shows that CnrXs in solution contains extra-binding sites in addition to those determined by X-ray diffraction. Actually, we have previously demonstrated that the N-terminus sequence of CnrXs is probably involved in the formation of these extra-binding sites since the mutation of His32 for Ala produced a protein unable to display this intense band at 384 nm.[11] H32A-CnrXs is thus a good spectroscopic model of crystallized CnrXs.

As yet, it has not been possible to obtain NccX crystals or CnrXs crystals with more than two Co bound. However, the rich electronic properties of Co(II) make this metal ion a very useful spectroscopic probe. The spectrophotometric characteristics of 4 Co-bound CnrXs along with electron paramagnetic resonance (EPR) and X-ray absorption experiments (XAS) data led us to describe in this report the original spectroscopic properties of a novel Co-binding site that is susceptible to be detected in other Co-bound proteins. XAS was also used to further characterize the metal-binding sites of full-length NccX. The physiologic relevance of the different metal-binding sites is discussed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein Preparation. CnrXs, E63Q-CnrXs, H32A-CnrXs, and NccX were overproduced and purified as previously described.[9−11] Protein concentrations were determined using the Bradford protein assay (BioRad) with bovine serum albumin as standard. Throughout this article, CnrXs refers to a dimer; therefore, all concentrations given are those of the dimeric protein.

Spectroscopic Methods. UV−vis spectra were recorded at room temperature in a quartz cell of 10 mm light path using a Cary 50 Bio (Varian) spectrophotometer. The cuvette was filled with 0.12 mL of CnrXs or CnrXs mutants at variable concentrations in 50 mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl. A first spectrum corresponding to the *apo* form of the protein was recorded. Then, the desired amount of Co was added from a freshly prepared stock solution of $CoCl_2$ in water so that the dilution was considered negligible. A spectrum was recorded immediately after each addition.

X-band EPR measurements were performed at 9.64 GHz with 100 kHz magnetic modulation and a microwave power of 2 mW on a Bruker EMX, equipped with the ER-4192 ST Bruker cavity and an ER-4131 VT. For cobalt, the EPR spectra were recorded at 12 K with an attenuation of 5 G, whereas for copper, the spectra were recorded at 35 K with an attenuation of 3 G. Each sample was constituted of CnrXs or mutants at a concentration of 400−500 μM in Hepes buffer, and the desired amount of $CoCl_2$ or $CuCl_2$ was added. Spectra were recorded as described in the corresponding legend. Simulations have been performed using the EasySpin program.[12] For the simulations of the $S = 3/2$ Co(II) EPR spectra, the spin Hamiltonian $H = \beta gSH + SDS$ has been used, with a positive D corresponding to an $M_s = |\pm^1/_2\rangle$ ground-state Kramers' doublet. Since for Co(II) $|D| \gg \beta gSH$,[13] an arbitrarily value of $D = 50\ cm^{-1}$ was assumed.

For XAS experiments, 100 μL of 1−2 mM sample was transferred right after preparation to a PEEK homemade five-cell sample holder with a Kapton window and flash-frozen in liquid nitrogen. X-ray absorption measurements were carried out at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) which was operating with a ring current of 150−200 mA. Spectra were collected on the BM30B (FAME) beamline[14] using a Si(220) double crystal monochromator with dynamic sagital focusing. The photon flux was of the order of 10^{12} photons/s, and the spot size was 300 μm horizontal × 100 μm vertical (full width half-maximum values). The sample holder was loaded in a helium cryostat with temperature set to 10 K during data collection. All spectra were collected in fluorescence mode by measuring the Co Kα fluorescence with a 30-element solid-state Ge detector (Canberra). For each sample, four to six scans of 40 min each were averaged. Energy calibration was achieved by measuring a cobalt foil and assigning the first inflection point of the spectrum to 7709.0 eV. Data analysis was performed using the IFEFFIT package[15] including ATHENA for the data extraction and ARTEMIS for the shell fitting. E_0 was defined at the half-height of the absorption edge step. k^3-weighted EXAFS spectra were Fourier transformed over the k range 2.6−12.9 $Å^{-1}$ using a Hanning window ($\alpha = 1.0$). Fits were performed on the Fourier filtered spectra over the R range 0.9−4.0 Å. Theoretical amplitude and phase shift functions were calculated with the *ab initio* code FEFF 6.0[16] using the structure of Co-bound CnrXs crystals determined by X-ray diffraction[11] and of *trans*-bis(imidazole)-bis(2-oximinopropionato-N,O)cobalt(III) monohydrate.[17] Various Co(II) and Co(III) reference compounds were used for comparison with the protein spectra, including Co(II) acetate tetrahydrate, [Co(II)ac]; Co(II)(2-methylimidazole)$_4$(BF_4)$_2$, [Co(II)BF_4];[18] Co(III)BG2 (Cambridge Crystallographic Data Centre deposition number, CCDC 832088), Co(III) acetylacetonate, [Co(III)acac], and Co(III) ethylenediamine, [Co(III)en].

When anaerobiosis was required, the solutions were made oxygen-free by incubation in a glovebox under overpressure of nitrogen and nitrogen bubbling for the largest volumes. The mixture for spectrophotometric or EPR analyses were prepared in the glovebox. The spectrophotometric cuvettes or EPR tubes were hermetically closed with a rubber septum in order to keep them anaerobic before subsequent analysis.

Dimer Stabilization Analysis. CnrXs along with E63Q- and H32A-CnrXs were loaded with increasing amount of Co

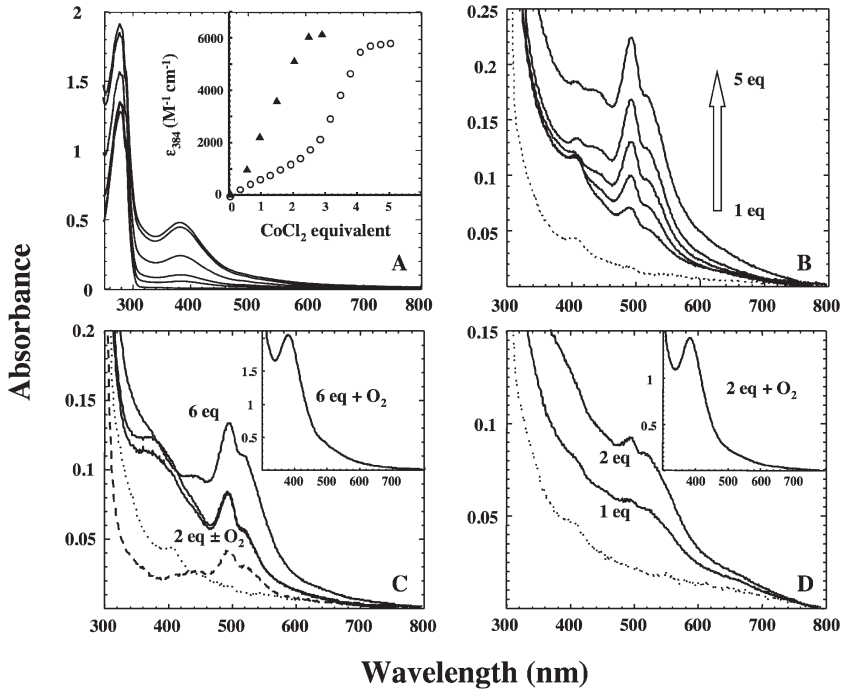


Figure 1. UV−vis spectroscopic characterization of CnrXs, E63Q-CnrXs, and H32A-CnrXs. All spectra were recorded in 50 mM Hepes (pH 8), 100 mM NaCl. (B−D) The spectra displayed in dotted line correspond to the *apo*-protein used in each experiment. (A) Aerobic titration of CnrXs (80 μM) with iterative addition of 1 equiv of $CoCl_2$. The inset shows the plot of the molar extinction coefficient at 384 nm of CnrXs (○) and E63Q-CnrXs (▲) as a function of the number of Co-equiv. (B) Anaerobic titration of CnrXs (564 μM) with iterative addition of 1 equiv of $CoCl_2$. (C) Absorption spectra of CnrXs (406 μM) after addition of 2 and 6 Co-equiv under anaerobiosis. The spectra were also recorded after opening to air (superimposition for 2 Co-equiv and insert for 6 Co-equiv). The spectrum of 2-Co-bound H32A-CnrXs (150 μM) is shown for comparison (dashed line). (D) Anaerobic titration of E63Q-CnrXs (511 μM) with iterative addition of 1 equiv of $CoCl_2$. The inset shows the spectrum of 2-Co-bound E63Q-CnrXs after opening to air.

ions, incubated overnight, and analyzed by SDS-PAGE without boiling the samples. In another experiment, CnrXs and E63Q-CnrXs were loaded with 4 Co-equiv and 2 Co-equiv, respectively, under anaerobiosis. Each sample was divided in two aliquots: one kept under inert atmosphere in the glovebox and the other opened to oxygen. After an overnight incubation, they were also analyzed by SDS-PAGE without boiling the samples.

