

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA SYNTHÈSE D'UN MODÈLE PROTÉIQUE FE-S *DE NOVO* AFIN DE CONTRÔLER LA  
RÉACTIVITÉ À L'INTERFACE DU CLUSTER

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN CHIMIE

PAR

RÉBECCA ZOMBLEWOU

JUILLET 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de recherche, Pre Erin Dodd, pour sa guidance précieuse, son soutien inébranlable et son expertise inestimable tout au long de ce parcours de recherche. Ses conseils éclairés et son dévouement ont été essentiels à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à témoigner mes sincères gratitude envers le Pr Cappadocia pour avoir généreusement ouvert les portes de son laboratoire et m'avoir accordé l'accès aux ressources nécessaires pour mener à bien mes recherches.

Je souhaite également adresser mes remerciements sincères à mes collègues de laboratoire, Assala et Ahmad pour leur collaboration, leurs encouragements et leur camaraderie tout au long de cette aventure scientifique. Leur contribution a enrichi mon expérience de recherche et a rendu cette étape possible. Je suis reconnaissant envers chacun d'entre vous pour votre soutien indéfectible, votre patience et votre inspiration. Ce mémoire représente non seulement le fruit de mes efforts, mais aussi le résultat d'une collaboration et d'un apprentissage collectif.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon conjoint, Basile, pour son soutien inconditionnel, sa compréhension et son amour tout au long de cette aventure. Ses encouragements et son soutien émotionnel ont été une source de force et de motivation inestimable pour moi. Je suis reconnaissante de pouvoir compter sur sa présence et son soutien indéfectible.

Je remercie les membres du comité d'évaluation, Pre Daniela Quaglia et Pre Tatiana Scorza pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Et finalement, un grand merci au personnel et aux techniciens du département de chimie-biochimie pour leur assistance précieuse et leur dévouement constant.

# DÉDICACE

À mes chers parents  
À mes chers frères et sœurs  
À tous mes amis et connaissances

Ésaïe 40:31

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	II
DÉDICACE.....	III
LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	XIV
RÉSUMÉ.....	XVII
CHAPITRE 1 - GÉNÉRALITÉS SUR LES CLUSTERS FE-S.....	1
1.1. Origine de la vie et chimie des clusters Fe-S .....	1
1.2. Diversité des clusters Fe-S .....	2
1.2.1. Clusters [2Fe-2S].....	3
1.2.2. Clusters [3Fe-4S].....	4
1.2.3. Clusters [4Fe-4S].....	4
1.3. Fonctions des clusters Fe-S .....	5
1.3.1. Transfert d'électrons : le cas de la phosphorylation oxydative .....	6
1.3.2. Catalyse rédox : le cas du radical S-adénosyl méthionine .....	7
1.3.3. Catalyse non-rédox : le cas de l'aconitase .....	8
1.3.4. Régulateurs de gènes : le cas de IRP-1, SoxR, FNR et NsrR .....	9
1.3.5. Interaction avec ADN/ARN : un autre cas, XPD.....	14
1.4. Biogénèse et transfert des clusters Fe-S .....	15
1.4.1. Machineries cellulaires d'assemblage <i>in vivo</i> .....	15
1.4.1.1. Assemblage des clusters Fe-S par la machinerie NIF .....	17
1.4.1.2. Assemblage de clusters Fe-S par la machinerie ISC.....	17
1.4.1.3. Assemblage des clusters Fe-S par la machinerie SUF .....	18
1.4.2. Assemblage des clusters <i>in vitro</i> : reconstitution chimique .....	19
1.5. L'effet de l'O <sub>2</sub> sur les cluster Fe-S .....	20
1.5.1. Inconvénient de l'oxygène : biodisponibilité du fer.....	21

1.5.2.	Dégâts oxydatifs des clusters Fe-S : le cas DHAD .....	22
1.5.3.	Systèmes de protection face à l'O <sub>2</sub> et aux ERO : [NiFe]-hydrogénase résistant à l'O <sub>2</sub> , SOD et catalase .....	23
1.6.	L'effet du NO sur les clusters Fe-S .....	24
1.6.1.	Nitrosylation des clusters Fe-S : diaphonie entre NO et H <sub>2</sub> S.....	24
1.7.	Protéines Fe-S <i>de novo</i> .....	27
1.7.1.	Conception hélicoïdales [4Fe-4S] <i>de novo</i> .....	28
CHAPITRE 2 - ÉTUDE DES PROTÉINES FE-S.....		30
2.1	Techniques informatiques .....	30
2.1.1.	Logiciels de prédiction structurales des protéines : AlphaFold et I-TASSER.....	30
2.2.	Techniques physico-chimiques .....	34
2.2.1.	Principe de la spectroscopie UV-Visible .....	34
2.2.2.	Principe de la chromatographie liquide rapide des protéines.....	36
2.2.3.	Principe de l'électrophorèse (SDS-PAGE) .....	37
2.3.	Contexte et présentation du projet.....	38
CHAPITRE 3 – MÉTHODOLOGIE .....		39
3.1	Méthodes biochimiques.....	39
3.1.1.	Choix du vecteur d'expression .....	39
3.1.2.	Préparation des souches productrices : cellules compétentes .....	40
3.1.3.	Préparation de l'ADN plasmidique .....	41
3.1.4.	Transformation bactérienne.....	41
3.1.5.	Expression de CCIS2b .....	42
3.1.6.	Lyse des cellules.....	43
3.1.7.	Purification d' <i>apo</i> -CCIS2b .....	43
3.1.8.	Électrophorèse SDS-PAGE.....	44
3.1.9.	Concentration de CCIS2b.....	45
3.1.10.	Reconstitution chimique du cluster Fe-S dans CCIS2b .....	45
3.2.	Analyses biochimiques.....	46
3.2.1.	Dosage de CCIS2b .....	46
3.2.2.	Dosage du fer dans CCIS2b .....	46

3.2.3.	Gamme d'étalonnage.....	46
3.2.4.	Échantillons de CCIS2b .....	48
3.3.	Analyses bio-informatiques.....	48
3.3.1.	Méthodologie pour l'étude de la prédiction des protéines Fe-S.....	48
CHAPITRE 4 – RÉSULTATS & DISCUSSION.....		50
4.1.	Choix et design de la protéine .....	50
4.2.	Tentative d'expression d' <i>holo</i> -CCIS2b.....	51
4.3.	Expression et purification d' <i>apo</i> -CCIS2b.....	54
4.4.	Reconstitution du cluster Fe-S : formation de rec-CCIS2b.....	56
4.4.1.	Choix des réactifs de la reconstitution .....	56
4.4.1.1.	Agents réducteur .....	56
4.4.1.2.	Sources de fer .....	57
4.4.1.3.	Sources de soufre .....	57
4.4.2.	Optimisation des conditions expérimentales de la reconstitution .....	58
4.4.2.1.	Influence de la concentration des réactifs .....	58
4.4.2.2.	Influence de la composition du tampon .....	58
4.4.2.3.	Choix de la méthode de purification .....	59
4.4.2.4.	Influence du temps sur la formation du cluster Fe-S .....	60
4.5.	Quantification et évaluation du rendement en cluster .....	63
4.6.	Exploration de la structure de CCIS2b et de ses variantes.....	65
4.6.1.	Étude des structures des protéines Fe-S naturelles.....	66
4.6.2.	Étude de la structure de CCIS2b et des variantes de CCIS2b prédite par AlphaFold et I-TASSER .....	71
4.6.2.1.	Prédiction de CCIS2b.....	71
4.6.2.2.	Mutations impliqués dans la conception des variantes de CCIS2b.....	74
4.6.2.2.1.	Prédiction de C13D CCIS2b : mutation de la cystéine 13 par aspartate.....	75
4.6.2.2.2.	Prédiction de C61D CCIS2b : mutation cystéine 61 par aspartate .....	77
4.6.2.2.3.	Prédiction de C13A CCIS2b : mutation cystéine 13 par alanine .....	79
4.6.2.2.4.	Prédiction de C61A CCIS2b : mutation cystéine 61 par alanine .....	81
4.6.3.	Comparaison des distances inter-hélices dans les structures naturelles Fe-S et les variantes de CCIS2b.....	84

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....89  
BIBLIOGRAPHIE .....91



## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1 : exemples de structures de clusters Fe-S : (a) cluster rhombique [2Fe-2S], (b) cluster cubique dérivé [3Fe-4S], (c) cluster cubique [4Fe-4S], et (d) cofacteur Femoco. (Cammack, 2011)..... 3
- Figure 1.2 : différents états d'oxydation du cluster [4Fe-4S]. Le passage d'une ferrédoxine à bas potentiel à une ferrédoxine haut potentiel. Adapté de (8959j, 2022)..... 5
- Figure 1.3 : schéma simplifié de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le complexes I (bleu), II (vert), and III (rouge). Une molécule de NADH est oxydée en  $\text{NAD}^+$  par le cofacteur FMN du complexe I générant 2 électrons qui sont par la suite transférés par l'intermédiaire de 8 clusters Fe-S afin de réaliser la réduction de la coenzyme  $\text{Q}_{10}$  en ubiquinol  $\text{Q}_{10}\text{H}_2$ . Le complexe II réduit également la coenzyme  $\text{Q}_{10}$  en oxydant une molécule de succinate en fumarate générant 2 électrons transférés par 3 clusters Fe-S. L'ubiquinol  $\text{Q}_{10}\text{H}_2$  transporte les électrons jusqu'au complexe III qui l'oxyde afin de réduire deux cytochromes c. Les cytochromes c réduits fournissent les électrons au complexe IV. (Read, Bentley, Archer, & Dunham-Snary, 2021)..... 7
- Figure 1.4 : mécanisme du S-adénosylméthionine (SAM). Clivage réducteur avec l'électron fourni par le cluster  $[4\text{Fe-4S}]^+$  pour donner le radical  $5'\text{-dA}^*$  et la méthionine dans les enzymes SAMs radicales. La molécule de SAM (noir) se lie à un cluster  $[4\text{Fe-4S}]$  (bleu) par un de ces atomes de fer. Le cluster  $[4\text{Fe-4S}]$  permet la réduction et le clivage du SAM en générant une molécule de méthionine et une espèce radicalaire  $5'\text{-dA}^*$  (noir). Cette espèce radicalaire va permettre de réaliser un grand nombre de réactions telles que la méthylation ou l'insertion d'un atome de soufre. (Yang & Li, 2013) ..... 8
- Figure 1.5 : mécanise de l'aconitase. (Lauble, Beinert, & Stout, 1992) ..... 9
- Figure 1.6 : les IRP régulent la traduction et la stabilité des ARNm contenant de l'IRE. Lorsque le fer est limité, les IRP se lient avec une forte affinité aux ARNm de l'IRE et répriment la traduction,. Lorsque le fer est abondant, les IRP ne se lient pas aux IRE, ce qui entraîne la traduction des ARNm et la dégradation de l'ARNm de TfR1. Modifié de (Neves, Haider, Gassmann, & Muckenthaler, 2019)..... 11
- Figure 1.7 : SoxR, un système de contrôle bactérien pour la survie cellulaire sous stress oxydant. La barre de couleur bleue représente l'ADN. Le facteur de transcription SoxR contient un cluster  $[2\text{Fe-2S}]$  par monomère (représentés en cube orange). Dans des conditions aérobie normale, les clusters SoxR  $[2\text{Fe-2S}]$  sont réduits et la protéine se lie à une région promotrice spécifique de son gène cible *soxS* et inactive sa transcription. Lors d'un stress oxydatif, les clusters  $[2\text{Fe-2S}]$  subissent une oxydation, entraînant un changement conformationnel de la protéine. La forme oxydée active de SoxR remodèle la conformation du promoteur *soxS* de manière à permettre à l'ARN polymérase d'initier la transcription de *SoxS*. Inspiré de (Golinelli-Cohen & Bouton, 2017)..... 13

Figure 1.8 : représentation schématique simplifiée du mécanisme d'assemblage des protéines Fe-S. Deux étapes sont identifiées, débutant avec l'assemblage du cluster Fe-S sur une protéine ou un complexe d'échafaudage, puis l'acheminement de ce cluster vers une protéine cible via l'action de protéines chaperons et de transport. Inspiré de (Pérard & Ollagnier de Choudens, 581–596 (2018)).....	16
Figure 1.9 : gènes du locus NIF impliqués dans la synthèse des clusters Fe-S chez <i>A. vinelandii</i> adapté de (Blanc, Gerez, & Ollagnier de Choudens, 2015).....	17
Figure 1.10 : gènes du locus ISC impliqués dans la synthèse des clusters Fe-S chez <i>E. coli</i> . (Jaroschinsky, Pinske, & Sawers, 2017) .....	18
Figure 1.11 : modèle proposé pour la régulation de l'opéron <i>SUF</i> . Lorsque la concentration de fer est suffisante, Fur fixe du fer comme cofacteur et lie la région promotrice de l'opéron <i>SUF</i> ce qui bloque sa transcription. Dans des conditions de carence en fer, Fur est démétallée et il y a levée de la répression. Modifié de (Yeo, Lee, Lee, & Roe, 2006) .....	19
Figure 1.12 : destruction des clusters par oxydation. Les oxydants univalents, notamment le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène moléculaire et le peroxydinitrite (noté [O]), convertissent le groupe exposé $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ en état d'oxydation instable $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ . Le cluster se décompose ensuite spontanément en la forme inactive $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ . .....	22
Figure 1.13 : structures des espèces nitrosyle de fer. Structures du complexe dinitrosyle fer (DNIC), mononitrosyl fer (MNIC) , le sel rouge de Roussin (RRE), du sel noir de Roussin (RBS) et les esters rouge de Roussin (RRE) (Harrop, Tonzetich, Reisner, & Lippard, 2008 ) .....	25
Figure 1.14 : mécanisme de nitrosylation d'un cluster $[4\text{Fe-4S}]$ dans différents environnements (aérobie ou anaérobie). Les produits obtenus sont RBS, DNIC et RRE. (Grabarczyk, Ash, Myers, Dodd, & Vincent, 2019).....	26
Figure 1.15 : conceptions hélicoïdales de novo $[4\text{Fe-4S}]$ . (A) Structure modélisée de CCIS de quatre hélices alpha avec un cluster $[4\text{Fe-4S}]$ (B) Structure modélisée de DSD de trois hélices alpha avec deux clusters $[4\text{Fe-4S}]$ dans le site actif.....	28
Figure 2.1 : principe de la spectroscopie UV-Visible. (93).....	35
Figure 2.2 : schéma du principe de la chromatographie FPLC avec une colonne de purification Ni-NTA. A) structures chimiques de l'imidazole et l'histidine. B) Ligands chélateurs IMAC-NTA. NTA est largement utilisé pour fixer les ions de métaux de transition sur une matrice, qui sert ensuite de résine d'affinité. (95).....	37
Figure 3.1 : carte du plasmide utilisée pour la production de protéines. Le pET-21d(+) est un vecteur bactérien pour l'expression inductible de protéines marquées T7 à l'extrémité N-terminale avec un site NcoI au codon d'initiation. Le gène d'intérêt CCIS2b se situe entre HindII et Nco I. ....	40

Figure 4.1 : séquence polypeptidique de CCIS2b. Les cystéines sont représentés en jaune. Les boucles de connexions entre les hélices sont représentés en bleu. ....	51
Figure 4.2 : spectre d'absorption UV-visible enregistré lors de la tentative de production de l'holo-CCIS2b en utilisant une cuve avec une épaisseur optique de 1 cm, dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 0,5M.....	52
Figure 4.3 : gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes obtenus durant la purification de CCIS2b. 1 : marqueur de poids moléculaire (en kDa) ; 2 : fraction protéique totale ; 3 : fraction de lavage ; 4-5 impuretés ; 6-7 : protéine CCIS2b. L'apo-CCIS2b es représenté par la solution jaune claire. ....	55
Figure 4.4 : spectre d'absorption UV-visible enregistré lors de la production de l'apo-CCIS2b en utilisant une cuve avec une épaisseur optique de 1 cm, dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 0,5M.....	56
Figure 4.5 : schéma simplifié des paramètres optimaux pour la reconstitution chimique du cluster de rec-CCIS2b.....	58
Figure 4.6 : spectre d'absorption UV-visible de la protéine rec-CCIS2b. (A) Spectre enregistré après 2 heures d'incubation. (B) Spectre enregistré après 24h d'incubation, en utilisant une cuve avec une épaisseur optique de 1 cm, dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,3.....	63
Figure 4.7 : courbe d'étalonnage du fer (0,04 mM à 0,4 mM) effectué à l'aide d'une méthode colorimétrique afin de quantifier la concentration de fer dans les échantillons de protéines reconstituées (rec-CCIS2b). ....	65
Figure 4.8 : schéma de la structure tridimensionnelle de la protéine Fe-S de <i>Chromatium vinosum</i> (toutes les mesures de distance sont exprimées en unités d'angströms). (A) Structure tridimensionnelle où les bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (B) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés jaunes avec la longueur des sites en angströms. Certaines parties du modèle ont été omis pour plus de clarté. (C) Modèle de référence d'un cluster [4Fe-4S]. En jaune sont représentés les atomes de soufre et en violet les atomes de fer. (Gao, et al., 2022) .....	67
Figure 4.9 : représentation schématique du site de liaison tétraédrique pour un cluster [4Fe-4S]. Où « a », « b », « c » et « d » représentent les résidus cystéines.....	69
Figure 4.10 : schéma des structures tridimensionnelles de la protéine CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de CCIS2b où les sites de liaisons sont 4 cystéines représentés en jaune (C13, C17, C61 et C65) et en bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés jaunes avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de CCIS2b prédite par I-TASSER avec des représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté. ....	73

Figure 4.11 : schéma des structures tridimensionnelles de C13D CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de C13D CCIS2b où les sites de liaisons sont 3 cystéines représentés en jaune (C17, C57 et C61) et en gris une aspartate remplace la cystéine 13 de départ. En bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de C13D CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de C13D CCIS2b prédite par I-TASSER avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté. ....76

Figure 4.12 : schéma des structures tridimensionnelles de C61D CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de C61D CCIS2b où les sites de liaisons sont 3 cystéines représentés en jaune (C13, C17, C57) et en gris une aspartate remplace la cystéine 61 de départ. En bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de C61D CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de C61D CCIS2b prédite par I-TASSER avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté. ....78