RESULTS

Spectrophotometric Characterization of the Metal-Binding Sites in CnrXs. The X-ray structure of Co-bound CnrXs showed one binding site per monomer with a 3N2O1S coordination sphere for each metal ion.[11] A schematic representation of the Co-binding site, called site 1 in the following, is given in Figure SI1. It exhibited the typical features of a hexacoordinated high-spin Co(II),[19,20] as shown by the single-crystal visible spectrum of Co-bound CnrXs.[11] However, the titration of CnrXs in solution by stepwise addition of $CoCl_2$ gave different spectra (Figure 1A). The solution turned brownish, and the evolution of the UV−vis spectra was characterized by the concomitant increase of absorbance both at 280 and 384 nm, the reaction being complete at 4 equiv of Co. This increase was not linear. It displayed a first phase corresponding to the binding of 2 Co-equiv with an apparent average molar extinction coefficient of about 500 M^{-1} cm^{-1} per equivalent at 384 nm (ε_{384}), while the second phase corresponded to the binding of 2 extra Co-equiv with an average ε_{384} of 3000 M^{-1} cm^{-1} per equivalent at the same wavelength.

To further characterize the Co-binding properties of CnrXs, we have produced by site-directed mutagenesis the E63Q-CnrXs mutant in which glutamate was replaced by glutamine. Glu63 was demonstrated to be a bidentate ligand of Co(II) in the site 1.[11] As expected, the disappearance of two ligands dramatically affected the ability of the protein to accommodate Co ions in site 1. When E63Q-CnrXs was titrated by stepwise addition of $CoCl_2$, only two Co-binding sites per dimer were revealed with an average ε_{384} of about 3000 M^{-1} cm^{-1} per equivalent (Figure 1A, inset). This strongly suggests that CnrXs contains two extra metal-binding sites in addition to site 1 and explains why 4 Co-equiv was necessary to complete the CnrXs titration. As previously reported,[11] this second site, called site 2 in the following, could be eliminated by mutation of His32. The spectrum of Co-bound H32A-CnrXs is characterized by a major d−d transition band at 495 nm (ε around 75 M^{-1} cm^{-1}) with two shoulders at 435 and 525 nm (ref 11 and Figure 1C). Interestingly, this spectrum is essentially similar to that of CnrXs obtained under strict anaerobic conditions (Figure 1, panels B and C). Titration of CnrXs in the absence of oxygen led to a linear increase in absorbance at 435 nm, up to 4 Co-equiv (Figure 1B). Addition of a fifth Co-equiv caused a general increase of the spectrum assigned to adventitious binding. These results suggest that, in anaerobic conditions, both site 1 and site 2 bind high-spin Co(II) in a similar coordination geometry, demonstrated to be octahedral for site 1.[11] The influence of oxygen was further delineated by opening to air the spectroscopic cuvette after addition of either 2 Co-equiv or of an excess of cobalt (6 Co-equiv in Figure 1C). In the first case, the spectrum did not significantly change after oxygen addition.

dx.doi.org/10.1021/bi201031q | *Biochemistry* XXXX, XXX, XXX−XXX

In the second case on the contrary, the spectrum was immediately modified and corresponded to the one recorded in the presence of oxygen.

A similar experiment was performed with E63Q-CnrXs. Figure 1D shows the titration of this mutant by stepwise addition of 2 Co-equiv under anaeobiosis and the resulting spectrum after opening to air. The spectra of Co-bound E63Q-CnrXs recorded anaerobically resembled a smoothed version of Co-bound CnrXs or H32A-CnrXs, suggesting a mixture of species dominated by hexacoordinated high-spin Co(II). Opening to air after the addition of 2 Co-equiv led to a dramatic change, i.e., the appearance of an intense band centered at 384 nm. The hypothesis that this band was due to protein oxidation, linked to Co-binding to site 2 in the presence of oxygen, was ruled out because the molecular mass of the CnrXs was not affected, as checked by mass spectrometry (not shown). In addition, as CnrXs does not contain any cysteine, the band at 384 nm cannot be due to thiolate-S-to-Co ligand-to-metal charge transfer. Another hypothesis is that the large increase of absorbance at 384 nm could correspond to the evolution of the Co speciation in site 2.

EPR Spectroscopic Characterization of Co-Bound CnrXs. The titration of CnrXs by $CoCl_2$ was followed by EPR spectroscopy. The EPR spectra obtained after addition of 1, 2, or 4 Co(II)-equiv under anerobiosis, and the corresponding spectra recorded after opening the tubes to air are displayed on Figure 2 (upper panel). The spectra are consistent with high-spin $S = 3/2$ Co(II) centers. The integration of the low field part of the spectra can give an estimate of the evolution of the intensity of the high spin Co(II) signal and shows an almost linear increase in magnitude depending on the number of added Co-equiv. Exposure to air did not cause any visible change for both 1-Co(II)- and 2-Co(II)-bound CnrXs spectra, while the intensity of the 4-Co-bound CnrXs spectrum decreased 2-fold. This suggests that, in the presence of air, 2 equiv of Co(II) in the 4 Co-equiv sample have been transformed into EPR-silent species. It is noteworthy that an extra signal centered at $g = 2$ appeared concomitantly. It was assigned to a very small amount of low-spin Co(II). The appearance of this signal denotes a minor structural rearrangement around the metal ion. The EPR spectra obtained from the titration of E63Q-CnrXs by $CoCl_2$ still displayed a typical EPR signature that is typical of a high-spin Co(II) center, but the shape of the spectrum was completely different (Figure 2, middle panel). Opening to air led to the disappearance of this EPR signal and the concomitant appearance of the low-spin Co(II) signal. At the opposite, the EPR signature of two Co-bound H32A-CnrXs was similar to that of Co-bound CnrXs, and this signal remained insensitive to oxygen (Figure 2, lower panel).