Figure 4.13 : schéma des structures tridimensionnelles de C13A CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de C13A CCIS2b où les sites de liaisons sont 3 cystéines représentés en jaune (C17, C57, C61) et en gris une alanine remplace la cystéine 13 de départ. En bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de C13A CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de C13A CCIS2b prédite par I-TASSER avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté. ....80

Figure 4.14 : schéma des structures tridimensionnelles de C61A CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de C61A CCIS2b où les sites de liaisons sont 3 cystéines représentés en jaune (C13, C17, C57) et en gris une alanine remplace la cystéine 61 de départ. En bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de C61A CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de C61A CCIS2b prédite par I-TASSER avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté. ....82

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 : composition des gels d'électrophorèse. ....	44
Tableau 3.2 : gamme d'étalonnage du Fe (II) de 0 à 0,4mM.....	47
Tableau 4.1 : différents paramètre testés pour la tentative de production de l'holo-CCIS2b.....	54
Tableau 4.2 : différents paramètres testés pour l'insertion du cluster Fe-S.....	60
Tableau 4.3 : valeurs moyennes des longueurs de liaison des atomes de fer et de soufre dans le cluster [4Fe-4S] de HIPIP de Chromatium (toutes les mesures de distance sont exprimées en unités d'angströms). Inspiré de (Carter, et al., 1972).....	68
Tableau 4.4 : résumé des distances entre les sites de liaisons au cofacteur de 9 protéines Fe-S naturelles (toutes les mesures de distance sont exprimées en unités d'angströms). ....	70
Tableau 4.5 : résumé des distances ligand-ligand (en angströms) des différentes structures Fe-S (protéines naturelles et variantes de CCIS2b). ....	83
Tableau 4.6 : résumé des distances inter-hélices des structures analogues de CCIS2b et des variantes de CCIS2b.....	86

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

μM	MicroMolaire
μL	MicroLitre
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Å	Angström
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
APS	Ammonium PerSulfate
CO	Monoxyde de Carbone
Da	Dalton
DO	Densité Optique
DTT	DiThioThreitol
E. coli	Escherichia coli
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
ERA	Espèce réactive de l'azote
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fe-S	Cluster fer-soufre

FMN	Flavine mononucléotide (oxydé)
FMNH <sub>2</sub>	Flavine mononucléotide (réduit)
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
H <sub>2</sub>	Dihydrogène
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
HCl	Acide Chloridrique
IPTG	IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside
LB	Luria Bertani
KDa	KiloDalton
mL	MilliLitre
mM	MilliMolaire
MV	MilliVolt
N <sub>2</sub>	Diazote
NaCl	Chlorure de Sodium
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide (oxydé)
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (réduit)
Ni	Nickel
Nm	Nanomètre
NO	Oxyde nitrique

O <sub>2</sub>	Dioxygène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Électronique
RPM	Tours par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
UV	Ultra-Violet
UV-VIS	Spectroscopie Ultra-Violet
V	Volt



## RÉSUMÉ

Les protéines fer-soufre (Fe-S) sont des métalloprotéines ubiquitaires jouant un rôle crucial dans le transfert d'électrons nécessaire à de nombreuses réactions métaboliques. Une sous-famille spécifique, possédant un cluster [4Fe-4S], est spécialisée dans la détection de l'oxyde nitrique (NO), régulant ainsi la réponse au stress nitrosatif. Bien que leur capacité à influencer l'expression génique en réponse au NO soit reconnue, le mécanisme de nitrosylation et son contrôle restent mal compris. Cette étude se concentre sur la réactivité des protéines [4Fe-4S] *de novo*, explorant la relation entre leur environnement, leur structure électronique et leur réactivité. La conception *de novo* offre une approche prometteuse pour comprendre comment la géométrie et la réactivité des cofacteurs métalliques influencent les protéines Fe-S. Une fois développées, ces protéines modèle permettront de contrôler précisément les sites réactifs, ouvrant la voie à la création intentionnelle de molécules de signalisation gazeuse pertinentes sur le plan biologique. Une telle approche pourrait être prometteuse pour lutter contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques en ciblant le système bactérien de réponse au NO.

Mots clés : protéines fer-soufre, nitrosylation, cluster [4Fe-4S], conception *de novo*, stress nitrosatif

# CHAPITRE 1 - GÉNÉRALITÉS SUR LES CLUSTERS FE-S

Ce premier chapitre est dédié à établir le contexte scientifique et à fournir une explication détaillée des bases théoriques nécessaires à la compréhension des fondements du projet.

## 1.1. Origine de la vie et chimie des clusters Fe-S

Les clusters fer-soufre (Fe-S) sont des agrégats atomiques métalliques constitués d'atomes de fer et de soufre. Ils représentent une des classes les plus répandues de cofacteurs dans la nature et faisant partie intégrante de la plupart des métalloprotéines. Parmi les métalloprotéines ayant pour cofacteur le fer, on distingue celles à fer héminiques (comme la myoglobine ou la cytochrome oxydase) et celles non héminiques dont font partie les protéines à cluster Fe-S. Les propriétés chimiques intrinsèques des clusters Fe-S suggèrent qu'ils pourraient être parmi les composants les plus anciens du vivant et sont à l'origine de la vie. Ils sont sans doute parmi les premiers catalyseurs que la nature ait utilisés. La théorie du monde fer-soufre de Günter Wächtershäuser suggère que les conditions extrêmes régnant dans l'atmosphère primitive auraient favorisé une chimie du fer et du soufre et que la vie pourrait avoir eu son origine dans une atmosphère anaérobie dans les sources hydrothermales avec l'apparition d'un système métabolique auto-catalytique basé sur la fixation autotrophique du CO<sub>2</sub> et l'emploi de la pyrite (Fe-S<sub>2</sub>), en présence d'H<sub>2</sub>S (réaction 1) (Wächtershäuser, 1988).



Une notion courante dans les théories axées sur le métabolisme est que les catalyseurs minéraux ont été progressivement remplacés par des biocatalyseurs à protéines. Il y a donc une remarquable similitude entre le fonctionnement des minéraux spontanément formés au sein des sources hydrothermales et des enzymes à clusters Fe-S retrouvées au sein des organismes vivants. Bien que les clusters Fe-S soient supposément des entités ancestrales, et fondamentales dans le monde du vivant, ils n'ont été découverts que tardivement. En effet, il a fallu attendre la fin du 20<sup>ème</sup> siècle pour que les protéines Fe-S soient mises en évidence. L'une des raisons de cette apparition tardive était une absence de coloration visible distinctive des protéines Fe-S contrairement aux protéines contenant d'autres cofacteurs métalliques (notamment les cofacteurs

hèmes). De plus, leur étude est généralement entravée par la présence d'oxygène moléculaire, nécessitant l'utilisation d'équipements spéciaux tels que des hottes anaérobies et des appareils de résonance paramagnétique électronique (RPE), en complément des méthodes habituelles. Les techniques RPE, apparues en 1944 (Ursu, 1968), ont rendu possible la caractérisation des clusters Fe-S dans les années 1960, lorsque le premier signal RPE à  $g = 1,9$  a été observé dans la NADH déshydrogénase, conduisant à la découverte de la première protéine à cluster Fe-S (Beinert & Lee, 1961) (Beinert, Griffiths, & Wharton, 1962). Cette avancée a permis de développer le premier modèle structural des clusters Fe-S, révélant une composition chimique entièrement nouvelle. Depuis lors, de nombreuses protéines Fe-S ont été identifiées, en grande partie grâce à l'amélioration continue des techniques spectroscopiques. Ainsi, un vaste corpus de connaissances sur les propriétés physico-chimiques et les rôles physiologiques des protéines Fe-S a été accumulé jusqu'à ce jour.

## 1.2. Diversité des clusters Fe-S

Les clusters Fe-S sont des agrégats atomiques présents au sein des structures des protéines Fe-S. Ils sont composés de cation de fer ( $\text{Fe}^{2+/3+}$ ) et d'anions sulfures ( $\text{S}^{2-}$ ) coordonnées en différentes structures tridimensionnelles. Les protéines à clusters Fe-S sont trouvées dans tous les règnes du vivant et sont classés principalement en trois catégories de clusters : [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S] (figure 1.1a-c) (Beinert, Holm, & Münck, 1997). Il existe également d'autres configurations plus complexes comme dans la nitrogénase, on retrouve un cofacteur, FeMoco, possédant un cluster [4Fe-3S] combiné avec un cluster Mo-[3Fe-3S] (figure 1.1d) (Johnson, Dean, Smith, & Johnson, 2005) (Berkovitch, Nicolet, Wan, Jarrett, & Drennan, 2004). Généralement, les clusters Fe-S sont liés à des groupements thiols des résidus cystéines. Cependant, d'autres ligands peuvent se coordonner tel que l'azote des résidus histidines (Hauska, Schütz, & Büttner, 2004), aspartate (Gurbiel, Ohnishi, Robertson, Daldal, & Hoffman, 1991) ou arginines (Fuchs & Meyer, 2010). Ainsi, pour exemple, les ligands histidines peuvent agir comme des ligands ambidentés, l'un des deux atomes d'azote peut se coordonner, tandis que les ligands aspartates peuvent agir comme des ligands monodentés, fournissant un atome d'oxygène pour la coordination. Ces interactions contribuent à la stabilité des clusters Fe-S.

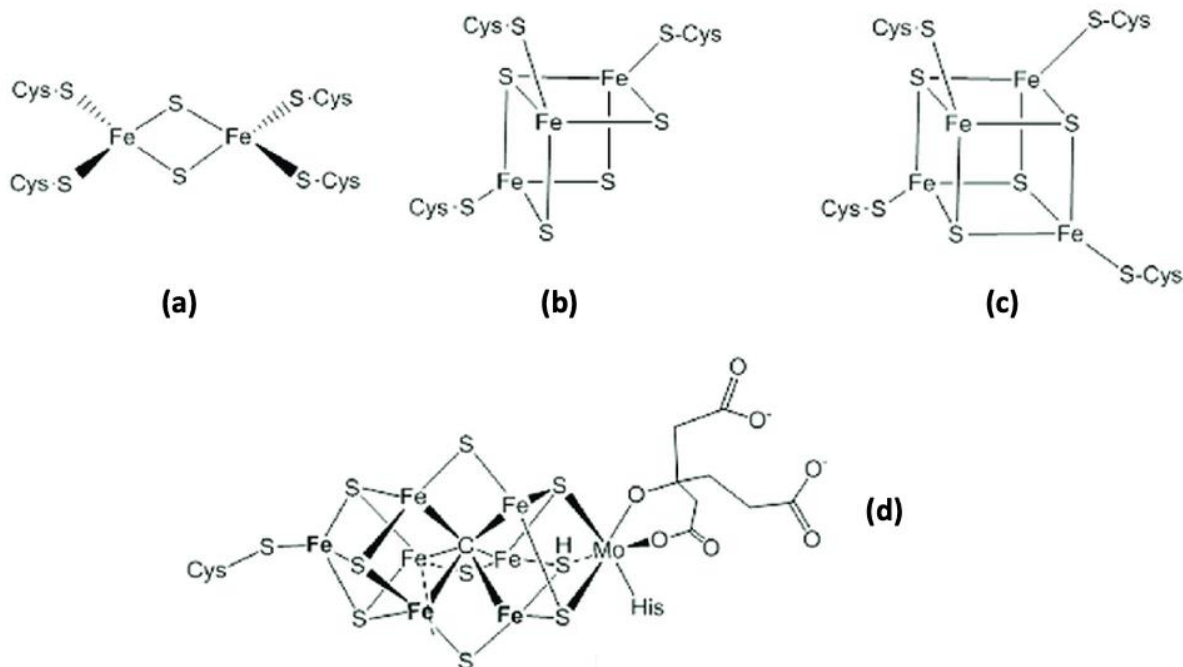


Figure 1.1 : exemples de structures de clusters Fe-S : (a) cluster rhombique [2Fe-2S], (b) cluster cubique dérivé [3Fe-4S], (c) cluster cubique [4Fe-4S], et (d) cofacteur Femoco. (Cammack, 2011)

### 1.2.1. Clusters [2Fe-2S]

Les clusters [2Fe-2S] dit de type rhombique font partie des clusters Fe-S les plus rudimentaires où les atomes de fer adoptent une géométrie tétraédrique (Figure 1.1c). Ils existent principalement sous deux états d'oxydation formelle différents, un état oxydé [2Fe-2S]<sup>2+</sup> où les deux fer sont sous forme ferrique (Fe<sup>3+</sup>), et un état réduit [2Fe-2S]<sup>+</sup> où l'un des deux fer est sous forme ferrique et l'autre sous forme ferreuse (Fe<sup>2+</sup>). Toutefois, il est possible de produire chimiquement un état super-réduit, [2Fe-2S]<sup>0</sup>, dans certaines protéines et des complexes modèles où les deux fer sont ferreux (Leggate, Bill, Essigke, & Hirst, 2004).

Un cas particulier des clusters [2Fe-2S] existe, où un des atomes de fer peut être lié par l'atome d'azote de deux histidines, le cluster Fe-S étant alors nommé cluster [2Fe-2S] de type Rieske ([2Fe-2S]<sup>R</sup>). Le cluster Rieske est couramment retrouvé dans les dioxygénases microbiennes impliquées dans la dégradation des composés aromatiques, ainsi que dans les chaînes de transport d'électrons associées à la photosynthèse dans les chloroplastes et à la respiration dans les mitochondries (Rieske, MacLennan, & Coleman, 1964).

### 1.2.2. Clusters [3Fe-4S]

Les clusters [3Fe-4S] dit de type cubique dérivé sont constitués de trois atomes de fer et de quatre atomes de soufre (Figure 1.1b). Ils peuvent exister sous deux états d'oxydation possibles :  $[3\text{Fe-4S}]^+$  où tous les fers sont à l'état  $\text{Fe}^{3+}$  et  $[3\text{Fe-4S}]^{2-}$  où tous les fer sont à l'état  $\text{Fe}^{2+}$ . Certaines protéines Fe-S peuvent utiliser la labilité d'un ion ferreux présent pour convertir leur cluster [3Fe-4S] en cluster [4Fe-4S] sous l'effet d'un agent réducteur. C'est notamment le cas de l'aconitase, qui est inactive lorsque son cluster Fe-S contient uniquement trois cations de fer, mais qui devient active lorsqu'elle acquiert le quatrième. Toutefois, ces clusters résultent généralement de la dégradation oxydative d'un cluster [4Fe-4S] (Johnson, Dean, Smith, & Johnson, 2005).

### 1.2.3. Clusters [4Fe-4S]

Les clusters [4Fe-4S] sont constitués de quatre atomes de fer et de quatre atomes de soufre adoptant une configuration de type cubane (Figure 1.1 a). Ces clusters peuvent être sous 3 états d'oxydation différents :  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ ,  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  et  $[4\text{Fe-4S}]^+$  où respectivement un, deux et trois atomes de fer sont formellement ferreux, les autres étant ferriques. Il est également possible chimiquement de générer un cluster hyper réduit,  $[4\text{Fe-4S}]^0$ , mais cet état rédox n'est pas possible dans un contexte biologique (Scott, Berlinguette, Holm, & Zhou, 2005), dû à l'instabilité de cet état d'oxydation, des conditions réductrices nécessaires, de l'incompatibilité avec les potentiels rédox biologiques, de la réactivité excessives et du manque de mécanismes cellulaires pour gérer un tel état . Les trois états rédox accessibles constituent deux couples rédox associés à des potentiels rédox distincts : le couple  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$  qui est le plus fréquemment rencontré et le couple  $[4\text{Fe-4S}]^{3+/2+}$ . Ainsi, pour chaque protéine, un seul couple rédox est disponible.

Les clusters [4Fe-4S] ont la capacité de moduler leur état d'oxydation, se classant en deux catégories distinctes : les ferrédoxines classiques à potentiel rédox relativement bas (de -0,3 à -0,7 V), et les « HiPIPs » (High Potential iron-sulfur Proteins) à haut potentiel rédox (de 0,1 à 0,4 V) (figure 1.2) (Jafari, Tavares Santos, & Bergmann, 2022). Ils peuvent donc remplir divers rôles au sein des systèmes biologiques, en participant notamment au transfert d'électrons dans de nombreuses protéines, comme la nitrogénase (Kästner & Blöchl, 2007 ). HIPIP accorde le potentiel de réduction de son cluster par la création d'une « cage » supramoléculaire autour du

cluster, composée de groupes latéraux d'acides aminés hydrophobes et aromatiques, qui isolent le cluster de son environnement.

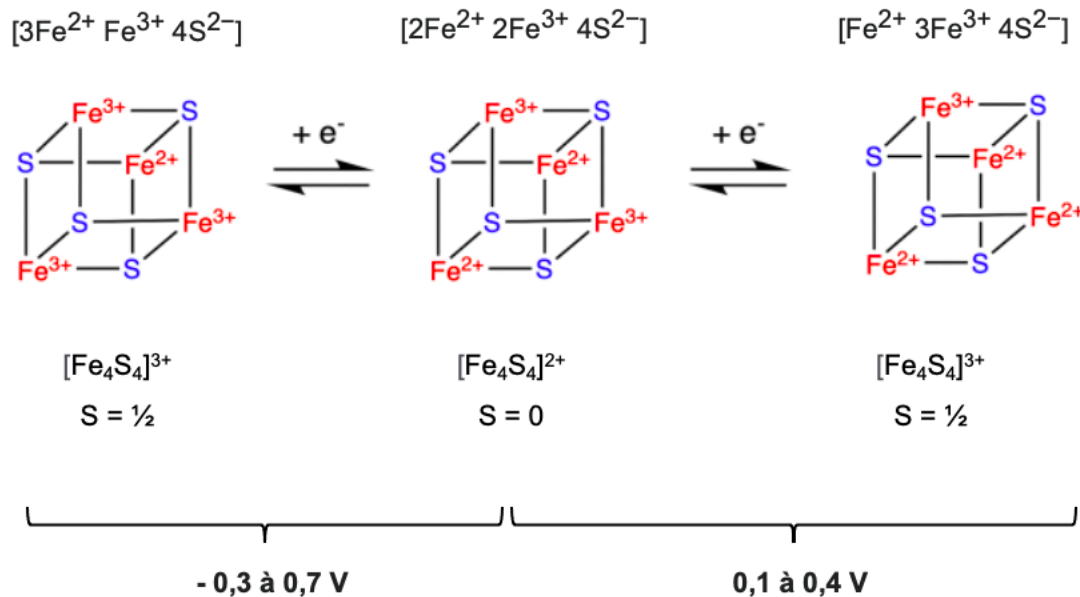


Figure 1.2 : différents états d'oxydation du cluster [4Fe-4S]. Le passage d'une ferrédoxine à bas potentiel à une ferrédoxine haut potentiel. Adapté de (8959j, 2022)

### 1.3. Fonctions des clusters Fe-S

Les protéines Fe-S jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques, notamment dans les enzymes-rédox, où les clusters Fe-S servent de conducteurs d'électrons entre des couples rédox physiquement séparés, permettant ainsi le transfert d'électrons. Cette fonction a été la première démontrée pour les clusters Fe-S, mais la découverte et l'étude de nombreuses autres protéines Fe-S ont révélé de nouvelles fonctions biologiques. Parmi celles-ci, on trouve la catalyse enzymatique, les réactions de l'acide de Lewis (comme observé avec l'aconitase mitochondriale) et les enzymes radicalaires S-adénosylméthionine (SAM). De plus, ces protéines peuvent réguler l'expression des gènes en réponse au stress oxydatif (via les protéines de réponse superoxyde (SoxR)), aux niveaux d'oxygène (via les protéines de réduction du fumarate-nitrate (FNR)), aux niveaux d'oxyde nitrique (via les protéines régulatrices R sensibles à l'oxyde nitrique (NsrR)) et aux niveaux de fer (via les protéines régulatrices du fer (IRP)). Elles sont

également impliquées dans le métabolisme de l'ADN, notamment via Xeroderma pigmentosum group D (XPD). Toutes ces propriétés des clusters Fe-S seront discutées de manière plus détaillée dans les sections suivantes.