The EPR analysis confirms that CnrXs contains four Co-coordination sites. Two Co(II) sites corresponding to site 1 are revealed in H32A-CnrXs, in which the Co(II) center remains insensitive to the presence of air. The other two coordination sites, present in E63Q-CnrXs, are assigned to site 2 in which Co(II) binds before to evolve into EPR-silent species which could be Co(III). The coordinating sites of several metalloproteins have been probed by EPR analysis of their high-spin Co(II)-substituted derivatives.[20−22] However, most of the reported spectra exhibit complicated line shapes. Their analysis is made difficult because $|D|$ is usually much greater than the Zeeman interaction (βgSH) for Co(II). It leads to X-band EPR spectra insensitive to the magnitude of D. Therefore, the only

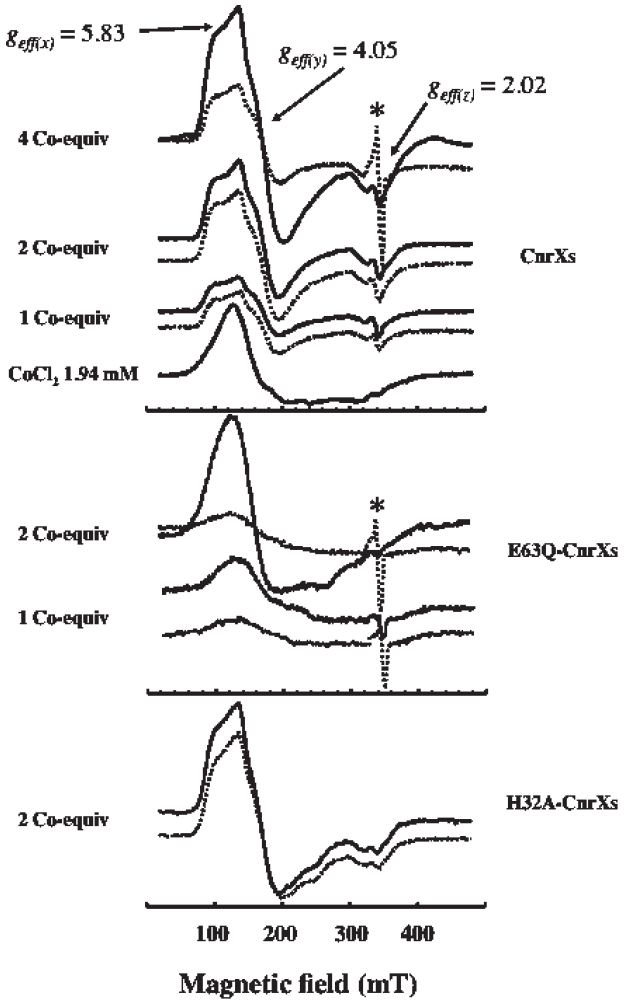


Figure 2. X-band EPR analysis of cobalt binding to CnrXs, E63Q-CnrXs, and H32A-CnrXs. Cobalt was added as $CoCl_2$ from a freshly prepared solution in water. EPR spectra corresponding to samples prepared under anaerobic conditions are shown in solid line. The resulting spectra recorded after opening the tubes to air are in dotted lines. The protein was used at a final concentration of 485 μM (CnrXs), 470 μM (E63Q-CnrXs), and 409 μM (H32A-CnrXs). As a control, the spectrum of free $CoCl_2$ at a concentration corresponding to 4 Co(II) equiv is shown in the upper panel. General EPR conditions are given in the Experimental Procedures section. The signal pointed by an asterisk (*) was assigned to low-spin Co(II) ($S = 1/2$).

relevant EPR parameters that can be extracted are the g_{real} and E/D values.[23] Looking first at site 1, for which a typical EPR spectrum corresponds to two Co-bound CnrXs (simulation given in Figure SI2) or H32A-CnrXs in the presence of air, the turning points are located at $g_{eff(x,y,z)} = 2.02$, 4.05, and 5.83. A plateau can be observed in the transition corresponding to about 510 G, in agreement with a hyperfine coupling of 73 G. This $A(^{59}Co)$ value is in the range (70−90 G) generally found in Co(II)-substituted proteins.[13,23] Therefore, the presence of an unresolved eight-line hyperfine pattern due to the $I = 7/2$ ^{59}Co can be suspected in the low-field absorption feature. Simulation of the experimental data provides the following spin-Hamiltonian parameters for the $M_s = |\pm^1/_2\rangle$: $g_{real(x,y)} = 2.45$, $g_{real(z)} = 2.11$, and $E/D = 0.125$. These parameters are close to those obtained with other Co(II)-containing proteins

dx.doi.org/10.1021/bi201031q | Biochemistry XXXX, XXX, XXX−XXX

and are indicative of either a five- or six-coordinate Co(II) center. Besides, the presence of ^{59}Co hyperfine splitting is consistent with a tetrahedral or octahedral geometry. Therefore, these results are in agreement with a six-coordinate environment for the Co(II) in site 1.[24] The E/D value also gives structural information, in particular the extent of deviation from idealized axial geometry. The E/D value of 0.125 is in agreement with a distorted geometry around the Co(II) center. In addition, the notable deviation of g_{real} from g_e shows a high degree of spin−orbit coupling, as would be expected for a high-spin Co(II) ion in a coordination environment with a relatively low symmetry. The EPR spectra obtained for E63Q-CnrXs recorded in anaerobic conditions corresponds to the signature of the Co(II) in site 2. It displays a large low-field absorbance with no resolvable rhombicity or ^{59}Co hyperfine structure. In addition, the highest field g feature is undetectable. In contrast to site 1, these parameters are consistent with a Co(II) center with much less constraint upon its geometry, characteristic of five- or six-coordinate Co(II) with at least one water ligand.

EPR Spectroscopic Characterization of Cu-Bound CnrXs. To go further in the characterization of CnrXs metal-binding sites, the titration of the protein by $CuCl_2$ has been followed by EPR spectroscopy (Figure 3). The EPR spectra are

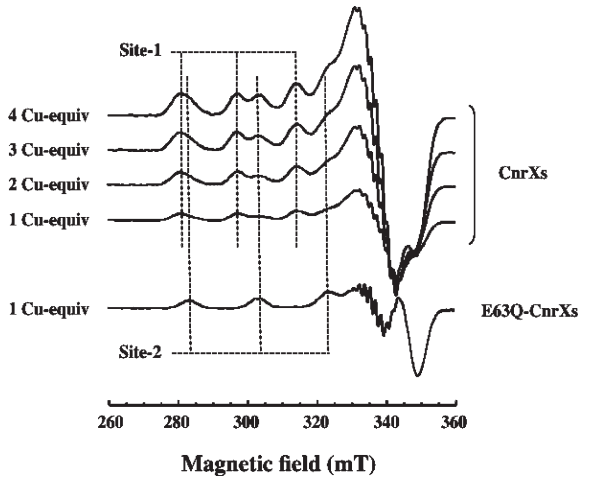


Figure 3. X-band EPR analysis of copper binding to CnrXs or E63Q-CnrXs. Copper was added as $CuCl_2$ from a freshly prepared solution in water. The protein was used at a final concentration of 485 μM (CnrXs) and 470 μM (E63Q-CnrXs). The specific features of site 1 or site 2 in the parallel region are depicted by dotted lines. General EPR conditions are given in the Experimental Procedures section.

consistent with $S = 1/2$ Cu(II) type 2 centers.[25] The complex pattern is indicative of a mixture of two types of Cu(II) sites contributing to all EPR spectra. The two sites can readily be distinguished by examination of the low field features corresponding to the ^{63}Cu hyperfine splitting ($I = 3/2$) in the $g_{\|}$ component. The EPR spectrum of the Cu(II)-bound E63Q-CnrXs (simulation given in Figure SI3), for which only site 2 is retained, was used to help the deconvolution of the Cu-bound CnrXs spectra. It reveals a unique $S = 1/2$ Cu(II) signature characterized by $g_{\|} = 2.194$ and $g_{\perp} = 2.028$ with ^{63}Cu hyperfine coupling of $A_{\|} = 625$ MHz. Superhyperfine interactions arising from $I = 1$ ^{14}N are also observed in the $g_{\perp}$ component with a very complicated pattern involving more than nine lines. Consequently, we can deduce that at least three nitrogen based ligands are involved in the coordination of the Cu(II) in site 2. The subtraction of the signal corresponding to site 2 from the 4 Cu-equiv CnrXs signal leads to the EPR signature of site 1 (simulation given in Figure SI4) characterized by an axial signal $g_{\|} = 2.267$ and $g_{\perp} = 2.054$ with a ^{63}Cu hyperfine coupling of $A_{\|} = 525$ MHz. These parameters are similar to those previously reported, assigned to the site 1 of CnrXs, in which the Cu(II) ion was coordinated to three histidines and one glutamate in the equatorial plane.[9] The ratio of the intensity of the features observed at 297 and 303 mT, arising from the two different coordination sites during the titration of CnrXs by $CuCl_2$, varies from 60/40 to 50/50 (site 1/site 2) when the number of equivalents of added Cu(II) increases from 1 to 4.