Il est également important de noter qu'un grand nombre de séquences polypeptidiques caractéristiques permettent de prédire la présence d'un cluster Fe-S au sein d'une protéine. Par exemple, chez *E. coli*, plus de 30 motifs ont été identifiés (Fontecave, 2006), dont le motif le plus fréquent est CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>C, présent dans les systèmes impliqués dans le transfert d'électrons. On peut également citer le motif de type CX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>C, caractéristique des enzymes radicalaires SAM. Cependant, certaines protéines Fe-S présentent des motifs de coordination du cluster Fe-S qui ne correspondent à aucune séquence consensus connue, ce qui rend difficile la prédiction et l'identification de nouvelles protéines Fe-S uniquement à partir de leur séquence en acides aminés, soulignant ainsi la grande flexibilité de ce type de protéine lors de la sélection des sites de coordination du cluster.

### 1.3.1. Transfert d'électrons : le cas de la phosphorylation oxydative

Comme évoqué précédemment, les clusters Fe-S jouent un rôle essentiel dans le transfert d'électrons, alternant entre un état ferrique et ferreux. Leur large éventail de potentiels rédox est indispensable dans les chaînes de transfert d'électrons des mitochondries, qui catalysent la production d'ATP. Cette chaîne respiratoire comprend quatre complexes protéiques abritant jusqu'à 14 clusters Fe-S, où les électrons circulent d'un donneur Fe-S à un accepteur selon un gradient de potentiel rédox (figure 1.3) (Sazanov & Hinchliffe, 2006) (Fei, et al., 2005) (Crofts, 2004) (Calhoun, Thomas, & Gennis, 1994). Cette propriété repose sur la capacité des atomes de fer du cluster à passer facilement entre un état réduit Fe<sup>2+</sup> et un état oxydé Fe<sup>3+</sup>, leur permettant ainsi de donner et/ou accepter des électrons à d'autres entités. Ces clusters peuvent agir comme des transporteurs d'électrons à l'intérieur d'une même protéine (transfert intramoléculaire) ou entre différentes protéines (transfert intermoléculaire), parfois sur de longues distances.

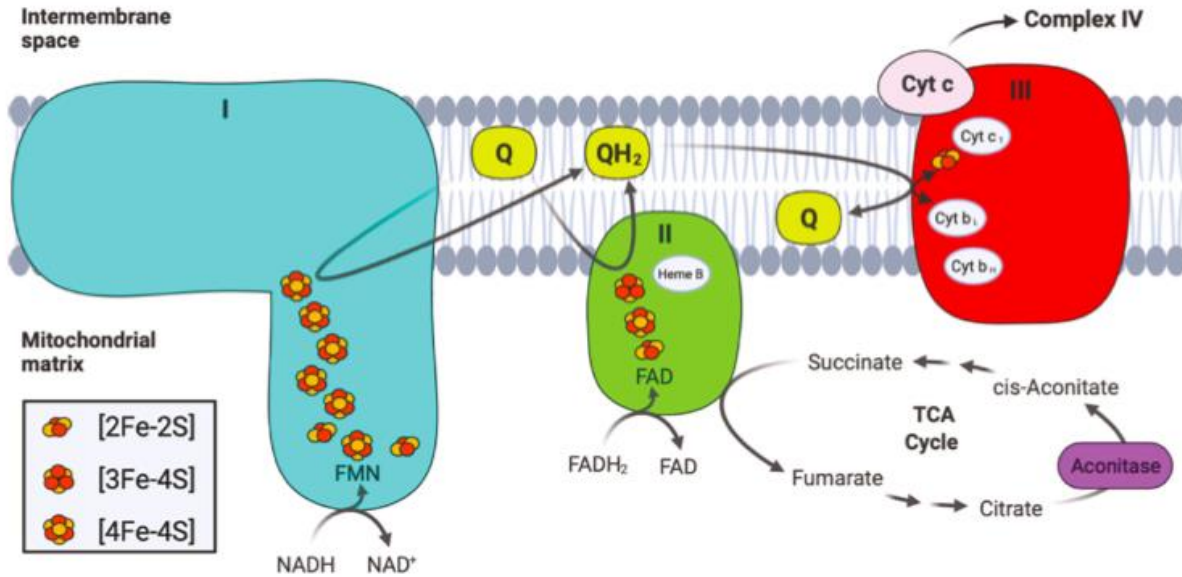


Figure 1.3 : schéma simplifié de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le complexes I (bleu), II (vert), and III (rouge). Une molécule de NADH est oxydée en NAD<sup>+</sup> par le cofacteur FMN du complexe I générant 2 électrons qui sont par la suite transférés par l'intermédiaire de 8 clusters Fe-S afin de réaliser la réduction de la coenzyme Q<sub>10</sub> en ubiquinol Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub>. Le complexe II réduit également la coenzyme Q<sub>10</sub> en oxydant une molécule de succinate en fumarate générant 2 électrons transférés par 3 clusters Fe-S. L'ubiquinol Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub> transporte les électrons jusqu'au complexe III qui l'oxyde afin de réduire deux cytochromes c. Les cytochromes c réduits fournissent les électrons au complexe IV. (Read, Bentley, Archer, & Dunham-Snary, 2021)

### 1.3.2. Catalyse rédox : le cas du radical S-adényl méthionine

Les clusters Fe-S participent également à la catalyse rédox ; ils peuvent être au cœur de réactions impliquant la chimie radicalaire telles que celles utilisées par le radical S-adényl-méthionine (SAM). Les enzymes radicalaires SAM sont une superfamille qui effectuent un clivage réducteur de la S-adényl-L-méthionine par l'intermédiaire d'un électron provenant d'un cluster [4Fe-4S]<sup>+</sup> afin de générer un radical, généralement un radical 5'-désoxyadényl (5'-dA<sup>•</sup>) (figure 1.4). Cet intermédiaire catalytique radicalaire permet d'effectuer des transformations inhabituelles (du point de vue de la chimie organique) très variées. Il va effectuer différentes réactions notamment par abstraction d'hydrogène radicalaire sur une chaîne alcane, une réaction extrêmement difficile à réaliser en chimie, pour conduire à des réactions de méthylation, d'insertion de soufre, de décarboxylation ou encore d'oxydation d'alcool.



Les enzymes de cette superfamille utilisent un motif extrêmement conservé qui leur est caractéristique (CX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>C) pour lier le cluster [4Fe-4S] et sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques, notamment la biosynthèse des cofacteurs, l'activation des enzymes, les modifications post-traductionnelles et la biosynthèse des antibiotiques (Broderick, Duffus, Duschene, & Shepard, 2014).

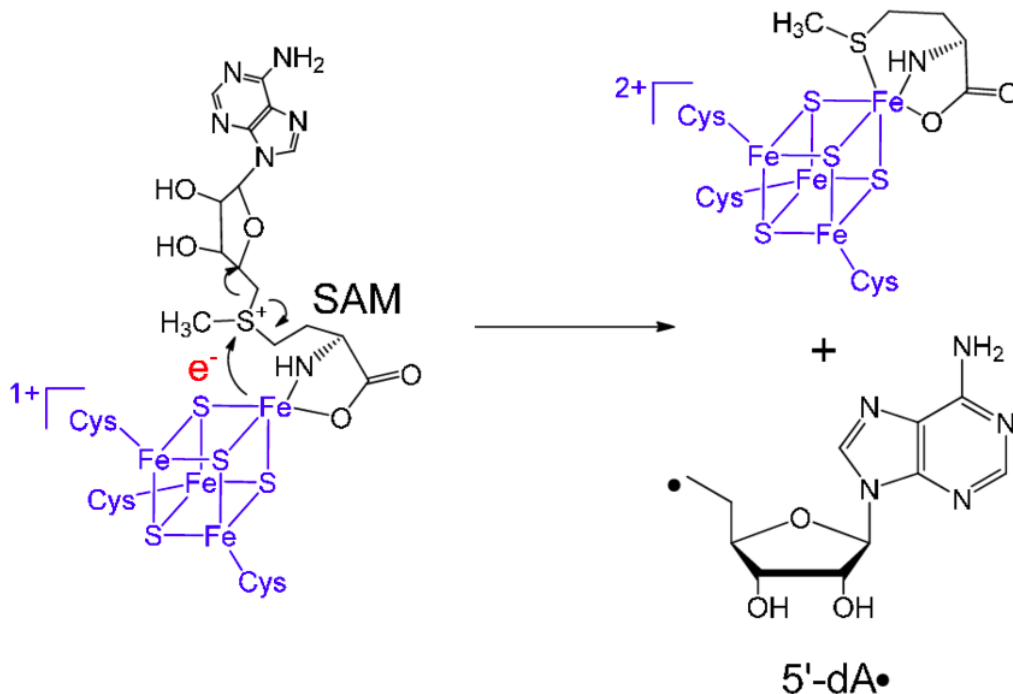


Figure 1.4 : mécanisme du S-adenosylméthionine (SAM). Clivage réducteur avec l'électron fourni par le cluster [4Fe-4S]<sup>+</sup> pour donner le radical 5'-dA<sup>\*</sup> et la méthionine dans les enzymes SAMs radicales. La molécule de SAM (noir) se lie à un cluster [4Fe-4S] (bleu) par un de ces atomes de fer. Le cluster [4Fe-4S] permet la réduction et le clivage du SAM en générant une molécule de méthionine et une espèce radicalaire 5'-dA<sup>\*</sup> (noir). Cette espèce radicalaire va permettre de réaliser un grand nombre de réactions telles que la méthylation ou l'insertion d'un atome de soufre. (Yang & Li, 2013)

### 1.3.3. Catalyse non-rédox : le cas de l'aconitase

Les aconitases sont des métalloenzymes dotées d'un cluster [4Fe-4S] qui agissent comme des acides de Lewis vis-à-vis de leur substrat. Ce dernier est activé par des réactions d'hydratation et de déshydratation. L'aconitase sous forme active possède un cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup> et sous forme inactivée un cluster [3Fe-4S]<sup>+</sup>. Dans la forme active l'atome de fer labile est coordonné à une molécule d'eau et non à la cystéine. Un exemple bien connu de ce processus est l'isomérisation

du citrate en isocitrate dans le cycle de Krebs (Figure 1.5) (Lloyd, Lauble, Prasad, & Stout, 1999).

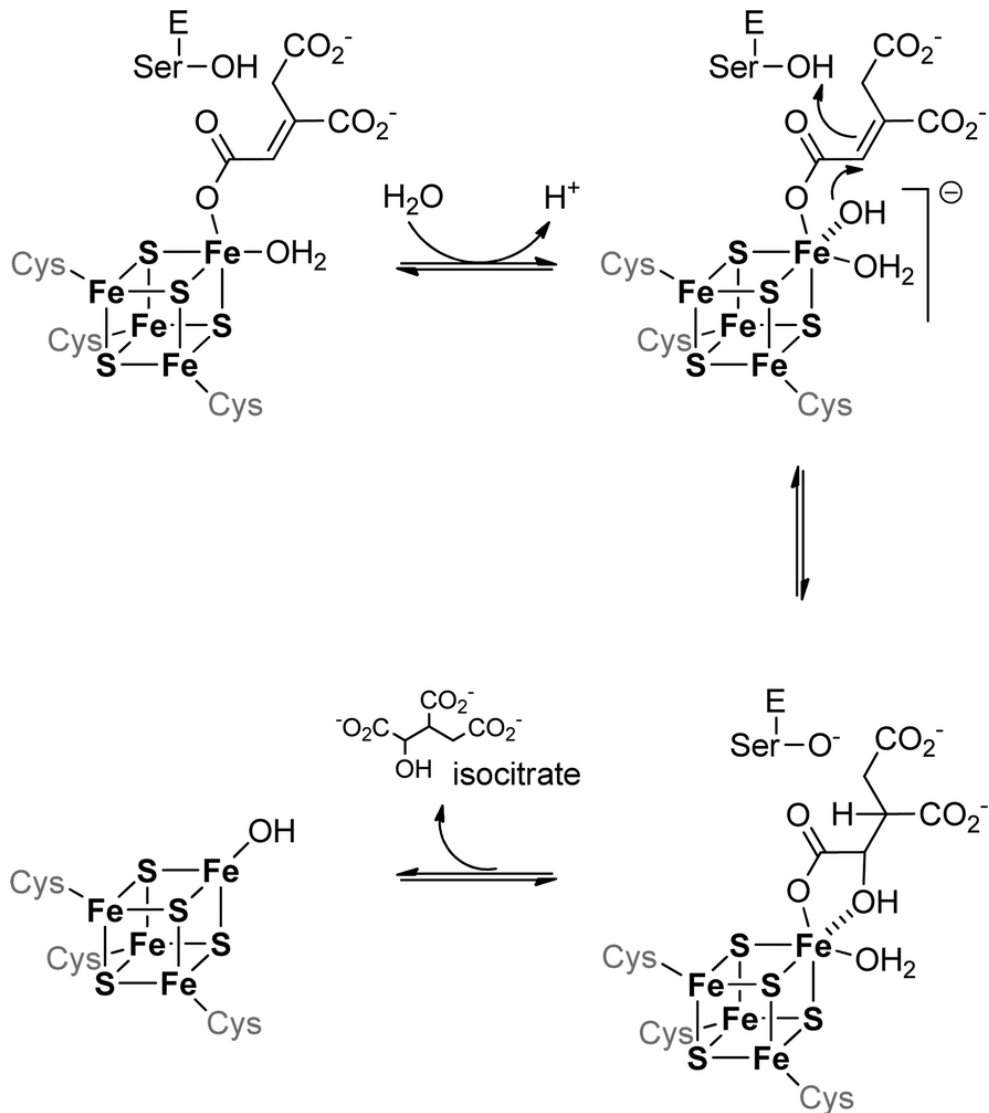


Figure 1.5 : mécanise de l'aconitase. (Lauble, Beinert, & Stout, 1992)

#### 1.3.4. Régulateurs de gènes : le cas de IRP-1, SoxR, FNR et NsrR

Les procaryotes sont équipés de biocapteurs moléculaires qui leur permettent de réagir à diverses conditions de stress, telles que le stress oxydatif, les composés toxiques et les interactions avec d'autres organismes. Ce qui est particulièrement remarquable, c'est que les

clusters Fe-S peuvent être sensibles aux variations des conditions intracellulaires, et ainsi jouer un rôle crucial dans la régulation de certains processus biologiques. Plusieurs régulateurs ont été identifiés : chacun est sensible à un stimulus spécifique et peut agir à deux niveaux différents. Certains régulent l'expression génique au niveau transcriptionnel, comme FNR (fumarate and nitrate reductase), SoxR (superoxide response) et NsrR (Nitric oxide-sensitive regulator R), tandis que d'autres agissent au niveau de la traduction, comme les protéines IRP (iron regulatory protein) chez les eucaryotes.

La protéine régulatrice IRP-1 a été la première IRP à être identifiée. Une seconde a été identifiée par la suite IRP-2. Elles agissent comme des capteurs des niveaux de fer dans la cellule, possédant ainsi deux fonctionnalités distinctes. En conditions de carence en fer (figure 1.6A), IRP1 agit principalement comme une protéine régulatrice de la traduction. Dans ces conditions, IRP1 adopte une conformation où il se lie aux séquences spécifiques d'ARN appelées IREs (Iron-Responsive Elements), situées dans les régions non traduites (UTR) de certains ARN messagers (ARNm) impliqués dans le métabolisme du fer. La liaison d'IRP1 aux IREs dans l'UTR 5' des ARNm (par exemple, ceux de la ferritine et d'ALAS2) inhibe la traduction de ces ARNm, réduisant ainsi la production de protéines responsables du stockage ou de l'utilisation du fer. Par contre, la liaison d'IRP1 aux IREs dans l'UTR 3' des ARNm (comme celui du récepteur de la transferrine) stabilise ces ARNm, augmentant leur traduction et donc la production de protéines impliquées dans l'importation du fer. IRP2 fonctionne de manière similaire à IRP1 en conditions de faible fer, se liant aux IREs des ARNm pour réguler leur stabilité et leur traduction. Comme IRP1, IRP2 inhibe la traduction de protéines comme la ferritine en se liant aux IREs dans l'UTR 5' des ARNm, et stabilise les ARNm pour des protéines comme le récepteur de la transferrine en se liant aux IREs dans l'UTR 3', augmentant ainsi leur traduction. En présence de fer (figure 1.6B), IRP1 change de rôle et agit principalement comme une aconitase cytosolique. IRP1 incorpore un cluster [4Fe-4S] devenant ainsi l'aconitase ACO1 (Volz, 2008), ce qui modifie sa conformation et l'empêche de se lier aux IREs des ARNm. Cette libération des IREs dans l'UTR 5' des ARNm permet la traduction de protéines comme la ferritine, qui stocke le fer. Simultanément, la libération des IREs dans l'UTR 3' des ARNm conduit à la dégradation des ARNm du récepteur de la transferrine, réduisant ainsi l'importation de fer.