Competition between Cu(II)- and Co(II)-Binding Investigated by EPR. The relative affinity of the two different coordination sites of CnrXs for Co(II) and Cu(II) has been tested. Two series of experiments were performed, in which 2 equiv of one metal ion was added to CnrXs, prior to the addition of 2 equiv of the other metal ion in the presence of air. The resulting EPR spectra are depicted in Figure 4. The

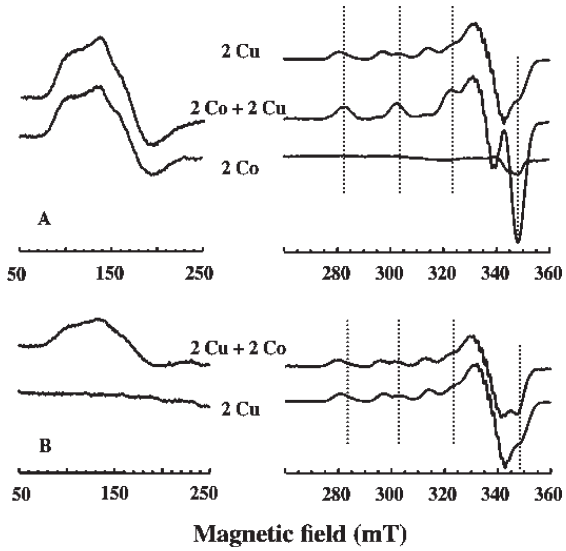


Figure 4. EPR analysis of the competition for Cu(II)- and Co(II)-binding to CnrXs. CnrXs (225 μM) was first loaded by 2 Co-equiv (panel A) or 2 Cu-equiv (panel B). Then, after recording the first EPR spectrum, 2 equiv of the second metal ion was added. The protein was used at a final concentration of 255 μM. The specific features of Cu(II) bound to site 2 is indicated by the vertical dotted lines. For clarity, the low-field resonance (50−250 mT) was magnified, and the spectrum of 2-Cu-bound CnrXs was added in panel A.

addition of 2 Cu(II)-equiv on 2 Co-bound CnrXs led to a unique Cu(II) signal corresponding to that of site 2, without change in the Co(II) EPR spectrum (Figure 4, panel A). This unambiguously shows that the first 2 equiv of Co(II) preferentially bind to site 1 and are not displaced by the successive addition of Cu(II), demonstrating a higher affinity of Co(II) as compared to Cu(II) for site 1. Conversely, the addition of 2 Co(II)-equiv on the 2 Cu-bound CnrXs led to the appearance of a high-spin Co(II) EPR spectrum, corresponding to a small amount of Co(II) bound to site 1. The rest of the added Co(II) was probably converted into an EPR-silent species when bound to site 2 in the presence of air. It should be noted that Co(III) directly added to the protein solution could not bind CnrXs (not shown). Furthermore, small changes can

dx.doi.org/10.1021/bi201031q | Biochemistry XXXX, XXX, XXX−XXX

be observed between the Cu(II) EPR spectra. The ratio of the intensity of the two different sites slightly varies for the benefit of site 2. This result suggests that the affinity of Cu(II) for the two sites is comparable but that Co(II) is capable to partly displace Cu(II) from site 1.

Metal Site Structures Explored by X-ray Absorption Spectroscopy. NccX is the homologue of membrane-bound full-length CnrX, for which purification has been so far unsuccessful. We have already described the purification and the preliminary spectrophotometric characterization of full-length NccX.[11] NccX binds only 2 Co-equiv, with the spectroscopic signature of site 1, suggesting that site 2 is absent in the full-length form of the protein. Owing to difficulty of crystallization, NccX is not known in atomic details. XAS was thus used to further characterize the Co-binding sites in NccX. XAS was also used to explore the site 1 and site 2 structures of CnrXs in solution. Figure 5 shows the XANES spectra for 2 Co-bound E63Q-CnrXs, 4 Co-bound CnrXs, 2 Co-bound H32A-CnrXs, and 2 Co-bound NccX. Co XANES spectra generally present a pre-edge peak at about 7710 eV assigned to a mixture of quadrupole 1s−3d and dipole 1s−4p transitions, whose intensity decreases when the degree of symmetry of the polyhedron or the degree of occupancy of the 3d shell increases.[26−28] The pre-edge is more intense for Co tetrahedral (such as Co(II)BF4 in Figure 5) than for octahedral coordination and for Co(III) than for Co(II) (Figure SI5). All the spectra shown in Figure 5 present a weak pre-edge peak between 7709 and 7711 eV as compared to $Co(II)BF_4$. This comparison suggests an octahedral coordination for Co in all the protein samples. The spectra for 2-Co-bound H32A-CnrXs and 2-Co-bound NccX show an edge at the same position as that of Co(II) acetate tetrahydrate (Figure SI5). This observation is consistent with the presence of divalent Co in these samples.

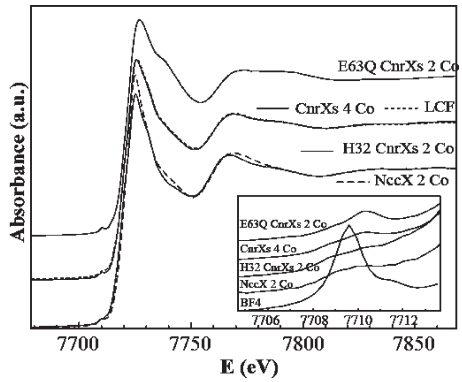


Figure 5. Co K-edge XANES spectra for 2-Co-bound E63Q-CnrXs, 4-Co-bound CnrXs, 2-Co-bound H32A-CnrXs, and NccX. The dotted line superimposed on 4-Co-bound CnrXs is a linear combination fit obtained with 62% 2-Co-bound H32A-CnrXs + 36% 2-Co-bound E63Q-CnrXs. Inset: close-up view the pre-edge feature and comparison with $Co(2\text{-methylimidazole})_4(BF_4)_2$.

The EXAFS spectra for 2 Co-bound H32A-CnrXs and 2 Co-bound NccX and their shell fits are shown in Figure 6. The derived structural parameters are given in Table 1. In 2-Co-bound H32A-CnrXs, the metal is bound to 3 His at 2.11 Å, 2 O atoms at 2.13 Å, and 1 S atom at 2.57 Å. Multiple scattering contributions within the imidazole ring are responsible for the peaks situated between $R + \Delta R$ = 2.5 and 4.0 Å (Figure 6B). These parameters are in good agreement with the structure of site 1 of CnrXs determined by the X-ray diffraction,[11] with Co−N (from His) interactions at 2.11, 2.11, and 2.12 Å, Co−O (Glu63) interactions at 2.13 and 2.16 Å, and Co−S (Met123) interactions at 2.54 Å. The spectrum for 2-Co-bound NccX presents strong similarities with that of 2-Co-bound H32A-CnrXs. Accordingly, its structural parameters are very close to those detailed above, with 3 His, 2 O, and 1 S atomic neighbors (Table 1).

On the contrary, 2-Co-bound E63Q-CnrXs exhibits strongly different XANES and EXAFS spectra and Fourier transforms (Figures 5 and 6). The position of the absorption edge for 2-Co-bound E63Q-CnrXs is shifted to higher energy relative to 2-Co-bound H32A-CnrXs and NccX. The XANES part was fitted by a combination of 59% 2-Co-bound H32A-CnrXs (or 2-Co-bound NccX) + 39% [Co(III)acac] (Figure SI5). This suggests the presence of both divalent and trivalent Co in this sample. The EXAFS spectrum for 2-Co-bound E63Q-CnrXs has a markedly lower frequency and amplitude than 2-Co-bound H32-CnrXs and NccX. No good fit was obtained supposing divalent Co only (with ΔE values = 9 ± 1 eV, as found for the model compounds) or trivalent Co only (ΔE values =2 ± 1 eV, as found for the model compounds). A satisfactory fit was obtained with 2 His bound to Co(II), plus 2.0 N/O ligands and 0.5 His bound to Co(III) (Table 1 and Figure 6). Interestingly, the contributions of the first shells of Co(II) and Co(III) are in complete opposition of phase (Figure SI6), resulting in a destructive interference (cancellation of the signal of the two contributions). In the present case, the resulting FT peak is both relatively narrow and situated at shorter distance relative to the two individual contributions. Provided that all Co atoms in 2-Co-bound E63Q-CnrXs are present in site 2, these results suggest that site 2 is occupied by both Co(II) and Co(III) and that some His ligands are involved. Keeping in mind that the EXAFS signal provides information on the average local environment over the different Co sites in the samples, the average number of ligands for Co determined by EXAFS fit equals 4.5. Theoretically, these results may correspond to 40% of Co(II) bound to 5 ligands (N = 2.0) and 60% of Co(III) bound to 4 ligands (N = 2.4) or 50% of Co(II) bound to 4 ligands (N = 2.0) and 50% of Co(III) bound to 5 ligands (N = 2.5). Because of the destructive interference between the contributions of Co(II) and Co(III), the number of ligands is probably underestimated. We know from the X-ray structure of Co-bound CnrXs and from the XAS analysis of 2-Co-bound H32A-CnrXs that site 1 is octahedral. The number of ligands being similar for Co(II) and Co(III) (2.0 and 2.5), it is likely that site 2 is octahedral as well.

The XANES and EXAFS spectra for 4-Co-bound CnrXs are intermediate between 2-Co-bound H32A-CnrXs (or NccX) and 2-Co-bound E63Q-CnrXs. The first peak for 4-Co-bound CnrXs is double, with a maximum at 1.65 Å and a shoulder at 1.35 Å. Both the XANES and the EXAFS parts were correctly fitted by a linear combination of about 60% 2-Co-bound H32A-CnrXs and about 40% 2-Co-bound E63Q-CnrXs (Figures 5 and 6). Imposing a 50−50 distribution clearly altered the fit quality. Thus, Co environments and valence states found in 4 Co-bound CnrXs are slightly different from the simple addition of those found in 2-Co-bound H32A-CnrXs and 2-Co-bound E63Q-CnrXs.

Site 2 Is Involved in Stabilization of the CnrXs Dimer. Figure 7A indicates that in the absence of added cobalt CnrXs and the mutant proteins were denatured to monomer while

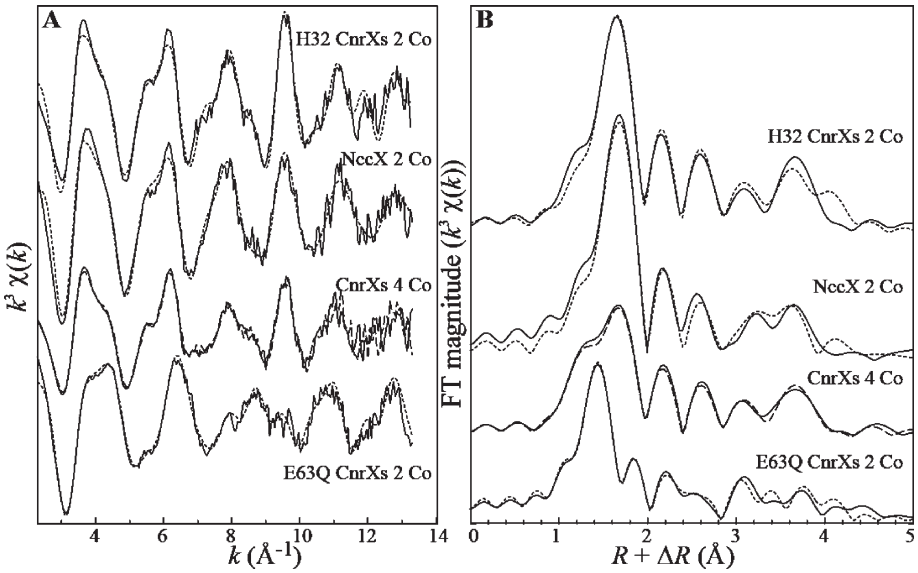


Figure 6. Co K-edge EXAFS spectra (A) and Fourier transforms moduli (B) for 2-Co-bound E63Q-CnrXs, 4-Co-bound CnrXs, 2-Co-bound H32A-CnrXs, and 2-Co-bound NccX. The dotted lines superimposed on 2-Co-bound E63Q-CnrXs, 2-Co-bound H32A-CnrXs, and 2-Co-bound NccX are multishell fits, and the dashed line superimposed on 4-Co-bound CnrXs is a linear combination fit obtained with 56% 2-Co-bound H32A-CnrXs + 32% 2-Co-bound E63Q-CnrXs.

Table 1. Structural Environment for Co in 2-Co-Bound Forms of H32A-CnrXs, NccX and E63Q-CnrXs Obtained from EXAFS Data Analysis[a]

	atom	N	R (Å)	σ^2 (Å^2)	ΔE (eV)[b]	R factor
H32-CnrXs 2 Co	His[c]	3.0 ± 0.2	2.11 ± 0.04	0.004	8.0	1.6×10^{-2}
	O	2.0 ± 0.2	2.13 ± 0.07	0.009	8.0	
	S	0.9 ± 0.1	2.57 ± 0.02	0.005	8.0	
NccX 2 Co	His[c]	3.0 ± 0.2	2.09 ± 0.02	0.005	8.2	2.1×10^{-2}
	O	2.0 ± 0.2	2.13 ± 0.04	0.003	8.2	
	S	1.1 ± 0.1	2.57 ± 0.02	0.010	8.2	
E63Q-CnrXs 2 Co	His[c] (Co(III))[d]	0.5 ± 0.2	1.93 ± 0.003	0.003	2.0	5.0×10^{-3}
	N/O (Co(III)[d]	2.0 ± 0.2	1.93 ± 0.003	0.003	2.0	
	His[c] (Co(II))	2.0 ± 0.1	2.13 ± 0.005	0.003	10.0	

[a] N: number of atoms, R: interatomic distance, s^2: Debye−Waller factor, ΔE (eV): difference between the theoretical and experimentally determined threshold energies; R factor: residual between fit and experiment.. [b] Values of 9 ± 1 eV correspond to Co(II), and values of 2 ± 1 eV correspond to Co(III). [c] Including multiple scattering within the imidazole ring. [d] A single Co(III)−N was used for the fit, which was then separated between Co(III)−His (N = 0.5 based on the multiple scattering contributions) and Co(III)−N/O.

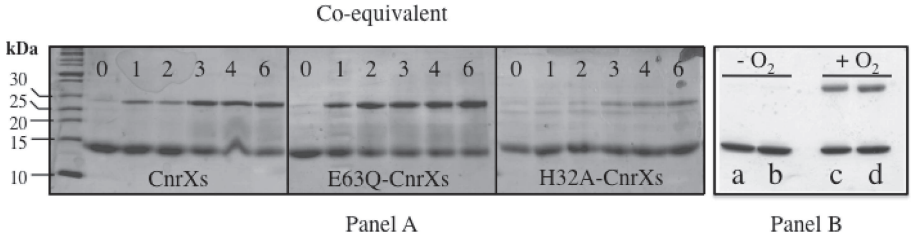


Figure 7. SDS-PAGE analysis of the cobalt titration of CnrXs, E63Q-CnrXs, and H32A-CnrXs. Panel A: protein was loaded with the indicated amount of $CoCl_2$, incubated overnight at 4 °C and loaded on 15% acrylamide SDS-PAGE without boiling. Panel B: 4-Co-bound CnrXs or 2-Co-bound E63Q-CnrXs were prepared anaerobically and then analyzed after overnight incubation in the presence or the absence of oxygen, as indicated. Lanes a and c: 4-Co-bound CnrXs. Lanes b and d: 2-Co-bound E63Q-CnrXs.

some of the dimeric form was retained in the presence of cobalt. Small amounts of dimeric CnrXs are resistant to denaturation in the presence of 1 or 2 Co-equiv. The proportion of CnrXs dimers detected reached a plateau from 3 Co-equiv and higher. The highest ratio of dimeric E63Q-CnrXs was readily obtained with 2 Co-equiv, and this ratio did not increase for higher amount of cobalt. Conversely, the dimeric form of H32A-CnrXs was virtually invisible at 1 and 2 Co-equiv, and only a very small amount of dimer was detected for 3 Co-equiv and beyond. As shown in Figure 7B, the presence of oxygen is required for the stabilization of the dimer, and this effect depends on the presence of Co ions in site 2. It

dx.doi.org/10.1021/bi201031q | *Biochemistry* XXXX, XXX, XXX−XXX

is noteworthy that Cu(II), Zn(II), and Ni(II) did not contribute to stabilize the dimeric form of CnrXs (not shown).