De plus, IRP1 agit également en tant que régulateur du stress oxydant et nitrosatif, puisque la traduction de son ARNm est inhibée en présence de ERO (espèces réactives de l'oxygène) et de NO.

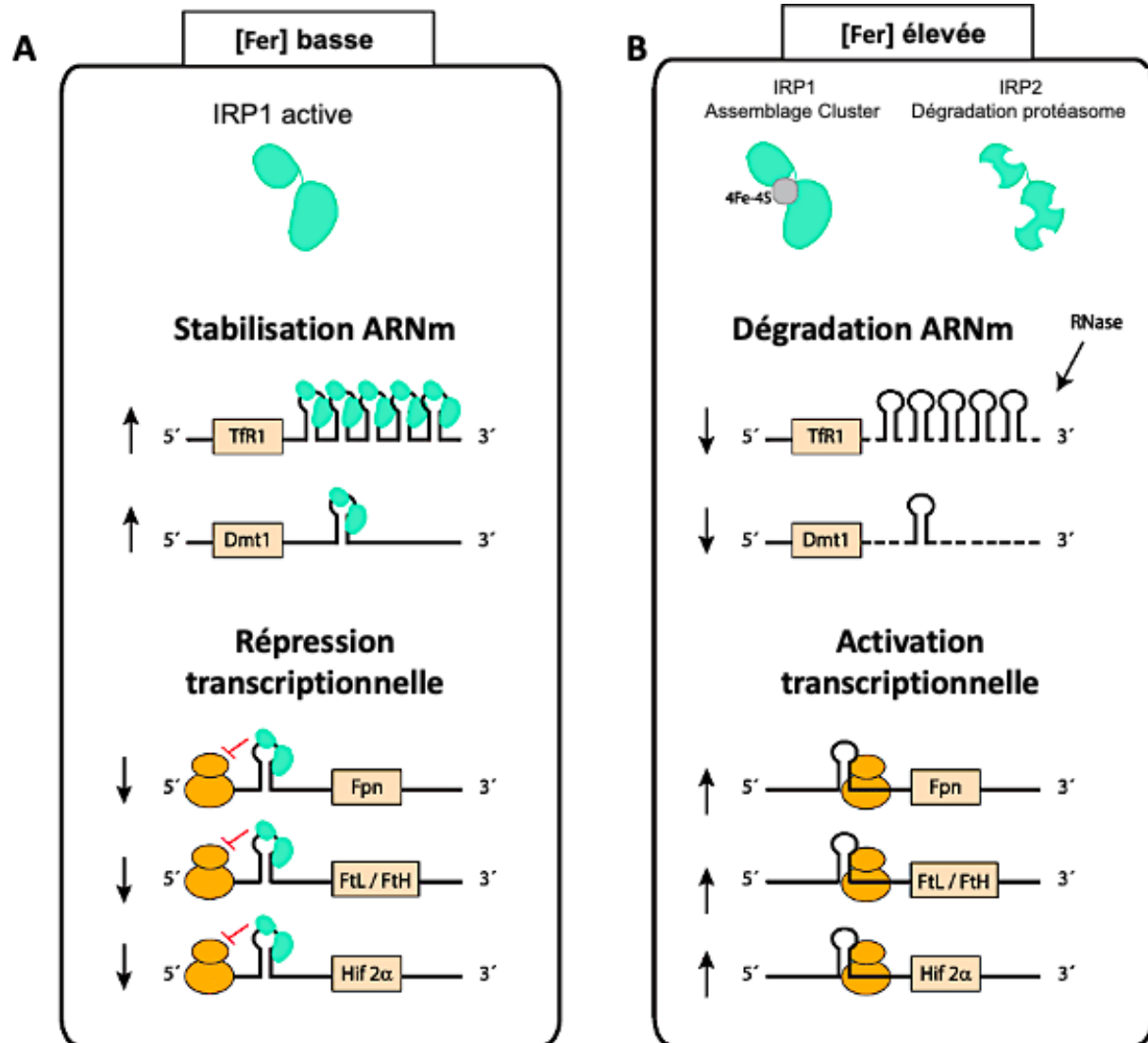
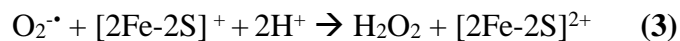
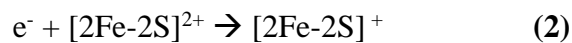


Figure 1.6 : les IRP régulent la traduction et la stabilité des ARNm contenant de l'IRE. Lorsque le fer est limité, les IRP se lient avec une forte affinité aux ARNm de l'IRE et répriment la traduction. Lorsque le fer est abondant, les IRP ne se lient pas aux IRE, ce qui entraîne la traduction des ARNm et la dégradation de l'ARNm de Tfr1. Modifié de (Neves, Haider, Gassmann, & Muckenthaler, 2019).

SoxR, appartenant à la famille des MerR (mercury resistance regulator), est le premier facteur de transcription connu à comporter un cluster Fe-S. À l'origine découvert pour sa capacité

à détecter le stress superoxyde, il a été récemment établi qu'il réagit également au NO. Le cluster [2Fe-2S] de SoxR est crucial pour détecter à la fois le stress oxydant induit par l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le NO. Normalement présents à des niveaux faibles dans les cellules grâce à l'action des superoxydes dismutases, les superoxydes peuvent endommager certains clusters Fe-S par oxydation, justifiant ainsi le développement de mécanismes d'adaptation au stress. Chez *E. coli*, le stress superoxyde active SoxR en oxydant son cluster [2Fe-2S] (Fujikawa, Kobayashi, & Kozawa, Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction, 2012), ce qui stimule l'expression du facteur de transcription SoxS. L'accumulation de SoxS active les systèmes de défense cellulaires, tels que la superoxyde dismutase, facilitant l'élimination des superoxydes et la réparation des dommages oxydatifs spécifiques causés par le stress (Kiley & Beinert, 2003) (figure 1.7). Certaines recherches ont pu démontrer la réaction directe de l' $O_2^{\cdot-}$  avec SoxR<sub>red</sub> afin de former SoxR<sub>ox</sub> (Fujikawa, Kobayashi, & Kozawa, Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction, 2012). Les schémas réactionnels peuvent être résumés comme suit :



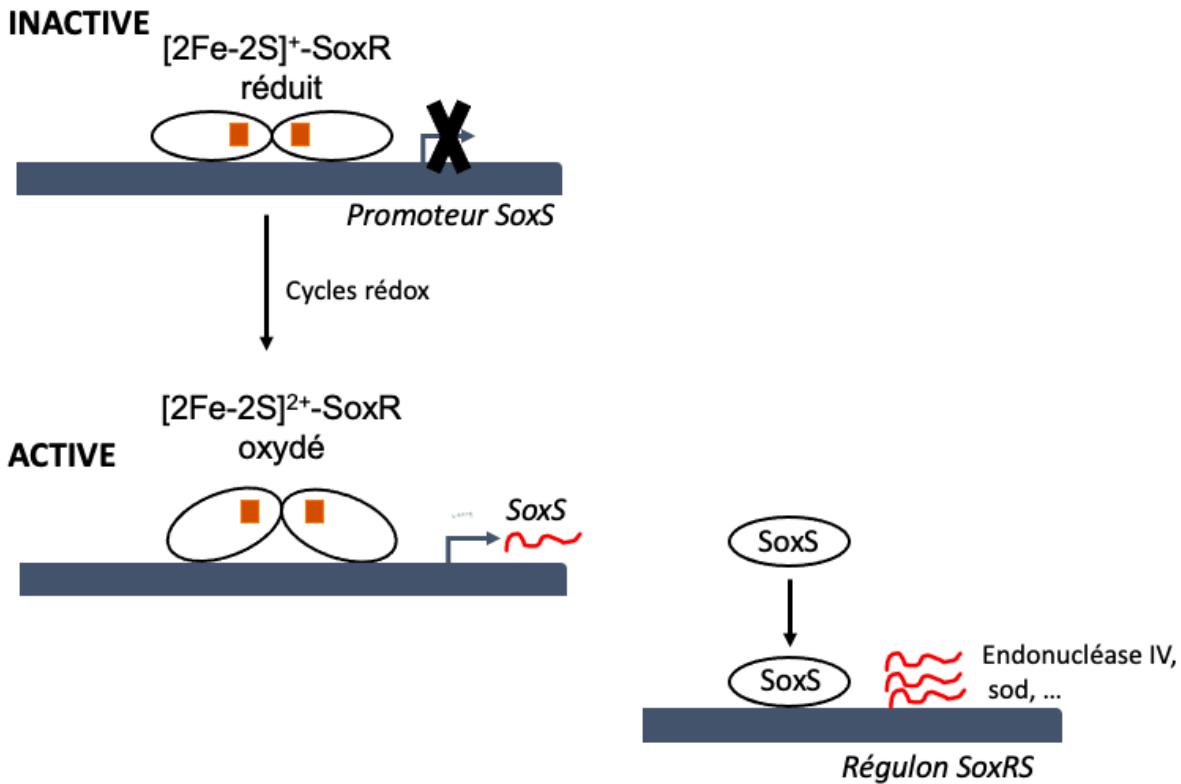


Figure 1.7 : SoxR, un système de contrôle bactérien pour la survie cellulaire sous stress oxydant. La barre de couleur grise représente l'ADN. Le facteur de transcription SoxR contient un cluster [2Fe-2S] par monomère (représentés en cube orange). Dans des conditions aérobie normale, les clusters SoxR [2Fe-2S] sont réduits et la protéine se lie à une région promotrice spécifique de son gène cible *soxS* et inactive sa transcription. Lors d'un stress oxydatif, les clusters [2Fe-2S] subissent une oxydation, entraînant un changement conformationnel de la protéine. La forme oxydée active de SoxR remodèle la conformation du promoteur *soxS* de manière à permettre à l'ARN polymérase d'initier la transcription de SoxS. Inspiré de (Golinelli-Cohen & Bouton, 2017)

FNR agit comme un régulateur chez *E. Coli*, contrôlant l'expression de plus de 100 gènes en réponse à une limitation en oxygène (Kiley & Beinert, 1998) (Green, Scott, & Guest, 2001). Ses fonctions régulent principalement l'adaptation d' *E. coli* à un mode de vie anaérobie, en réprimant l'expression des gènes impliqués dans la respiration aérobie et en activant ceux liés à la réduction des accepteurs d'électrons alternatifs. Contrairement à SoxR, l'activité de FNR en tant que facteur de transcription est principalement régulée par sa capacité à se lier spécifiquement aux sites d'ADN. En conditions anaérobies, FNR se présente sous forme d'homodimère contenant un cluster [4Fe-4S] dans chaque monomère, lui permettant de lier des séquences d'ADN spécifiques pour activer ou réprimer l'expression génique. Cependant, en présence

d'oxygène, le cluster [4Fe-4S] subit une conversion en [2Fe-2S] passant par un état intermédiaire métastable [3Fe-4S] (Bates, et al., 2000). Dans cette configuration, FNR perd sa capacité à se lier à l'ADN, et après une exposition prolongée à l'O<sub>2</sub>, le cluster Fe-S est finalement dégradé, entraînant la formation d'un *apo*-FNR. Ainsi, FNR utilise la sensibilité à l'O<sub>2</sub> des clusters [4Fe-4S] pour détecter les niveaux d'O<sub>2</sub> dans la cellule et réguler le passage entre les métabolismes anaérobie et aérobie.

Bien que les régulateurs bactériens SoxR et FNR soient principalement impliqués dans la détection du stress superoxyde et de l'O<sub>2</sub>, une autre protéine régulatrice découverte chez *E. coli* semble être spécifiquement dédiée à la détection du NO. NsrR détecte le NO dans *E. coli* et active un régulon d'au moins 60 gènes (Partridge, Bodenmiller, Humphrys, & Spiro, 2009) codant pour une flavohémoglobine qui détoxifie le NO en le convertissant en nitrate (ou en oxyde d'azote sous conditions anaérobies) (Stevanin, Read, & Poole, 2007). Cette découverte suggère que NsrR joue un rôle de régulateur global du stress induit par le NO. Il a été démontré que les protéines NsrR de *Bacillus subtilis* et de *Streptomyces coelicolor* lient un cluster [4Fe-4S], qui sert de module de détection du NO (Crack, et al., 2015). Dans NsrR de *Streptomyces coelicolor*, la réaction avec le NO entraînait la perte du cluster Fe-S et la formation d'espèces fer-nitrosyle (Serrano, et al., 2016). Ce processus a conduit à une perte de liaison à l'ADN de haute affinité et à l'activation de gènes précédemment réprimés par [4Fe-4S]-NsrR, y compris ceux codant pour les enzymes détoxifiantes de NO. De plus, la structure de NsrR présente une particularité intéressante : contrairement à la plupart des autres protéines régulatrices contenant des cluster Fe-S, où les quatre ligands du cluster [4Fe-4S] sont généralement des résidus cystéine, chez NsrR, l'aspartate d'un monomère est le quatrième ligand du cluster [4Fe-4S], ce qui est une caractéristique unique. Ainsi, la structure *holo*-NsrR est unique par la présence d'un cluster [4Fe-4S] ligaturé par trois résidus cystéine (Cys93, Cys99 et Cys105) d'un monomère et aspartate (Asp8) de l'autre. Cette structure inhabituelle contribue sa capacité de détection du NO et à sa régulation de l'expression génique en réponse à ce gaz.

### 1.3.5. Interaction avec ADN/ARN : un autre cas, XPD

Plusieurs familles de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN possèdent des clusters Fe-S. Ces protéines comprennent des membres de la famille des polymérase, des

primases, des ADN glycosylases (endonucléase III, MutY) ou encore à celle des ADN hélicases (DinG, XPD) (Ekanger, Oyala, Moradian, Sweredoski, & Barton, 2018) (O'Brien, et al., 2017). Récemment, des recherches ont mis en évidence le rôle de l'hélicase du groupe D de Xeroderma pigmentosum (XPD) qui appartient à la 5'-3' superfamille 2 (SF2) dans le déroulement de l'ADN endommagé lors du processus de réparation par excision de nucléotides. Chez les eucaryotes, XPD, dotée d'un cluster Fe-S, fait partie des composants du facteur de transcription IIIH (TFIIH), qui comprend neuf autres sous-unités protéiques (Constantinescu-Aruxandei, Petrovic-Stojanovska, Penedo, White, & Naismith, 2016). La principale fonction enzymatique de XPD est de dérouler la double hélice d'ADN autour des lésions afin de permettre la réparation (Zurita & Merino, 2003). Pour ce faire, XPD se lie un cluster [4Fe-4S] crucial à son activité hélicase (Rudolf, Makrantonis, Ingledew, Stark, & White, 2006). On suppose qu'en se liant à l'ADN, XPD transfère un électron qui parcourt de longues distances à travers les bases de la double hélice pour réduire le cluster [4Fe-4S] d'une autre protéine XPD fixée à un autre endroit de l'ADN, créant ainsi un flux d'électrons à travers l'ADN. De plus, il a été observé que XPD a une plus forte affinité pour l'ADN lorsque son cluster Fe-S est oxydé sous forme [4Fe-4S]<sup>3+</sup>, que lorsqu'il est réduit, sous forme [4Fe-4S]<sup>2+</sup>. Par conséquent, en cas d'interruption du flux d'électrons en raison d'une lésion de l'ADN perturbant l'empilement des bases, la protéine XPD s'accumule sous forme oxydée et reste fixée à l'ADN, permettant ainsi de recruter le complexe IIIH la position de la lésion pour initier la réparation du brin d'ADN (Sontz, Mui, Fuss, Tainer, & Barton, 2012) (Mui, Fuss, Ishida, Tainer, & Barton, 2011).

#### 1.4. Biogénèse et transfert des clusters Fe-S

##### 1.4.1. Machineries cellulaires d'assemblage *in vivo*

La formation optimale des clusters Fe-S a été l'objet de recherches approfondies (Li, et al., 1991) (Jagilinski, et al., In Vivo Biogenesis of a De Novo Designed Iron–Sulfur Protein, 2020) (Grzyb J. , et al., 2012). Il a été démontré que la formation de ces clusters est un processus spontané *in vitro*, où l'apoprotéine est exposée à des sources inorganiques de fer et de soufre dans des conditions réductrices anaérobies (Beinert, Holm , & Münck, 1997). Cependant, en milieu cellulaire, le fer ferreux réagit rapidement avec l'oxygène pour produire des espèces réactives de l'oxygène et du fer ferrique, tandis que le sulfure est instable et se protonne rapidement en H<sub>2</sub>S.



Cela soulève la question de savoir comment ces éléments sont acheminés vers les protéines sans causer de dommages cellulaires, étant donné leur toxicité. Il est ainsi postulé que des protéines spécifiques dans la cellule assemblent les atomes de fer et de soufre en clusters Fe-S *in vivo*. Des études ont montré que l'activité de la nitrogénase d'*Azotobacter vinelandii* nécessite l'assistance de plusieurs protéines pour l'insertion des clusters Fe-S (Jacobson, et al., 1989 ). Trois machineries principales d'assemblage et d'insertion des clusters Fe-S dans les protéines cibles ont été identifiées : ISC (iron-sulfur cluster), SUF (mobilization of sulfur) et NIF (nitrogen fixation)

Les protéines sont d'abord synthétisées sous forme *apo* par la machinerie ribosomique avant d'acquérir un cluster Fe-S par maturation post-traductionnelle, réalisée par des machineries d'assemblage protéiques dédiées (Rubio & Ludden, 2005) (Johnson, Dos Santos, & Dean, 2005). Ces machineries fonctionnent en deux étapes principales : la formation du cluster Fe-S au sein d'une protéine cible ou d'un complexe d'échafaudage, suivi de son incorporation dans une apoprotéine cible à l'aide de plusieurs protéines aux fonctions variées, telles que des protéines de transport (figure 1.8) (Pérard & Ollagnier de Choudens, 581–596 (2018)). Le transfert du cluster Fe-S formé vers les protéines cibles peut également dépendre de protéines chaperonnes, qui facilitent l'interaction entre protéines d'échafaudage et de transfert. En fin de compte, ces machineries fournissent des clusters Fe-S correctement assemblés, en contrôlant étroitement leur trafic et leur acheminement vers les protéines cibles.