DISCUSSION

CnrX is a 148 amino acid protein with 26 N-terminal residues serving as a membrane anchor. A soluble form of CnrX spanning residues 31 to 148 was produced, which we referred to as CnrXs.[9,10] This truncated protein was characterized as the metal-sensor domain of CnrX.[11] Crystallization of dimeric Co-bound CnrXs revealed one Co-binding site per monomer, called site 1 in this paper. The coordination sphere consisted of the Nε2 atoms of His42, -46, and -119 and one O of Glu63 side chain in the equatorial plane. The octahedral coordination sphere was completed with two axial ligands: the second oxygen of Glu63 carboxylate and the thioether sulfur of Met123 (Figure SI1). Accordingly, single-crystal spectroscopy gave the UV−vis spectrum expected for a slightly distorted six-coordinate high-spin Co(II). However, when CnrXs was titrated by $CoCl_2$ in the presence of oxygen, the protein solution turned brownish, and the resulting UV−vis spectra were dominated by an intense band centered at 384 nm that increased in two steps upon addition of Co. These two steps were characterized by different extinction coefficients up to the addition of 4 Co-equiv. This suggests that CnrXs dimer contained, in addition to site 1, two extra and original metal-binding sites, referred to as site 2. Preliminary affinity measurements were performed by isothermal titration calorimetry (ITC). In agreement with spectrocopic data, ITC experiments (Supporting Information, Table SI1) detected two types of Co-binding sites with affinities in the 1−100 nM range. The affinity of Co for both site 1 and site 2 was greatly affected upon mutation of Glu63 and His32, respectively. These preliminary data must be considered as qualitative. Accurate quantitative assessment of the thermodynamics parameters related to Co-binding requires further work. Actually, the calculated decrease of about 3 orders of magnitude is probably overestimated since it is not consistent with the spectroscopic data showing that these mutations caused the loss of metal binding to the mutated sites. The overestimation of the affinity values may reflect the complexity of the metal binding event to the protein.[29] This is particularly true for the thermodynamics of the Co-binding event to site 2 that is highly complex since it includes binding of Co(II), partial oxidation to Co(III), and probably slight conformational modifications as judged from the appearance of low-spin Co(II) detected by EPR.

The two identified Co-binding sites of CnrXs were further characterized with two major goals: (i) the characterization of the metal-binding sites in proteins reluctant to crystallization, i.e. full-length CnrX or its homologue NccX, and (ii) the biophysical characterization of site 2 that exhibits an unexpected UV−vis spectrum upon Co-binding. Inspection of the CnrXs sequence to identify putative extra Co ligands revealed three histidine residues in addition to those present in site 1. Among these residues, involvement of His131 in the coordination sphere of site 2 was unlikely because its mutation did not cause any effect on the UV−vis titration of CnrXs by Co ions (not shown). The two others (His32 and His38) belong to the nine amino acids sequence at the N-terminus of CnrXs, 31-SHRNEAGHG-39. With two histidine residues and a glutamate, this sequence that is not structurally defined could potentially participate to the formation of a metal-binding site in solution. Indeed, the mutation of His32 for Ala hampered the formation of site 2.[11] E63Q-CnrXs that essentially binds 2 Co-equiv in site 2 is perfectly suited to characterize this metal-binding site. Under anaerobic conditions, Co(II) is stabilized in the high-spin state and appears to be either five-coordinate or six-coordinate with at least one water ligand in the site with few constraints as judged from the broad UV−vis spectrum and the lack of rhombicity and hyperfine structure in the low-field resonance of the EPR spectrum. EPR spectroscopy revealed that Co(II) was immediately changed to an EPR-silent species upon addition of air, although a small proportion remained as low-spin Co(II). XANES data were in agreement with Co in octahedral coordination and suggested that site 2 was occupied by a mixture of Co(II) and Co(III). The analysis of the EXAFS part confirmed these findings and showed the presence of His ligands in site 2. However, owing to the destructive interference of Co(II) and Co(III) contributions, it was difficult to conclude on the proportion of each species as well as on the exact coordination number for Co in site 2. Provided that the Cu coordination sphere resembles that of Co in site 2, as it is the case for site 1,[9,11] copper was used as a probe to better characterize site 2 by EPR. One Cu-bound E63Q-CnrXs exhibits an axial EPR signal whose parameters, low $g_{\|}$ value associated with large $A_{\|}$ value, can be consistent with a N4 coordination sphere in the equatorial plane according to the Peisach−Blumberg correlations.[25] At least three nitrogen-based ligands were estimated from the complex superhyperfine pattern observed in the high-field resonance. The detection of CnrXs dimers under soft electrophoretic conditions in the samples with site 2 intact suggests that coordination of the metal ion involves residues from the two monomers.

As shown by UV−vis spectroscopy, site 2 does not exist in full-length NccX or in Co-bound CnrXs crystals.[11] This raises the question of the relevance of such a site. Actually, a physiological role was ruled out by an *in vivo* study.[8] In *C. metallidurans* CH34 carrying the H32R single or the H32R/H38R double mutation in CnrX, nickel was still an inducer of resistance. Moreover, the H32R/H38R double mutation did not prevent CnrX to bind nickel. It was thus concluded that alteration of these residues did not abolish nickel-dependent induction of the *cnr* determinant and are probably not involved in Ni-binding[8] *in vivo*. Because CnrXs is a truncated form of the full-length protein, the degree of freedom of the N-terminal end is assumed to be higher and an adventitious Co-binding site can be formed *in vitro*. H42R/H46R double mutation diminished Ni-binding and almost completely abolished inducibility as well as metal resistance, making His42 and His46 of central importance for regulation by CnrX.[8] These ligands belong to the coordination sphere of Co in site 1.[9,11] UV−vis spectroscopic characterization of H32A-CnrXs, 2-Co-bound CnrXs under anaerobiosis, and 2-Co-bound NccX gave similar spectra (Figure 1C), suggesting a similar coordination sphere. XAS characterization of Co-bound NccX confirmed that the full-length protein can accommodate Co(II) in a metal-binding site comparable to that of H32A-CnrXs, in terms of ligand identity and of metal-to-ligand distances. As NccX is not able to bind more than 2 Co-equiv specifically, site 1 is probably the only metal-binding site present in the full-length protein. H32A-CnrXs is the best spectroscopic model of NccX, and probably of CnrX, since the close sequence similarity between these proteins (75% identity) includes a strict conservation of the His residues.

It is noteworthy that upon addition of 2 Co-equiv in the absence of oxygen, only site 1 is filled and the Co ions are

stabilized as Co(II). When the same experiment is performed in air, a part of Co ions are accepted by site 2 and appeared immediately oxidized to Co(III), causing the appearance of a band at 384 nm with an apparent molar extinction coefficient of 500 M^{-1} cm^{-1}. This apparent molar extinction coefficient is high enough to mask the absorption due to the binding of Co(II) to site 1 that is characterized by an absorbance centered at 495 nm and an ε_{495} around 75 M^{-1} cm^{-1}. Once site 1 is filled, cobalt binds exclusively to site 2 that exhibits a strong absorbance band at 384 nm characterized by an ε_{384} of 3000 M^{-1} cm^{-1}. This explains the biphasic titration of CnrXs by $CoCl_2$ in the presence of oxygen. It is known that octahedral Co(II) polyamine chelates, such as aqueous ammonia solutions containing Co(II) salts, turn brown on exposure to oxygen and that a diamagnetic salt of binuclear μ-peroxo cobalt(III) complex, $[(NH_3)_5CoO_2Co(NH_3)_5]^{4+}$, can be subsequently isolated and crystallized.[30−32] The bridging O−O ligand originates entirely from gaseous oxygen and contributes to form μ-peroxo dimers. The factors governing the ability of a Co(II) complex to pick up O_2 are not fully understood. However, it is well admitted that a water ligand can be easily displaced by O_2, and it has been hypothesized that such a complex must contain three donor nitrogen atoms as a minimum requirement for O_2 uptake.[33] Moreover, these six-coordinate μ-peroxo Co(III) complexes display strong charge-transfer bands around 350 nm with ε in the range 10^3−10^4 M^{-1} cm^{-1}.[34] Finally, slow transformation of these binuclear complexes to mononuclear Co(III) complexes has been also evidenced.[31] The local structure of Co in site 2 as determined in this study (5- or 6-fold coordination, with N-containing ligands and one water molecule) suggests that such a binuclear μ-peroxo Co(III) complex may be formed in Co-bound CnrXs. This hypothesis would be consistent with most of our results: (i) strong charge-transfer bands at 384 nm observed by spectrophotometry in the presence of oxygen, (ii) decrease of the intensity of the EPR spectra upon introduction of air due to the formation of diamagnetic dinuclear Co complexes, and to Co(II) oxidation to Co(III), and (iii) oxygen-dependent stabilization of CnrXs dimers observed by SDS-PAGE through a bridging dinuclear complex involving site 2. The presence of peroxo Co dimers would generate a Co−Co contribution at 4.3−4.5 Å,[30] depending on the geometry of the Co−O−O−Co chain in the EXAFS signal. Adding such a contribution to the EXAFS fit of 2-Co-bound E63Q-CnrXs (1 Co neighbor per Co(III) atom) did not affect the fit quality. Consequently, the formation of peroxo-bridged dimers is compatible with our EXAFS data. The high proportion of Co(II) observed by XAS remains puzzling but could be due to transient species in a slow oxidation process.[33,35]

C. metallidurans CH34 prevails in heavy-metal-rich environments,[1] and the metal-binding sites of the sensor-protein CnrX can be occupied by unspecific metal ions such as copper or zinc depending on natural or anthropogenic conditions. We already demonstrated that Ni and Co have a comparable affinity for CnrXs, both higher than that of Zn.[11] Now we have used EPR to compare the relative affinity of Co and Cu for site 1. We concluded that Cu(II) added after the first 2 equiv of Co(II) filled site 2 without displacing Co from site 1. Conversely, Co is able to partly displace Cu that is already present in site 1. This demonstrates that, upon increasing environmental concentration of Ni or Co ions, the Cnr system can easily be turned on by substituting Zn or Cu, two of the most abundant environmental metal elements, at the CnrXs metal-binding site.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Schematic representation of the Co-binding site 1 (Figure SI1); simulation of the X-band EPR spectra of Co(II)-bound site 1 of CnrXs (Figure SI2); simulation of the X-band EPR spectra of Cu(II)-bound site 2 of CnrXs (Figure SI3); simulation of the X-band EPR spectra of Cu(II)-bound E63Q-CnrXs (site 1) (Figure SI4); Co K-edge XANES spectra of the proteins used in this study along with those of some reference compounds (Figure SI5); Fourier transformed EXAFS spectrum for two Co-bound E63Q-CnrXs, multishell fit, and first shell Co(II) and Co(III) contributions (Figure SI6); experimental procedure for ITC and preliminary results of affinity measurements (Figure SI7 and Table SI1). This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: 33-(0)4-38-78-24-03. Fax: 33-(0)4-38-78-54-94. E-mail: jacques.coves@ibs.fr.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the ESRF for the provision of beamtime and the staff of the FAME beamline for their help during XAS data acquisition. We also thank Vincent Artero, Jean Marc Latour and Isabelle Michaud-Soret from the LCBM (UMR CNRS/UJF 5249, Grenoble, France) and David Tierney from the University of New Mexico for sharing several Co reference compounds and spectra. Florian Molton and Aymeric Audfray are also thanked for their help during EPR and ITC experiments, respectively.

■ ABBREVIATIONS

Cnr, cobalt and nickel resistance; EPR, electronic paramagnetic resonance; EXAFS, extended X-ray absorption fine spectroscopy; XANES, X-ray absorption near-edge structure; XAS, X-ray absorption spectroscopy.

■ REFERENCES

(1) Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., and Van Gijsegem, F. (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol. 162*, 328−334.

(2) Monchy, S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaeys, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., and Mergeay, M. (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J. Bacteriol. 189*, 7417−7425.

(3) von Rozycki, T., and Nies, D. H. (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek 96*, 115−39.

(4) Janssen, P. J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M. A., Leys, N., Vallaeys, T., Lapidus, A., Monchy, S., Médigue, C., Taghavi, S., McCorkle, S., Dunn, J., van der Lelie, D., and Mergeay, M. (2010) The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One 5*, e10433.

(5) Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R. A., and Schlegel, H. G. (1993) Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 *of Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol. 175*, 767−778.

(6) Grass, G., Grosse, C., and Nies, D. H. (2000) Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J. Bacteriol. 182*, 1390−1398.