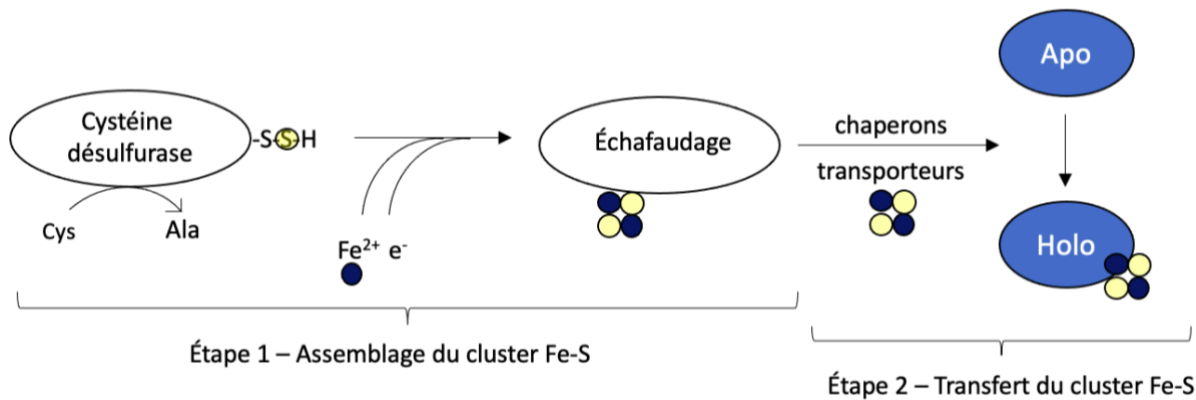


Figure 1.8 : représentation schématique simplifiée du mécanisme d'assemblage des protéines Fe-S. Deux étapes sont identifiées, débutant avec l'assemblage du cluster Fe-S sur une protéine ou un complexe d'échafaudage, puis l'acheminement de ce cluster vers une protéine cible via l'action de protéines chaperons et de transport. Inspiré de (Pérard & Ollagnier de Choudens, 581–596 (2018))

#### 1.4.1.1. Assemblage des clusters Fe-S par la machinerie NIF

La machinerie NIF a été la première à être identifiée pour l'assemblage des clusters Fe-S. Les recherches initiales visaient à comprendre le mécanisme de fonctionnement de la nitrogénase, une enzyme qui réduit l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) sous forme d'ammoniaque ( $NH_3$ ), conférant ainsi aux bactéries fixatrices d'azote, telles qu'*Azotobacter vinelandii* (Jacobson, et al., 1989), la capacité de fixer l'azote. La nitrogénase est composée de deux sous-unités : une dinitrogénase réductase, qui fixe un cluster  $[4Fe-4S]$  et une dinitrogénase, formant un hétérotétramère incorporant 2 clusters  $[8Fe-7S]$  et 2 cofacteurs MoFe (Zheng, White, Cash, Jack, & Dean, 1993).

Les recherches ont identifié plusieurs gènes organisés en opéron, dont *nifS* et *nifU* (figure 1.9), essentiels à l'activité de la nitrogénase. La purification de la protéine nifS a révélé qu'il s'agit d'une enzyme dimérique, une cystéine désulfurase impliquée dans la libération de soufre à partir de la cystéine, utilisé ensuite dans la formation du cluster Fe-S. A partir de ce constat, il a été proposé que *nifU* aurait un rôle complémentaire à *nifS* en étant impliqué dans le transport et le transfert des atomes de fer et de soufre, agissant comme un médiateur dans l'assemblage des clusters en fournissant les éléments nécessaires aux sites de liaison. Ces observations ont suggérer l'existence d'autres gènes aux fonctions similaires à celles de *nifS* et *nifU*.

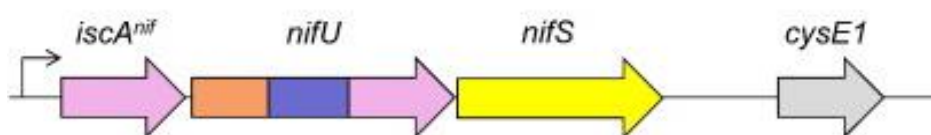


Figure 1.9 : gènes du locus NIF impliqués dans la synthèse des clusters Fe-S chez *A. vinelandii* adapté de (Blanc, Gerez, & Ollagnier de Choudens, 2015)

#### 1.4.1.2. Assemblage de clusters Fe-S par la machinerie ISC

A la suite des premières recherches menées sur *A. vinelandii*, et du séquençage des premiers génomes, l'analyse du génome d'*E. coli* a révélé de séquences homologues à celles codées par l'opéron NIF, nommées *iscA*, *iscS* et *iscU* en référence à leur présence dans un opéron appelé *isc* présent chez *E. coli* (Tanaka, et al., 2016). Cet opéron code pour deux protéines chaperonnes, *hscB* et *hscA*, ainsi qu'une protéine de stockage du fer, *iscX*. L'ensemble de

l'opéron est sous le contrôle de la protéine *iscR*, dont la séquence codante est située juste en amont de *iscS* (Tokumoto & Takahashi, 2001) (figure 1.10).

Des études ont montré que la protéine *iscS* agit comme une cystéine désulfurase, fournissant du soufre lors de l'assemblage de clusters Fe-S. La protéine d'échafaudage *iscU* est capable de lier un ou deux clusters [2Fe-2S] au sein d'un dimère. La ferrédoxine serait impliquée dans la réduction des fonctions persulfure (S<sup>0</sup>) en sulfure (S<sup>2-</sup>) pour former les cluster Fe-S sur *iscU*. Bien que la protéine *iscX* ne fasse pas partie de l'opéron *isc*, elle peut lier le fer et en réguler l'apport pour l'assemblage de clusters Fe-S sur *iscU*. Après maturation, *iscU* interagit avec protéines chaperonnes *hscA* et *hscB* pour transférer le cluster Fe-S vers une apoprotéine cible. La suppression entraîne une diminution significative de l'activité des enzymes Fe-S, mettant en évidence le rôle prépondérant du système *isc* pour la maturation des protéines Fe-S chez *E. coli*, qui ne possède pas le système *nif*. Cependant, l'existence d'une activité résiduelle suggère qu'un système alternatif puisse intervenir dans la biosynthèse des clusters Fe-S afin de compenser l'absence du système ISC : le système SUF.

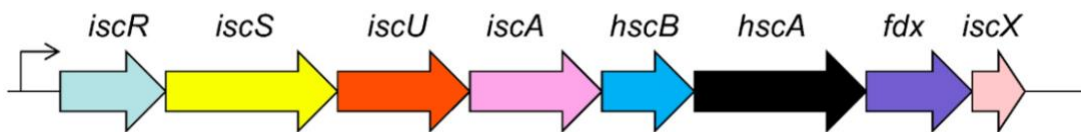


Figure 1.10 : gènes du locus ISC impliqués dans la synthèse des clusters Fe-S chez *E. coli*. (Jaroschinsky, Pinske, & Sawers, 2017)

#### 1.4.1.3. Assemblage des clusters Fe-S par la machinerie SUF

Dans *E. coli*, la machinerie SUF est un opéron codant 6 gènes. La protéine *sufA*, en forme dimérique, peut se lier soit à un cluster [2Fe-2S] soit à un cluster [4Fe-4S]. Comme *iscA*, ces clusters sont transférés *in vitro* à la ferrédoxine ou à la biotine synthase respectivement (Mettert & Kiley, 2014). Ainsi, la machinerie SUF offre une voie alternative d'assemblage de cluster Fe-S chez *E. coli*, particulièrement activée en cas stress oxydant (figure 1.11).

*SufS* code pour une cystéine désulfurase fonctionnellement distincte de *iscS*. Tandis que *sufE* est une protéine de transport du soufre. Des comparaisons entre les associations *sufS-sufE* et

*iscS-iscU* en présence de peroxyde d'hydrogène ont montré une meilleure activité de la cystéine désulfurase pour les protéines SUF en conditions oxydantes. Le complexe d'échafaudage de cluster Fe-S de la machinerie SUF, SufBC2D, est constitué des protéines *sufB*, *sufC* et *sufD* avec une stœchiométrie de 1 : 2 : 1 (Xueyun, Yukako, Akihiro, Ayumi, & Ryouichi). *SufB* reçoit le soufre issu de *sufS* via *sufE* pour l'assemblage d'un cluster Fe-S. Ainsi, le système SUF remplit un rôle similaire à celui du système ISC, mais intervient dans des conditions de stress oxydant et de carence en fer.

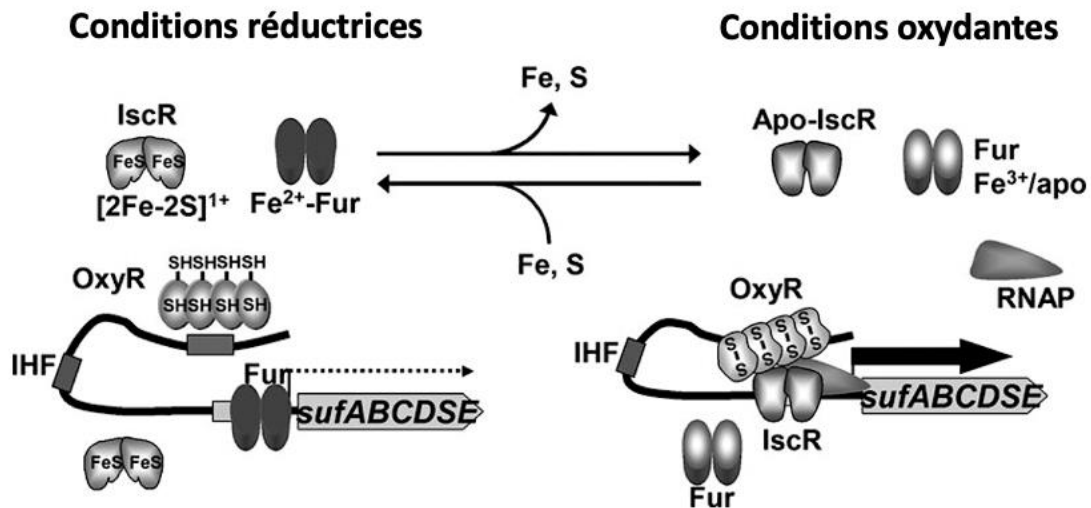


Figure 1.11 : modèle proposé pour la régulation de l'opéron SUF. Lorsque la concentration de fer est suffisante, Fur fixe du fer comme cofacteur et lie la région promotrice de l'opéron SUF ce qui bloque sa transcription. Dans des conditions de carence en fer, Fur est démetallée et il y a levée de la répression. Modifié de (Yeo, Lee, Lee, & Roe, 2006)

#### 1.4.2. Assemblage des clusters *in vitro* : reconstitution chimique

Comme indiqué dans la section précédente, bien que la maturation *in vivo* des protéines Fe-S soit complexe, elle induit une formation des clusters Fe-S contrôlée et optimale par l'intermédiaire de machineries d'assemblage spécifique. Toutefois, l'acquisition des clusters Fe-S par les protéines peut aussi s'effectuer spontanément *in vitro*. La méthode d'insertion *in vitro* d'un cluster fer-soufre dans une protéine commence par la préparation de la protéine cible. Cette étape implique l'isolement de la protéine à partir de la source biologique appropriée, suivie de sa purification à l'aide de techniques de chromatographie pour s'assurer qu'elle est dans sa forme

active et dépourvue de tout cluster. En parallèle, le cluster Fe-S est préparé en utilisant des réactifs tels que des sels de fer et des sulfures. Il est ensuite généré dans des conditions anaérobies, souvent dans une solution contenant un agent réducteur comme le dithiothréitol ou le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Une fois la protéine isolée et le cluster fer-soufre préparé, la reconstitution *in vitro* peut commencer. La protéine purifiée est mélangée avec les réactifs fraîchement préparé dans un tampon réactionnel approprié. Ce mélange est ensuite incubé à la température appropriée pendant une période déterminée. Après l'incubation, la protéine reconstituée est purifiée pour éliminer les réactifs non utilisés, les cofacteurs indésirables et les agrégats protéiques, en utilisant à nouveau des techniques de chromatographie.

La conception *in vitro* au contraire de la formation des cluster Fe-S *in vivo* est soumise à des défis majeures. Les souches bactériennes utilisées dans la production de protéines peuvent être déficientes en termes de biosynthèse et de trafic de cofacteurs, ainsi que de machineries d'assemblage, ce qui nécessite l'introduction et l'optimisation de ces voies pour un système hétérologue. L'étude des protéines Fe-S à l'aide de conception *de novo*, qui sont des modèles protéiques informatiques (non naturels) indiquent que le complexe formé après la reconstitution chimique *in vitro* existent dans plusieurs états oligomères et était chimiquement instable, avec une perte de liaison du cofacteur lors de la réduction en raison de l'hydrolyse du soufre.. On peut tirer de ces informations que l'étape de reconstitution chimique *in vitro* introduit une variabilité significative au sein d'une même conception (Jagilinki, et al., In Vivo Biogenesis of a De Novo Designed Iron–Sulfur Protein, 2020).

Avec l'intérêt porté au développement de modèles Fe-S, la biogenèse *in vivo* peut accélérer l'optimisation des protéines et fournir des modèles fonctionnant dans un contexte cellulaire.

### 1.5. L'effet de l'O<sub>2</sub> sur les cluster Fe-S

Ayant évolué avant l'oxygénation de l'atmosphère terrestre, les clusters Fe-S sont généralement sensible à l'oxygène. Ainsi, les micro-organismes ont élaboré plusieurs mécanismes afin de se protéger de l'oxygène, tels que des mécanismes de réduction rapide de l'oxygène et ses espèces dérivées, des mécanismes de réparations des clusters Fe-S et leur remplacement par des cofacteurs résistant à l'oxygène.

Les sections suivantes porteront sur l'effet de l'oxygène sur les clusters Fe-S et des adaptations mises en place au cours de l'évolution

#### 1.5.1. Inconvénient de l'oxygène : biodisponibilité du fer

L'oxygène moléculaire est un composé réactif qui a pour propriété chimique l'oxydation d'autres molécules. Les règles moléculaires-orbitales dictent que l'oxygène moléculaire accepte un électron célibataire (Naqui, Chance, & Cadenas, 1986). Cette restriction induit une interaction limitée de l'oxygène avec la plupart des biomolécules organiques, cependant elle lui permet d'oxyder les métaux de transition, car ce sont de bons donneurs d'électrons univalents. Ainsi, l'oxygène a la propriété d'oxyder le fer ferreux présent dans l'environnement en sa forme ferrique, qui précipite rapidement sous forme d'hydroxyde ferrique ou forme des complexes insolubles avec les anions. À mesure que l'oxygène s'accumulait dans l'atmosphère, la biodisponibilité du fer devenait limitée dans de nombreux habitats aérobies. La diminution du taux de fer a donc posé un défi sérieux pour la maturation des clusters Fe-S avant les premiers organismes aérobies, puisque les concentrations intracellulaires de fer nécessaires sont de l'ordre du millimolaire (Outten & O'Halloran, 2001). Les micro-organismes ont appris à résoudre ce problème en excréant des sidérophores, des chélateurs de fer qui possèdent une forte affinité pour le  $Fe^{3+}$  et permettent d'internaliser le fer nécessaire au fonctionnement de la cellule (Wandersman & Delepelaire, 2004). Lorsque qu'il devient impossible pour les systèmes sidérophores de fournir une quantité suffisante de fer pour répondre aux besoins cellulaires, des découvertes chez *E. coli* indiquent que cet organisme réagit en supprimant la synthèse de ses enzymes Fe-S les plus abondantes (McHugh, et al., 2003). L'avantage est qu'en supprimant la synthèse d'enzymes Fe-S nécessitant une haute concentration en fer dans le métabolisme central, la cellule redirige le peu de fer qu'elle peut acquérir vers les enzymes de fer indispensables qui appartiennent aux voies de biosynthèse. Ainsi, la forte demande en fer des micro-organismes actuels héritée de leurs ancêtres anaérobies ne convient pas au monde aérobie. Les nombreux ajustements effectués par ces organismes ne confèrent encore qu'une capacité limitée à tolérer la privation de fer. Certains mammifères utilisent des protéines qui séquestrent le fer et des sidérophores bactériens comme stratégie pour supprimer la croissance des bactéries envahissantes.

### 1.5.2. Dégâts oxydatifs des clusters Fe-S : le cas DHAD

Pratiquement tous les organismes ont du mal à se développer lorsque la concentration d'oxygène ambiant est supérieure à celle qu'ils rencontrent normalement dans leur habitat d'origine. Il s'avère que ce soit également un défi pour les clusters Fe-S . En effet, des concentrations élevées d'oxygène favorisent la formation rapide de superoxyde intracellulaire et de peroxyde d'hydrogène qui peuvent déstabiliser la structure du cluster.

Les études de Fridovich et al. ont démontré que les superoxydes inactivent les clusters [4Fe-4S] des déshydratases notamment la dihydroxyacide déshydratase (DHAD) (Gardner & Fridovich, 1991). Les dommages se produisent lorsque le superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) oxyde directement le cluster Fe-S, convertissant transitoirement la forme  $[4Fe-4S]^{2+}$  en un état métastable  $[4Fe-4S]^{3+}$ , qui libère du fer (Figure 1.12), altérant l'intégrité du cluster  $[4Fe-4S]$  et donc l'activité enzymatique (réaction 4 et 5). Le fer perdu étant essentiel au fonctionnement optimal de l'enzyme, l'oxydation conduit à son inactivité. Le peroxyde d'hydrogène oxyde ces amas de la même manière (Varghese, Tang, & Imlay, 2003).