(7) Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L., and van Der Lelie, D. (2000) Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J. Bacteriol. 182*, 1399−1409.
(8) Grass, G., Fricke, B., and Nies, D. H. (2005) Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. *Biometals 18*, 437−448.
(9) Pompidor, G., Maillard, A. P., Girard, E., Gambarelli, S., Kahn, R., and Covès, J. (2008) X-ray structure of the metal-sensor CnrX in both the apo- and copper-bound forms. *FEBS Lett. 582*, 3954−3958.
(10) Pompidor, G., Girard, E., Maillard, A., Ramella-Pairin, S., Kahn, R., and Covès, J. (2009) Biostructural analysis of the metal-sensor domain of CnrX from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Antonie van Leeuwenhoek 96*, 141−148.
(11) Trepreau, J., Girard, E., Maillard, A. P., de Rosny, E., Petit-Haertlein, I., Kahn, R., and Covès, J. (2011) Structural basis for metal sensing by CnrX. *J. Mol. Biol. 408*, 766−779.
(12) Stoll, S., and Schweiger, A. J. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson. 178*, 42−55.
(13) Bennett, B., and Holz, R. C. (1997) EPR studies of the mono- and dicobalt(II)-substituted froms of the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*. Insight into the catalytic mechanism of dinuclear hydrolases. *J. Am. Chem. Soc. 119*, 1923−1933.
(14) Proux, O., Nassif, V., Prat, A., Ulrich, O., Lahera, E., Biquard, X., Menthonnex, J.-J., and Hazemann, J.-L. (2006) Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances. *J. Synchrotron Radiat. 13*, 59−68.
(15) Ravel, B., and Newville, M. (2005) ATHENA and ARTEMIS: Interactive graphical data analysis using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat. 12*, 537−541.
(16) Rehr, J. J., Mustre de Leon, J., Zabinsky, S. I., and Albers, R. C. (1991) Theoretical X-ray absorption fine structure standards. *J. Am. Chem. Soc. 113*, 5135−5145.
(17) Lampeka, R. D., Uzakbergenova, Z. D., and Skopenko, V. V. (1993) Spectroscopic and X-ray investigation of cobalt(III) complexes with 2-oximinocarboxylic acids. *Z. Naturforsch. 48b*, 409−417.
(18) Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J.-L., Latour, J.-M., and Michaud-Soret, I. (1999) Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry 38*, 6248−6260.
(19) Bertini, I., and Luchinat, C. (1984) High spin cobalt(II) as a probe for the investigation of metalloproteins. *Adv. Inorg. Biochem. 6*, 71−111.
(20) Maret, W., and Vallee, B. L. (1993) Cobalt as probe and label of proteins. *Methods Enzymol. 226*, 52−71.
(21) Fielding, A. J., Kovaleva, E. G., Farquhar, E. R., Lipscomb, J. D., and Que, L. Jr (2011) A hyperactive cobalt-substituted extradiol-cleaving catechol dioxygenase. *J. Biol. Inorg. Chem. 16*, 341−355.
(22) Breece, R. M., Costello, A., Bennett, B., Sigdel, T. K., Matthews, M. L., Tierney, D. L., and Crowder, M. W. (2005) A five-coordinate metal center in Co(II)-substituted VanX. *J. Biol. Chem. 280*, 11074−11081.
(23) Bennett, B. (2002) EPR of Co(II) as a structural and mechanistic probe of metalloprotein active sites: characterisation of an aminopeptidase. *Curr. Top. Biophys. 26*, 49−57.
(24) Werth, M. T., Tang, S. F., Formicka, G., Zeppezauer, M., and Johnson, M. K. (1995) Magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance studies of cobalt-substituted horse liver alcohol dehydrogenase. *Inorg. Chem. 34*, 218.
(25) Peisach, J., and Blumberg, W. E. (1974) Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance-spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch. Biochem. Biophys. 165*, 691−708.
(26) Moen, A., Nicholson, D. G., Ronning, M., Lamble, G. M., Lee, J. F., and Emerich, H. (1997) X-Ray absorption spectroscopic study at the cobalt K-edge on the calcination and reduction of the microporous cobalt silicoaluminophosphate catalyst CoSAPO-34. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 93*, 4071−4077.
(27) Jacobs, G., Patterson, P. M., Zhang, Y., Das, T., Li, J., and Davis, B. H. (2002) Fischer−Tropsch synthesis: deactivation of noble metal-promoted Co/Al_2O_3 catalysts. *Appl. Catal., A 233*, 215−226.
(28) Juhin, A., de Groot, F., Vanko, G., Calandra, M., and Brouder, C. (2010) Angular dependence of core hole screening in LiCoO2: A DFT+U calculation of the oxygen and cobalt K-edge x-ray absorption spectra. *Phys. Rev. B 81*, 115115.
(29) Wilcox, D. E. (2008) Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: an overview of recent studies. *Inorg. Chim. Acta 361*, 857−867.
(30) Schaeffer, W. P. (1968) Structure of decaammine-μ-peroxo-dicobalt disulfate tetrahydrate. *Inorg. Chem. 7*, 725−731.
(31) Simplicio, J., and Wilkins, R. G. (1969) The uptake of oxygen by ammoniacal cobalt(II) solutions. *J. Am. Chem. Soc. 91*, 1325−1329.
(32) Michailidis, M. S., and Martin, R. B. (1969) Oxygenation and oxidation of cobalt(II) chelates of amines, amino acids, and dipeptides. *J. Am. Chem. Soc. 91*, 4683−4689.
(33) Miller, F., Simplicio, J., and Wilkins, R. G. (1969) The kinetics of the rapid interaction of some cobalt(II) chelates with oxygen. *J. Am. Chem. Soc. 91*, 1962−1967.
(34) Wilkins, R. G. (1971) Uptake of Oxygen by Cobalt (II) Complexes in Solution. *Adv. Chem. Ser. 100*, 111−134.
(35) Norkus, E., Vaskelis, A., Griguceviciene, A., Rozovskis, G., Reklaitis, J., and Norkus, P. (2001) Oxidation of cobalt(II) with air oxygen in aqueous ethylenediamine solutions. *Transition Met. Chem. (Dordrecht, Neth.) 26*, 465−472.

CnrX est un senseur périplasmique, ancrée à la membrane, appartenant au complexe CnrYXH qui contribue à réguler l'expression des gènes impliqués dans la résistance au nickel et au cobalt chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. La résistance est induite par la libération de CnrH, un facteur sigma de type ECF (Extracytoplasmic Function), par le complexe CnrYX en réponse à Ni et Co. Nous avons cherché à comprendre la manière dont CnrXs, le domaine senseur de CnrX, détecte les ions métalliques, les stratégies utilisées pour sélectionner spécifiquement Ni ou Co ainsi que la nature du signal engendré par cette interaction. Les techniques spectroscopiques et biophysiques telles que l'UV-visible, la RPE, le XAS et l'ITC ont permis d'étudier les sites métalliques en solution. Le dimère de CnrXs possède quatre sites de liaison au cobalt. Deux des sites (sites F) sont retrouvés dans la protéine entière dont nous avons maintenant un excellent modèle avec le mutant CnrXs-H32A. Les deux autres sites (sites E) ont un signal spectroscopique atypique probablement dû à la formation du complexe binucléaire de cobalt. Nous présentons également des structures à haute résolution de CnrXs dans ses formes apo et métallées par le nickel, cobalt ou zinc. Nous avons établi que la forme zinc est la forme inactive de la protéine et que le mécanisme de détection est engendrée par la substitution du zinc par le nickel et le cobalt dans le site F, conduisant à une modification majeure du site de liaison au métal. Tandis que le zinc est pentacoordiné dans une sphère 3N2O, Ni et Co recrutent le soufre de la seule méthionine (Met123) de la séquence comme sixième ligand pour former un site octaédrique. Nous suggérons que Met123 soit l'interrupteur moléculaire dont la liaison avec le métal fait évoluer la structure de la protéine vers une conformation active. A notre connaissance, ces résultats constituent la première étude structurale et spectroscopique d'un senseur de métal périplasmique impliqué dans un système de transduction du signal dépendant d'un facteur sigma de type ECF.

Mots clés : homéostasie des métaux (nickel and cobalt), transduction du signal, senseur de métaux, résistance aux métaux, *Cupriavidus metallidurans* CH34.

CnrX is the membrane-anchored periplasmic sensor of the CnrYXH complex that contributes to regulate the expression of the genes involved in cobalt and nickel resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. This resistance is induced by the release of the ExtraCytoplasmic Function (ECF) sigma factor CnrH from the CnrYX complex upon sensing of Ni or Co. We attempted to understand the metal sensing mechanisms of CnrXs, the strategies used to discriminate Ni or Co and the nature of the signal onset. Biophysical and spectroscopic techniques allowed us to study the metal binding sites in solution. CnrXs dimer has four cobalt binding sites. Two of them (F sites) are present in the full-length protein which H32A-CnrXs mutant is an excellent model of. The two other sites have an unusual spectroscopic signal that might be due to the formation of a bincluear cobalt complex. We present also high-resolution structures of CnrXs under the apo, Ni-, Co-, and Zn-bound. We propose that Zn-bound CnrX typifies the resting state of the complex and that the sensing mechanism is triggered by the substitution of Zn for Ni or Co in the F site. This substitution leads to a dramatic change metal-binding. While the Zn ion is pentacoordinated in a 3N2O sphere, Ni or Co ions recruit the thioether sulfur of the only methionine (Met123) residue of the sequence as a sixth ligand to form an octahedral site. We propose that the Met123 side chain recruitment is the qualitative change that switches on the sensing mechanism by remodeling the four-helix bundle that accommodates the metal-binding site. To our knowledge these results represent the first structural and spectroscopic study of a periplasmic metal sensor involved in transmembrane signal transduction for the activation of an ECF-type sigma factor.

Key words : metal homeostasis (nickel/cobalt), signal transduction, metal sensor, metal resistance, *Cupriavidus metallidurans* CH34.