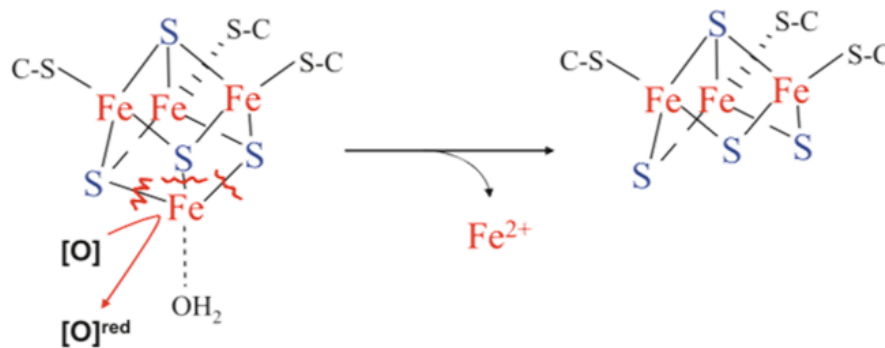
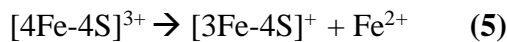
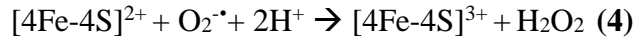


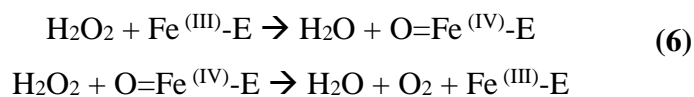
Figure 1.12 : destruction des clusters par oxydation. Les oxydants univalents, notamment le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène moléculaire et le peroxynitrite (noté [O]), convertissent le groupe exposé  $[4Fe-4S]^{2+}$  en état d'oxydation instable  $[4Fe-4S]^{3+}$ . Le cluster se décompose ensuite spontanément en la forme inactive  $[3Fe-4S]^{1+}$ .

### 1.5.3. Systèmes de protection face à l'O<sub>2</sub> et aux ERO : [NiFe]-hydrogénase résistant à l'O<sub>2</sub>, SOD et catalase

Pour survivre dans un environnement aérobie, les cellules ont dû élaborer des mécanismes leur permettant de contrecarrer l'action néfaste de l'O<sub>2</sub> et des ERO. Prenons l'exemple de 3 enzymes protectrices : la [NiFe]-hydrogénase tolérante à l'O<sub>2</sub>, la SOD et la catalase.

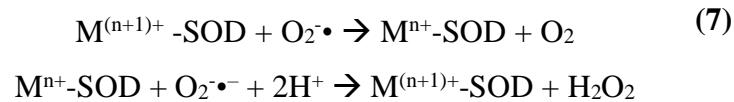
Les [NiFe]-hydrogénase tolérantes à l'O<sub>2</sub> peuvent catalyser l'oxydation de l'H<sub>2</sub> dans des conditions aérobies, évitant ainsi l'oxygénation et la destruction du site actif. Les ERO oxygènent le site actif et les rend inactif pendant de longues périodes, on nomme cet état « non prêt ». En présence de H<sub>2</sub>, les hydrogénases tolérantes à l'O<sub>2</sub> réagissent avec l'O<sub>2</sub> pour former un complexe Ni(III)-OH, un état dit « prêt » (Volbeda, et al., 1995). Dans ce mécanisme, les [NiFe]-hydrogénases possèdent une réserve d'électrons qui permet à une molécule d'O<sub>2</sub> attaquant le site actif d'être rapidement convertie en H<sub>2</sub>O inoffensive. Ce mécanisme est particulièrement essentiel pour les bactéries anaérobies sulfato-réductrices du genre *Desulfovibrio* (Zacarias, et al., 2018). L'hydrogénase d' *E. coli* quant à elle, a une structure dimère dans laquelle les clusters [4Fe-4S] de chaque monomère sont situés à environ 12 Å les uns des autres, une distance propice à un effet tunnel électronique rapide. Un tel agencement permet aux électrons issus de l'oxydation de H<sub>2</sub> libérés sur le site actif d'être transférés lorsqu'une molécule d'O<sub>2</sub> attaque.

Les catalases sont des mécanismes de défense bien connus jouant un rôle important dans la cellule contre les radicaux libres et permettant de prévenir les dommages oxydatifs. Les quantités de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formés par le métabolisme peuvent devenir préjudiciable pour la cellule et doivent par conséquent être régulés par des enzymes de détoxication. Parmi celles-ci, les catalases sont des oxydoréductases hémiques qui catalysent la dismutation H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer de l'hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui conduit à la formation d'une molécule d'H<sub>2</sub>O et un groupe Fe<sup>(IV)</sup>=O hautement oxydant ; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour donner du O<sub>2</sub> (réaction 6) (Alfonso-Prieto, Biarnés, Vidossich, & Rovira, 2009).





Les SODs sont des métalloprotéines essentielles à la protection des cellules en présence d'O<sub>2</sub>. Ces enzymes catalysent la dismutation des O<sub>2</sub><sup>-•</sup> en O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (réaction 7) qui sera réduite retour par des peroxydases.



où  $M = \text{métal}$

## 1.6. L'effet du NO sur les clusters Fe-S

La présente section examine l'influence de l'oxyde nitrique (NO) sur les clusters Fe-S. NO peut à l'instar de l'oxygène interagir avec les clusters Fe-S. Généralement, la réaction de NO avec les clusters Fe-S induit un changement de structure atomique au sein de ces agrégats, altérant ainsi leur stabilité et leur activité catalytique dans des conditions de stress nitrosatif. Ce qui peut impacter des processus biologiques dans lesquels ces clusters jouent un rôle crucial, tels que la signalisation cellulaire et le métabolisme du fer. Paradoxalement, une famille de protéines Fe-S dédiée à la détection du NO agissent comme des mécanismes de signalisation cellulaire en réagissant avec le NO, une stratégie exploitée par certaines bactéries pour échapper aux effets nocifs de cette molécule. Un exemple notable est le cluster [4Fe-4S], réactif au NO, que certaines bactéries utilisent pour détecter et moduler le NO, régulant ainsi le stress nitrosatif. La chimie du NO sur ces sites entraîne généralement le réarrangement des clusters Fe-S et formation de complexes nitrosyle-fer.

### 1.6.1. Nitrosylation des clusters Fe-S : diaphonie entre NO et H<sub>2</sub>S

Le NO, un composé lipophile hautement réactif, jouant un rôle crucial dans de divers processus biologiques en tant que neurotransmetteur (Prast & Philippu, 2001), régulateur transcriptionnel (Yukl, Elbaz, Nakano, & Moëne-Loccoz, 2008), agent cytotoxique (Drapier, Pellat, & Henry, Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages, 1991) et une molécule de signalisation dans la réponse immunitaire (Bogdan, 2001) Il peut interagir avec différents centres métalliques dans les protéines, notamment les cluster Fe-S. Les protéines contenant des cofacteurs Fe-S sont particulièrement réactives au NO, ce que la nature exploite dans certains systèmes bactériens. Un

exemple avec la protéine NsrR mentionnée dans la section 1.3.4, spécialisée dans la détection du NO, répondant ainsi au stress nitrosatif à l'aide d'un cluster [4Fe-4S] spécifiquement adapté à la réactivité du NO. Des études sur des modèles synthétiques montre que la réaction du NO avec des clusters [2Fe2S] et [4Fe-4S] entraîne la formation de divers de complexes nitrosyl-fer notamment le mononitrosyle-fer (MNIC), le dinitrosyle-fer (DNIC), le sel rouge de Roussin (RRE) et le sel noir de Roussin (RBS) (figure 1.13) (Ren, Zhang, Yang, & Ding, 2008) (Drapier, Interplay between NO and [Fe-S] clusters: relevance to biological systems, 1997).

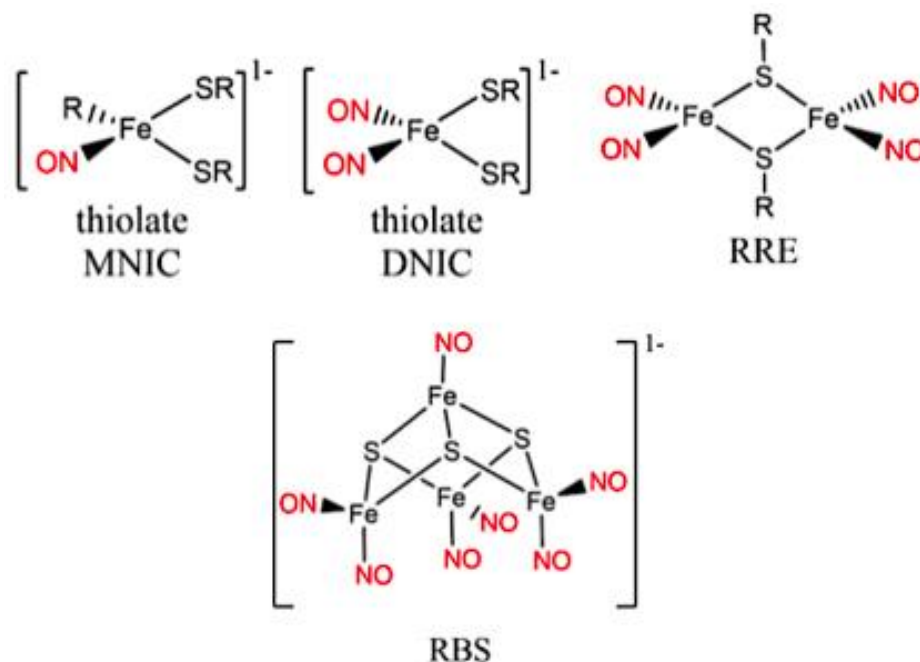


Figure 1.13 : structures des espèces nitrosyle de fer. Structures du complexe dinitrosyle fer (DNIC), mononitrosyl fer (MNIC), le sel rouge de Roussin (RRE), du sel noir de Roussin (RBS) et les esters rouge de Roussin (RRE) (Harrop, Tonzetich, Reisner, & Lippard, 2008 )

De plus, une étude complémentaire a révélé que l'environnement rédox influence et contrôle les produits de nitrosylation prédominants après la réaction du NO avec des clusters Fe-S synthétiques. En effet, l'exploration de la réactivité de la protéine HiPIP d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* renfermant un cluster [4Fe-4S], en présence de NO indique que la réaction de nitrosylation induisait différents composés selon les conditions aérobies et anaérobies. Les analyses spectroscopiques ont révélé que le RRE était le principal composé lors de la nitrosylation du cluster [4Fe-4S] en milieu aérobie, tandis que le RBS prédominait dans des conditions anaérobies (figure 1.14) (Grabarczyk, Ash, Myers, Dodd, & Vincent, 2019).

L'utilisation de la protéine HIPIP-[4Fe-4S] s'est avérée pertinente, principalement en raison de sa résistance à l'oxygène et de sa stabilité face à l'interaction avec le NO en présence d'O<sub>2</sub>, suggérant ainsi que l'O<sub>2</sub> joue un rôle essentiel dans le contrôle des produits majeurs de la nitrosylation et des implications possibles sur les mécanismes de réparation des clusters Fe-S en réponse à un stress nitrosatif.

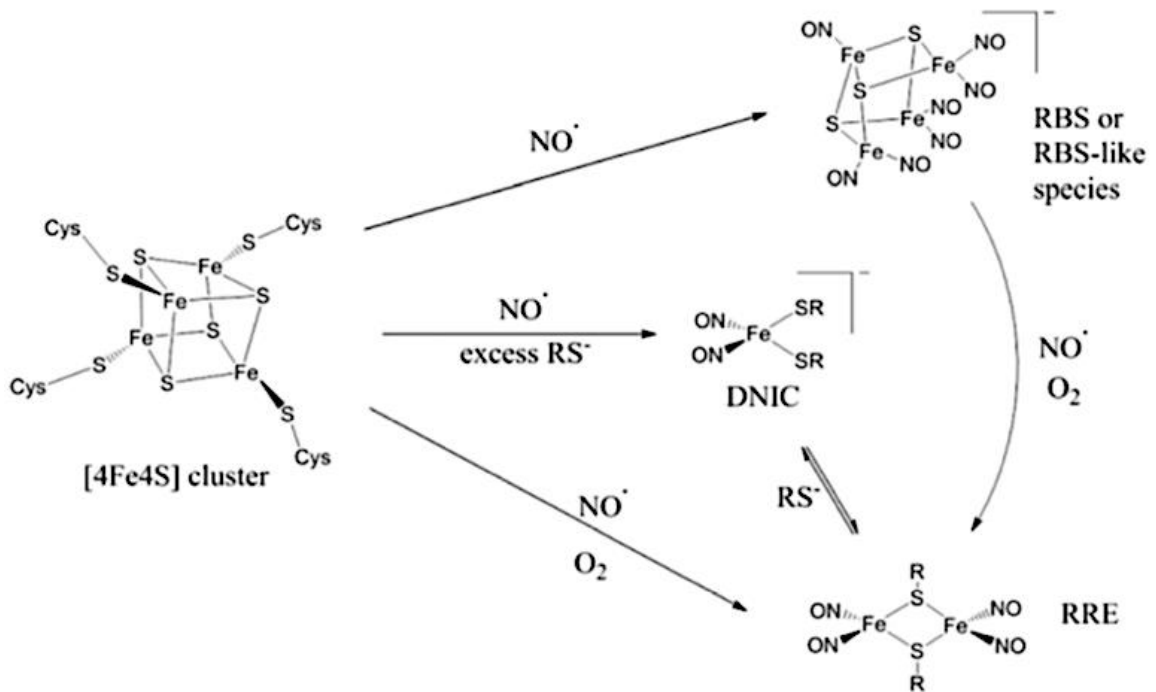


Figure 1.14 : mécanisme de nitrosylation d'un cluster [4Fe-4S] dans différents environnements (aérobie ou anaérobie). Les produits obtenus sont RBS, DNIC et RRE. (Grabarczyk, Ash, Myers, Dodd, & Vincent, 2019)

L'interaction des clusters avec le NO peut entraîner la libération des sulfures de pontage sous forme de soufre élémentaire comme suggéré par les travaux du groupe de recherche de Kim. Ils ont étudiés les modèles synthétiques [2Fe-2S] afin de mieux comprendre leurs interactions avec O<sub>2</sub>, NO et H<sub>2</sub>S. Ils ont observé que les deux ponts sulfure dans les agrégats synthétiques [2Fe-2S] peuvent se libérer sous forme de H<sub>2</sub>S lorsqu'une nitrosylation se produit, à condition que l'environnement fournisse un équivalent d'électron (e<sup>-</sup>) ou de proton (H<sup>+</sup>) provenant de donneurs tels que les thiols et les phénols (Tran C. T., 2014). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que les clusters pourraient agir comme point de connexion directe entre le NO et le H<sub>2</sub>S, permettant leur interaction. Dans une étude complémentaire, le 7-azido-4-méthylcoumarine

(C7Az) a été utilisé pour détecter la présence de H<sub>2</sub>S lors de la nitrosylation. En présence de H<sub>2</sub>S, le groupe azide de C7Az peut subir une conversion en un groupe amine, ce qui conduit à une augmentation du signal d'émission fluorescent. Ces études ont permis de suggérer que la génération de H<sub>2</sub>S est liée à la dégradation du cluster après nitrosylation en présence d'une source de thiol pouvant fournir un équivalent d'e<sup>-</sup> ou de H<sup>+</sup>. (Oakley, 2021 )

Le contrôle de la réactivité du processus de nitrosylation des protéines Fe-S, surtout celles dotées d'un cluster [4Fe-4S], demeure partiellement compris et constitue toujours un domaine de recherche actif. Malgré les avancées significatives dans la compréhension de la sensibilité de ces protéines au NO, le contrôle potentiel de la réactivité des clusters Fe-S vis-à-vis de ce processus reste en grande partie à élucider. Les recherches actuelles s'efforcent de comprendre les mécanismes impliqués dans cette réaction.

### 1.7. Protéines Fe-S *de novo*

La conception de protéine *de novo* décrit une génération de protéine possédant des séquences sans rapport avec celles existantes dans la nature. Contrairement aux protéines qui sont synthétisées à partir de modèles génétiques existants dans l'organisme, les protéines *de novo* sont construites à partir de zéro. La conception de protéines *de novo* vise à créer des protéines stables et bien repliées avec des séquences éloignées de celles trouvées dans la nature et potentiellement de nouvelles fonctions. Ces dernières années, les avancées technologiques dans la conception informatique et les connaissances structurales existantes tirées de la Protein Data Bank (PDB) sont à la base de modèles *de novo* réussis (Berman, et al., 2000). Il a été démontré que des architectures hélicoïdales pouvaient être conçues sur la base d'équations paramétriques (Grzyb J., et al., 2012). En effet, les protéines à faisceaux hélicoïdaux se sont révélés reproductibles et ont par conséquent été adaptés à de nombreuses fonctions. La première protéine Fe-S *de novo*, avec un pli jamais observé dans la nature, a été assemblée à partir de fragments de la PDB (Hill, Raleigh, Lombardi, & Degrado, 2000). Dans ce contexte, la capacité à concevoir des protéines Fe-S non naturelles dans lesquelles des clusters redox sont disposés de manière contrôlée et dont les propriétés sont adaptées à l'application envisagée devient de plus en plus cruciale. Des études dans ce domaine ont cherché à incorporer des clusters dans des systèmes *de novo* afin d'élucider les propriétés de l'environnement naturel des clusters Fe-S.

### 1.7.1. Conception hélicoïdales [4Fe-4S] *de novo*

L'analyse des métalloprotéines naturelles fournit des informations structurelles importantes sur la manière dont les protéines contrôlent la liaison, l'assemblage et la fonction des clusters [4Fe-4S]. Cependant, les protéines naturelles sont des dispositifs complexes qui ont évolué sous un certain nombre de contraintes fonctionnelles, dont beaucoup sont peut-être inconnues. Ainsi, la conception de systèmes *de novo* permet d'étudier isolément des éléments de ces protéines complexes. Des progrès significatifs dans l'étude des protéines Fe-S ont été réalisés grâce à la conception de maquettes et de fragments de protéines. Dans certains cas, des fragments de protéines naturelles sont incorporés dans des protéines conçues de manière *de novo* pour produire des plis nouveaux ou hybrides. Deux exemples de protéines hélicoïdales *de novo* [4Fe-4S] ont permis une avancée sur la compréhension des contraintes sur la structure, la protéine Fe-S à bobine enroulée (CCIS) et la ferrédoxine dimère à domaine échangé (DSD-Fdm) (figure 1.15) (Grzyb J. , et al., 2012) (Sommer, Roy, Astashkin, & Ghirlanda, 2015).

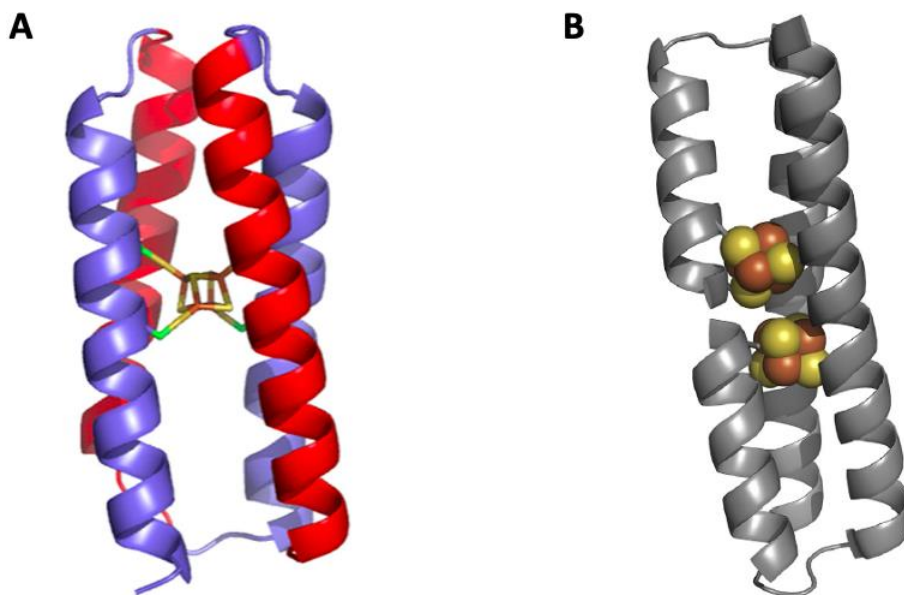


Figure 1.15 : conceptions hélicoïdales *de novo* [4Fe-4S]. (A) Structure modélisée de CCIS de quatre hélices alpha avec un cluster [4Fe-4S] (B) Structure modélisée de DSD de trois hélices alpha avec deux clusters [4Fe-4S] dans le site actif.

Dans les deux conceptions, le cluster est introduit dans un nouvel échafaudage de structure secondaire, un faisceau hélicoïdal alpha. Ces conceptions n'ont pas d'analogues connus dans la nature. Les ligands de CCIS et DSD ont été dérivés d'un site de liaison [4Fe-4S] inattendu découvert lorsque la structure de l'ARNt-synthétase du tryptophane de *Thermotoga maritima* a

été résolue (Han, et al., 2010). Contrairement à la plupart des motifs de liaison de cluster, qui se produisent principalement entre les éléments structurels secondaires, les ligands cystéine se trouvent tous dans ou aux extrémités des éléments alpha-hélicoïdaux. Seules deux structures connues contiennent ce type de site de liaison (PDB 2G36 et 3A04). Toutes deux synthétases d'ARNt de tryptophane provenant d'organismes thermophiles. Étant donné que la plupart des amides du squelette qui contribueraient normalement aux interactions électrostatiques avec le cluster participent aux liaisons hydrogène intra-hélicoïdales, d'autres groupes de la protéine remplacent ces interactions manquantes. La conception CCIS (figure 1. 15A) a utilisé deux cystéines de la tryptophane ARNt synthétase. Ces ligands formaient un motif CxxC qui formait un tour d'hélice alpha. Une deuxième hélice de coordination a été spécifiée, dupliquant cette interaction en utilisant un double axe de symétrie du cluster. La conception finale était un faisceau à quatre hélices qui incorporait un cluster dans le centre hydrophobe de la protéine. Bien que la liaison du cluster ait été clairement démontrée, la protéine était sujette à l'agrégation et instable aux cycles d'oxydo-réduction. Les tentatives ultérieures visant à améliorer la solubilité en augmentant la charge nette de la protéine ou à augmenter la stabilité en ajoutant des acides aminés favorisant l'hélice n'ont guère amélioré les propriétés physiques de la protéine (Grzyb J. , et al., 2010). Des études postérieures ont développé DSD (figure 1.15B), qui incorporait un site [4Fe-4S] dans un faisceau de trois hélices qui formait un dimère avec un axe de symétrie double. Un site optimal pour l'incorporation d'un cluster en utilisant les géométries du ligand tryptophane ARNt-synthase (Sommer, Roy, Astashkin, & Ghirlanda, 2015).

Bien que l'incorporation du cluster ait été une réussite dans ces conceptions informatiques, des défis persistent concernant le contrôle du comportement du ligand, tout comme le contrôle de l'état d'oligomérisation de la protéine. La conception informatique est un outil très puissant, car elle est capable d'atteindre des pli non naturels, mais les protéines Fe-S *de novo* conçu présentent souvent une stabilité réduite. Bien que ce domaine ait enregistré des succès, tels que des plis non naturels et des enzymes catalysant des réactions inconnues dans la nature, la conception de protéines Fe-S *de novo* reste un processus complexe.

## CHAPITRE 2 - ÉTUDE DES PROTÉINES FE-S

Ce chapitre examine les méthodes informatiques et physico-chimiques utilisées pour étudier et explorer les protéine Fe-S *de novo*, qui constitueront l'objet de mes recherches. Après avoir présenté quelques éléments théoriques pertinents, le chapitre se clôturera par la description des objectifs de l'étude actuelle.

### 2.1 Techniques informatiques

Cette section établit le cadre de la recherche se concentrant sur deux logiciels de prédictions de la structure des protéines : AlphaFold et I-TASSER. Nous examinerons les généralités sur ces logiciels ainsi que les limitations de leurs fonctionnalités.

#### 2.1.1. Logiciels de prédiction structurales des protéines : AlphaFold et I-TASSER

De nombreux progrès ont été réalisés dans la prédiction de la structure des protéines grâce à des décennies d'efforts. Les progrès ont été particulièrement notables ces dernières années grâce à l'introduction de techniques de prédiction de contact basées sur la coévolution et l'apprentissage profond des réseaux neuronaux. La prédiction structurale repose généralement sur un processus algorithmique permettant de prédire la structure tertiaire d'une protéine à partir de sa séquence d'acides aminés.

AlphaFold est un algorithme d'intelligence artificielle (IA) développé par Deepmind qui prédit avec précision la structure tridimensionnelle (3D) d'une protéine naturelle à partir de sa séquence d'acides aminés. Il s'appuie sur des alignements multi-séquences d'homologues de la protéine cible et sur un réseau neuronal basé sur l'apprentissage profond pour prédire avec précision les distances entre les paires d'acides aminés. AlphaFold 1 et AlphaFold 2 sont deux versions du logiciel de prédiction de structures protéiques développé par DeepMind. La principale différence entre les deux réside dans leur approche algorithmique et leur architecture.

AlphaFold 1, publié en 2018, était basé sur une méthode qui combinait la physique locale avec un potentiel guide dérivé de la reconnaissance de formes (Kryshtafovych, Schwede, Topf,

Fidelis, & Moulton, 2019). Cependant, cette approche avait tendance à surestimer les interactions entre les résidus proches dans la séquence de la protéine, ce qui conduisait à un sur-ajustement et à des modèles avec une structure secondaire légèrement plus prononcée que dans la réalité c'est-à-dire le logiciel prédisait des éléments de structures secondaires (comme les hélices alpha et feuillets bêta) de manière plus étendue, régulières ou rigide que ce qui est observé dans les structures réelles des protéines..

AlphaFold 2, lancé en 2020, a introduit une approche radicalement différente (Senior, Evans, & Jumper, 2020). Cette dernière version utilise un système de sous-réseaux couplés ensemble en un modèle unique, basé entièrement sur la reconnaissance de formes. Contrairement à AlphaFold 1, la physique locale est appliquée uniquement en fin de processus pour ajuster légèrement la structure prédite, ce qui réduit le sur-ajustement. Le processus d'AlphaFold pour générer la structure 3D d'une protéine commence par l'analyse de la séquence d'acides aminés de la protéine cible. Cette séquence est ensuite comparée à une énorme base de données de séquences et de structures de protéines connues pour identifier des séquences similaires. À partir de ces informations, AlphaFold utilise un réseau de neurones profond pour prédire les distances entre les paires d'acides aminés dans la protéine cible, ainsi que les angles  $\Phi$  et  $\Psi$  (diagramme de Ramachandran) pour chaque résidu (Ramachandran, Sasisekharan, & Ramakrishnan, 1963). Ces prédictions sont ensuite utilisées pour générer une structure tridimensionnelle initiale de la protéine. Cette structure est ensuite raffinée à plusieurs reprises à l'aide d'itérations successives, au cours desquelles les sont ajustées en fonction des informations précédentes. Ce processus itératif permet d'améliorer progressivement la précision de la prédiction jusqu'à ce qu'une structure tridimensionnelle finale soit obtenue. Enfin, AlphaFold prédit uniquement la structure des protéines sans cofacteurs ni modifications co- et post-traductionnelles. Cela peut constituer une lacune importante pour un certain nombre de systèmes biologiquement pertinents.

Iterative Threading Assembly Refinement (I-TASSER) est une ressource en ligne pour les prédictions de la structure des protéines et l'annotation des fonctions basées sur la structure. Dans I-TASSER, les modèles structurels sont d'abord reconnus à partir du PDB en utilisant plusieurs approches d'alignement de threads. Des modèles de structure complets sont ensuite construits par des simulations itératives d'assemblage de fragments (Yang J & Zhang, 2015). Les informations fonctionnelles sont finalement obtenues en faisant correspondre les modèles de structure prédits



avec des protéines connues dans les bases de données fonctionnelles. Le processus de prédiction de la structure tridimensionnelle d'une protéine par I-TASSER comporte plusieurs étapes clés.

Tout d'abord, le serveur commence par effectuer une recherche de structures de protéines connues similaires à la séquence d'acides aminés de la protéine cible. Cette recherche est réalisée à l'aide d'un processus appelé threading, qui aligne la séquence de la protéine cible avec les structures de protéines connues pour identifier des motifs similaires. Ensuite, I-TASSER assemble une structure tridimensionnelle initiale de la protéine cible en utilisant les résultats du threading. Ce processus est itératif et combine des fragments de structure provenant de différentes protéines alignées avec la séquence cible pour construire un modèle complet. Une fois que la structure initiale est générée, I-TASSER procède à des étapes de raffinement pour améliorer la précision du modèle. Cela peut inclure des ajustements pour optimiser les interactions entre les résidus d'acides aminés et pour minimiser l'énergie du modèle. En parallèle, le serveur évalue la fiabilité de la structure prédite en utilisant divers critères, tels que la confiance des alignements de threading et la qualité des ajustements stéréochimiques. Cette évaluation permet aux utilisateurs de déterminer la robustesse du modèle prédit. Une fois que le processus est terminé, il fournit à l'utilisateur la structure tridimensionnelle prédite de la protéine cible, ainsi que des informations sur sa fiabilité et sa qualité. L'algorithme indique également les protéines structurellement proche de la protéine d'intérêt en utilisant le score TM (la similarité structurelle la plus proche induira un score TM plus élevé, avec le modèle I-TASSER prédit).

I-TASSER se distingue d'AlphaFold par une caractéristique intéressante : la section « COFACTOR » dans les résultats de la prédiction, qui permet de prédire les sites de liaison au ligand pour une métalloprotéine. Cette prédiction repose sur l'identification des résidus impliqués dans la liaison au ligand dans la protéine étudiée, en se basant sur des similitudes structurelles globales et locales avec une vaste bibliothèque de modèles de sites de liaison. Cette bibliothèque contient 76 679 sites de liaison, couvrant diverses interactions telles que les protéines-protéines, les protéines-acides nucléiques, les protéines-lipides et les protéines-petites molécules (Roy, Yang, & Zhang, 2012). La prédiction du site de liaison des ligands modèles dans la structure de requête se fait en utilisant une matrice de superposition acquise à partir de l'alignement local des résidus du site de liaison de la protéine recherchée et du modèle. Ensuite, une simulation rapide du ligand superposé est effectuée pour améliorer la géométrie locale, en utilisant un terme énergétique basé sur plusieurs critères tels que le nombre de contacts établis par le ligand modèle

avec les résidus de site de liaison prédits, le nombre de conflits ligand-protéine et l'erreur de distance de contact. Les conformations de ligands prédites sont ensuite regroupées en fonction de leur proximité spatiale avec une distance limite de 8 Å (Roy, Yang, & Zhang, 2012). Si un résidu peut lier plusieurs ligands, ceux-ci sont regroupés en fonction de leur similarité chimique, puis classés selon la moyenne du score de confiance de liaison au ligand le plus élevé (C-score LB).

En fin de compte, le complexe protéine-ligand présentant le C-score LB le plus élevé est sélectionné comme prédiction de site fonctionnel pour la protéine d'intérêt.

### 2.1.2. Prédiction structurales des protéines Fe-S *de novo* : les limites d'AlphaFold et I-TASSER

AlphaFold a été une avancée majeure dans le domaine de la biologie structurale en raison de la précision atomique de ses modèles protéiques, même en l'absence de structures homologues connues. Cependant, malgré ces progrès, AlphaFold présente des faiblesses. Les algorithmes sous-jacents n'ont pas été spécifiquement conçus pour prédire la structure des métalloprotéines. Bien qu'il ait réussi à prédire avec précision certains sites de liaison au zinc, comme dans le cas d'un domaine peptidase (Wehrspan, McDonnell, & Elcock, 2022), d'autres prédictions structurales pour les métalloprotéines ont été moins concluantes. Ainsi, la prédiction de métalloprotéines *de novo* ajoute un défi supplémentaire. En raison de leur nature non naturelle et du manque de données disponibles, les métalloprotéines *de novo* représentent un défi unique pour AlphaFold. La prédiction précise des positions et des sites de coordination des ions métalliques reste difficile, tout comme la modélisation des interactions entre ces ions et les résidus d'acides aminés. Enfin, les modèles utilisés par AlphaFold sont basés sur des structures protéiques existantes, ce qui limite leur capacité à prédire avec précision les arrangements atomiques associés aux métalloprotéines *de novo*. En conséquence, les protéines Fe-S *de novo* conçues à ce jour utilisent souvent des structures tertiaires simples et symétriques pour minimiser les défis associés à leur conception.

I-TASSER se distingue d'AlphaFold à la fois par son algorithme et ses approches utilisées. Cette particularité lui permet également de générer des modèles de structures protéiques de haute qualité, même pour des protéines dont la séquence est peu homologue à celles déjà connues. Bien qu' I-TASSER ait également démontré son efficacité dans la prédiction de structures protéiques, il présente aussi certaines limites, notamment en ce qui concerne la

prédiction des sites de liaison au cofacteur pour les métalloprotéines. I-TASSER adopte une approche basée sur l'alignement par homologie avec des structures connues pour générer ses modèles. Ainsi, si des modèles de structures similaires à la protéine d'intérêt ne sont pas disponibles, la qualité des prédictions peut en être affectée, en particulier pour des structures uniques telles que les protéines Fe-S *de novo*.

Il est à noter que les performances d'AlphaFold et d'I-TASSER s'améliorent continuellement, et que des mises à jour futures pourraient atténuer certaines de ces limitations. Cependant, pour des prédictions structurelles précises, en particulier au niveau des sites de liaison au cofacteur, la validation expérimentale demeure essentielle. Enfin, la prédiction de structures *de novo* pour les protéines Fe-S reste un domaine en évolution, et les progrès futurs dans les modèles et les méthodes computationnelles pourraient améliorer la précision des prédictions.

Dans cette étude, l'emploi de logiciel de prédiction des structure protéique permettra de concevoir des variantes de la protéine d'intérêt et d'évaluer leurs performances en terme de qualité de prédiction.

## 2.2. Techniques physico-chimiques

### 2.2.1. Principe de la spectroscopie UV-Visible

Le principe de la spectrométrie d'absorption (figure 2.1) dans l'ultraviolet et le visible repose sur la capacité des molécules à absorber le rayonnement dans une plage de longueurs d'onde allant de 190 à 800 nm, englobant à la fois l'ultraviolet (190-400 nm) et le visible (400-800 nm). Lorsqu'elles sont exposées à un tel rayonnement, les molécules, ions ou complexes peuvent subir une ou plusieurs transitions électroniques. Cette méthode considère le rayonnement UV-Visible comme une onde électromagnétique transportant une énergie  $E$  liée à sa fréquence  $\nu$  selon la relation :

$$E = h\nu = hc / \lambda \quad (8)$$

Dans cette équation,  $h$  représente la constante de Planck ( $h = 6,63 \cdot 10^{-34}$  J.s),  $\nu$  est la fréquence du photon,  $c$  est la vitesse de la lumière dans le milieu ( $c = 3.108$  m/s dans le vide) et  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayonnement, généralement exprimée en nanomètres. En solution,

seules les transitions électroniques de faible énergie sont détectables, telles que les bandes d'absorption dans l'ultraviolet proche et le visible. Chaque bande d'absorption est caractérisée par sa longueur d'onde maximale d'absorption,  $\lambda_{\max}$ , et son intensité, représentée par le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) à cette longueur d'onde, qui sont liés à la concentration du soluté en solution par la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot C \quad (9)$$

Dans cette équation, A est l'absorption, l est la longueur du trajet optique et C est la concentration. Les molécules biologiques capables d'absorption sont celles comportant des doubles liaisons conjuguées, des noyaux aromatiques ou des métaux de transition. Par exemple, le pic d'absorption à 280 nm observé pour les solutions protéiques correspond à l'absorption des résidus aromatiques des chaînes polypeptidiques. Pour les protéines Fe-S, la présence de clusters Fe-S induit une absorption entre 300 et 600 nm, variant selon le type d'agrégat Fe-S. Bien que ces bandes d'absorption soient généralement larges, leur position maximale et la forme du spectre fournissent des informations sur la nature des clusters Fe-S.

Dans cette étude, la spectroscopie UV-Visible a été utilisée pour caractériser la structure chimique des clusters Fe-S et déterminer leur concentration au sein des protéines.

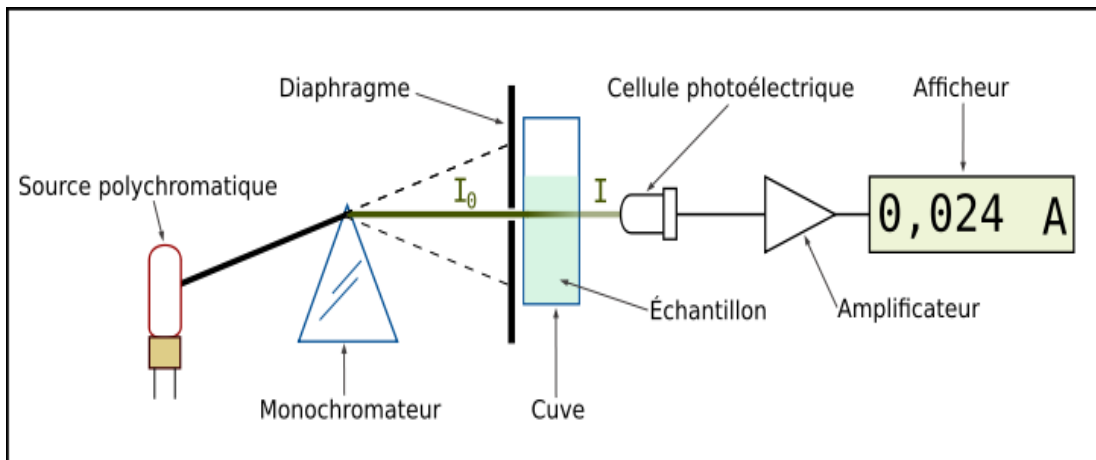


Figure 2.1 : principe de la spectroscopie UV-Visible. (GYassineMrabetTalk, 2007)

## 2.2.2. Principe de la chromatographie liquide rapide des protéines

La chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) est une méthode de séparation, purification et analyse des protéines en solution, basée sur leurs propriétés physico-chimiques telles que la taille, la charge et l'affinité (figure 2.2B). Différentes colonnes de purification sont utilisées selon les caractéristiques des protéines à purifier. Par exemple, les protéines marquées à l'histidine sont purifiées en utilisant des colonnes nickel-nitrilotriacétate (Ni-NTA), qui exploitent l'affinité entre les résidus histidines des protéines et les ions  $\text{Ni}^{2+}$  liés à la matrice de la colonne. En effet, le principe repose sur l'affinité existant entre les résidus histidines de la protéine et le cation  $\text{Ni}^{2+}$  relié à la matrice de la colonne via le groupement NTA (nitrilotriacétate). Le NTA interagit, par l'intermédiaire de 4 atomes, avec l'ion  $\text{Ni}^{2+}$  (tétravalent). Ce dernier possède alors encore deux sites d'interaction libres. Ainsi, lorsque la protéine contenant les 6 résidus histidines en C-terminal ou en position N-terminale passe sur la colonne, des interactions entre les histidines de la protéine et l'ion  $\text{Ni}^{2+}$  se créent. La protéine se fixe alors spécifiquement sur la matrice. Cette méthode permet de sélectivement retenir les protéines sur la matrice, tandis que les autres composants de l'échantillon sont élués rapidement. L'imidazole présentant une structure semblable à celle de l'histidine (figure 2.2A), les protéines retenues peuvent ensuite être libérées en ajustant les conditions chromatographiques, notamment en remplaçant les ions nickel par de l'imidazole à forte concentration (Block, et al., 2009).

Cette étude a utilisé la FPLC pour purifier et isoler les protéines Fe-S.

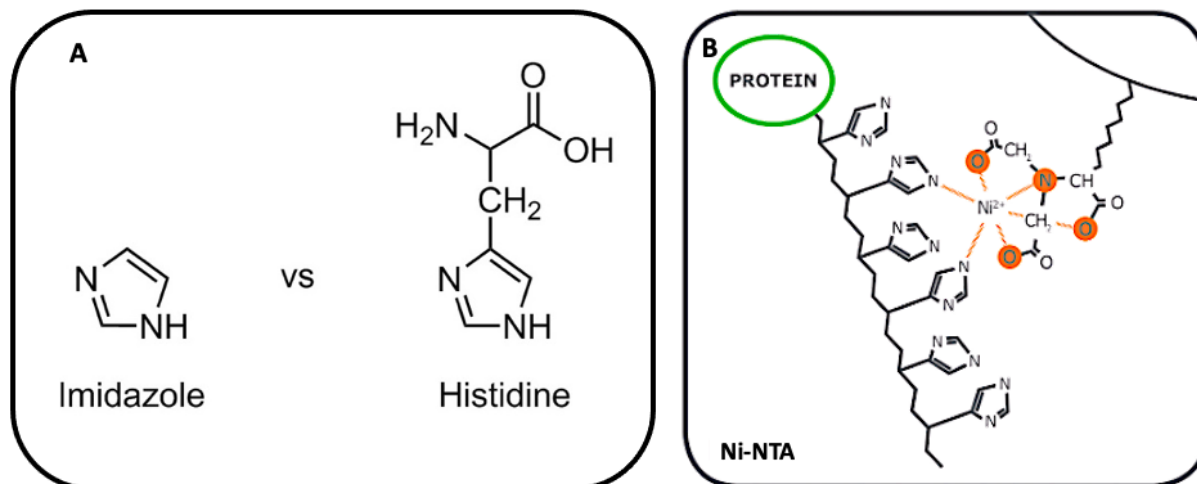


Figure 2.2 : schéma du principe de la chromatographie FPLC avec une colonne de purification Ni-NTA. A) structures chimiques de l'imidazole et l'histidine. B) Ligands chélateurs IMAC-NTA. NTA est largement utilisé pour fixer les ions de métaux de transition sur une matrice, qui sert ensuite de résine d'affinité. (CubeBiotech, 2013)

### 2.2.3. Principe de l'électrophorèse (SDS-PAGE)

L'électrophorèse est une technique d'analyse qui repose sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Elle permet de séparer et d'analyser les diverses protéines d'un échantillon en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Pour ce faire, les protéines sont dénaturées par chauffage dans un tampon spécifique, comprenant notamment du  $\beta$ -mercaptoéthanol pour réduire les ponts disulfures et du SDS pour rompre les interactions protéiques et charger les protéines négativement. Ainsi dénaturées, les protéines migrent en fonction de leur poids moléculaire à travers un gel de polyacrylamide contenant du sodium dodecyl sulfate (SDS). La concentration en polyacrylamide du gel est ajustée en fonction de la taille des protéines, avec un gel de concentration permettant une migration uniforme. Les protéines sont ensuite révélées par coloration du gel suivie d'une décoloration. Il faut noter que lors de la SDS-PAGE, les protéines sont dénaturées, même sous forme *holo* (avec son cofacteur). Cela signifie que les clusters ne sont pas conservés sur le gel lors de cette technique.

Cette étude a utilisé l'électrophorèse pour vérifier la masse des protéines Fe-S purifiées.

### 2.3. Contexte et présentation du projet

L'exploration des protéines Fe-S occupe désormais une place centrale dans un domaine de recherche hautement concurrentiel, où les connaissances ont connu une croissance fulgurante ces dernières années. Cependant, malgré ces progrès, de nombreux aspects restent à éclaircir, notamment en ce qui concerne le contrôle du processus de nitrosylation des protéines Fe-S, en particulier celles dotées d'un cluster [4Fe-4S], un domaine encore actif de recherche. Dans ce contexte, mes recherches se sont concentrées sur l'exploration des modèles protéiques Fe-S *de novo* afin d'étudier la réactivité à l'interface du cluster dans ces protéines modèles.

Pour le premier objectif, la synthèse de la protéine Fe-S *de novo*, CCIS2b (Grzyb J. , et al., 2012), une variante de CCIS élaborée afin d'améliorer la stabilité du cluster Fe-S par le biais de modifications spécifiques de sa séquence protéique. Cette étape du projet implique l'évaluation de deux méthodes de production, *in vivo* et *in vitro*, et l'optimisation des conditions expérimentales. L'objectif est de déterminer quelle méthode est la plus optimale pour produire CCIS2b, en tenant compte de la stabilité et de l'intégrité du cluster [4Fe-4S] lié à la cystéine.

Dans le deuxième objectif, la conception et la prédiction structurale de variantes de CCIS2b sont entreprises en utilisant des logiciels de prédiction tels qu'AlphaFold et I-TASSER. Les mutations ciblées introduites dans la séquence polypeptidique visent à évaluer la qualité de prédiction des structures Fe-S en se basant sur les prédictions des deux logiciels.

Enfin, le troisième objectif vise à évaluer la stabilité des variantes de CCIS2b, ainsi que la facilité d'insertion du cluster dans chacune des variantes, en tenant compte des changements de structure induits par les mutations. Cette évaluation comparative des variantes permettra d'estimer la possibilité de réactions postérieures, telles que la nitrosylation, et d'enrichir la compréhension du contrôle de la réactivité du cluster Fe-S dans les protéines *de novo*.

Dans l'ensemble, ces recherches ont pour objectif de mieux comprendre et d'explorer la réactivité à l'interface du cluster d'une protéine *de novo* contenant un cluster [4Fe-4S], contribuant ainsi à l'avancement des connaissances sur le contrôle de la réactivité du cluster Fe-S.

## CHAPITRE 3 – MÉTHODOLOGIE

### 3.1 Méthodes biochimiques

Ce chapitre est dédié à la présentation des différentes méthodes élaborées et utilisés afin de produire et d'étudier la protéine d'intérêt.

#### 3.1.1. Choix du vecteur d'expression

Pour l'obtention des protéines recombinantes, on a d'abord cloné la séquence codante pour la protéine dans un vecteur d'expression approprié, puis on l'a introduit dans des cellules hôtes. Le choix du plasmide était crucial et dépendait du système d'expression ainsi que d'autres facteurs. Un vecteur d'expression adapté facilitera l'expression réussie et, si nécessaire, la purification de la protéine cible. Nous avons opté pour un plasmide de 5,4 kb, le pET-21d (+) (Genscript) (figure 3.1), où le gène d'intérêt, CCIS2b, est inséré entre Hind III et Nco I. L'insertion du gène au sein du plasmide a été réalisée par Genscript. La séquence codante a été régulée par un promoteur T7 fort, permettant une production importante de la protéine cible, pouvant atteindre jusqu'à 50% de la proportion totale des protéines de la cellule bactérienne. Le plasmide comprenait également une séquence résistante à l'ampicilline (amp<sup>R</sup>) et une séquence His-Tag, une queue poly-histidine facilitant la purification par colonnes FPLC Ni-NTA.



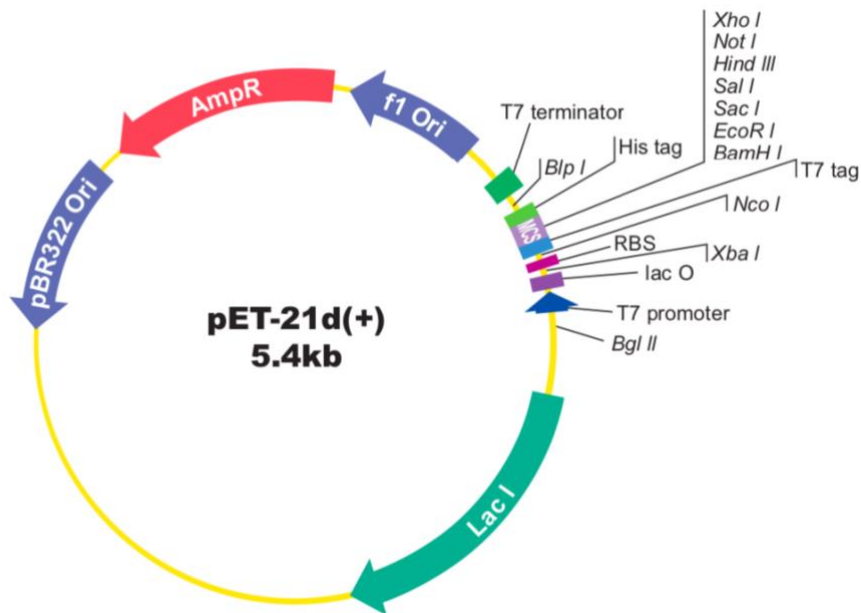


Figure 3.1 : carte du plasmide utilisée pour la production de protéines. Le pET-21d(+) est un vecteur bactérien pour l'expression inducible de protéines marquées T7 à l'extrémité N-terminale avec un site NcoI au codon d'initiation. Le gène d'intérêt CCIS2b se situe entre HindII et Nco I.

### 3.1.2. Préparation des souches productrices : cellules compétentes

Au laboratoire, nous utilisons une souche de production appelée *E. coli* BL21 (DE3). Le suffixe DE3 fait référence au fond génétique de ces souches, qui intègrent un prophage  $\lambda$  (DE3) permettant la production de l'ARN polymérase T7. Lorsque ces souches sont induites avec de l'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fisher BioReagents), le promoteur régulant le gène de l'ARN polymérase T7 est activé, entraînant à son tour l'activation du promoteur T7 en amont de la séquence codant pour la protéine d'intérêt, permettant ainsi la transcription puis la traduction de cette protéine. Pour préparer les cellules *E. coli* BL21 (DE3), nous les avons inoculées dans un milieu de culture Luria-Bertani (LB) (Fisher BioReagents) à 37°C avec une agitation vigoureuse (200 RPM) jusqu'à ce que la densité optique du milieu ait atteint  $DO_{600} = 0,6$ . Après cette étape, les cellules ont été centrifugées à 6000 RPM à 4°C pendant 18 minutes dans une centrifugeuse (Beckman Coulter Avanti J-E). Le surnageant a été retiré et le culot a été resuspendu dans une solution de  $CaCl_2$  0,1 M et de glycérol à 15% (Fisher Chemical). Après une seconde centrifugation, le surnageant a été écarté et le culot a de nouveau été resuspendu dans une solution de  $CaCl_2$ . Le traitement des cellules par le  $Ca^{2+}$  a créé des micro-perforations dans les membranes, facilitant ainsi la transformation bactérienne ultérieure. Enfin, la solution a été

aliquotée et stockée dans un congélateur à ultra-basse température TDE (Thermo Scientific) à -80°C.

### 3.1.3. Préparation de l'ADN plasmidique

Cette étape fut réalisée à l'aide d'un kit PureLink Miniprep (ThermoFisher) qui a permis d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir de 1-5 mL de culture de cellules transformées avec le plasmide désiré. Après collecte des cellules par centrifugation, celles-ci ont subi une lyse alcaline, en présence de RNase, ainsi qu'une précipitation de l'ADN génomique par le chlorure de guanidinium. L'ADN fut alors éliminé par centrifugation, et le surnageant a été déposé sur une colonne comportant une membrane constituée de gel de silice, permettant une adsorption sélective de l'ADN plasmidique, en présence d'une forte concentration en sel. Après un lavage à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ARN et les protéines, l'ADN plasmidique ont été élués avec un tampon de faible force ionique (Tris 10 mM, 0,1 mM EDTA, pH 8). L'ADN plasmidique purifié a été stocké à -20°C. Le plasmide a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific).

### 3.1.4. Transformation bactérienne

La transformation est le processus par lequel le plasmide a été introduit dans une cellule compétente. Pour ce faire, un tube Eppendorf stérile contenant 100 µL de cellules compétentes auxquelles ont été ajoutés 2 µL de plasmide. Le mélange plasmide/cellules compétentes fut laissé 40 minutes sur glace puis on procéda à un choc thermique en plaçant le tube dans un mini-incubateur (Fisherbrand) à 42°C pendant 2 minutes, ce qui a permis la transformation des bactéries. En effet, ce processus accentue la déstabilisation de la bicouche lipidique et stimule la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Après incubation, on plaça les cellules 5 minutes sur glace. Ensuite, on ajouta 1 mL de milieu de LB dans les tubes et on incuba à 37°C pendant 3 heures. Après incubation, on a étalé les cellules transformées sur une boîte de Pétri de LB-agar avec l'antibiotique approprié (100 mg/mL), ici l'ampicilline (Fisher BioReagents) et on plaça les boîtes dans l'incubateur pendant 24h à 37°C. Les colonies formées sont celles contenant le vecteur de surexpression.

### 3.1.5. Expression de CCIS2b

Deux méthodes d'expression ont été testées lors de la production de CCIS2b. Premièrement, une méthode qui produirait l'*holo*-CCIS2b (protéine directement liée à son cofacteur) et une seconde méthode qui produirait l'*apo*-CCIS2b (protéine sans son cofacteur) et qui nécessiterait par la suite une reconstitution chimique du cofacteur.

#### A. Expression d'*holo*-CCIS2b

Les colonies ont été sélectionnés sur le milieu LB-agar, contenant 100 mg/L d'ampicilline. Une colonie a été isolée sur la boîte de Pétri et a été inoculer en culture dans 50 mL de milieu LB/ampicilline (100 mg/mL). Après une incubation d'une nuit à 30°C, sous agitation (180 RPM), cette pré-culture a été inoculé dans 2 litres de milieu de culture LB/ampicilline. La culture se poursuivi à 37°C avec une vitesse de 200 RPM pendant 6h. Lorsque la densité optique des cultures atteignait 0,6, l'expression de la protéine CCIS2b fut induite par ajout d'une solution d'IPTG (0,2 mM) et on ré-incuba la culture à 125 rpm, 30°C. Après 1h, on ajouta une solution de 200 mM de Fe<sup>3+</sup> (citrate d'ammonium ferrique III) (Alfa Aesar) et 50 mM de méthionine (Fisher chemical). L'incubation continua pendant 5 h avec les mêmes paramètres. Après l'incubation, les culots bactériens furent récupérés par centrifugation à 6000 rpm (Beckman Coulter Avanti J-E), à 4°C, pendant 18 minutes et conservés à -20°C.

Le choix de baisser la température de 37°C à 30°C est un paramètre inhabituel lors d'expression classique de protéine, cette modification provient de la littérature et permet habituellement de la formation contrôlée du cluster Fe-S au sein de protéine Fe-S naturelle (Carter, Joseph Kraut, Nguyen-huu, Richard A, & Robert G). Étant donné que la cinétique de formation de l'apoprotéine est plus rapide que celle du cofacteur, cela laisse le temps à ce dernier de se former et de s'insérer au sein de l'apoprotéine et donc d'obtenir l'*holo*protéine.

#### B. Expression d'*apo*-CCIS2b

Pour cette méthode, l'expression se déroula comme une expression de protéines standard. L'expression se déroula à 37°C avec une vitesse de 200 RPM dans un milieu LB/ampicilline (100 mg/mL). Lorsque la densité optique des cultures atteignait 0,6, l'expression de la protéine CCIS2b fut induite par ajout d'une solution d'IPTG (0,2 mM). Après 3 heures d'incubation, les

culots bactériens furent récupérés par centrifugation à 6000 rpm (Beckman Coulter Avanti J-E), à 4°C, pendant 18 minutes et conservés à -20°C. Cette méthode permettait la production de l'*apoprotéine*.

### 3.1.6. Lyse des cellules

On a procédé à 2 types de lyse pour nos cellules. On a débuté nos expériences avec la lyse mécanique (sonication). Cependant, cette technique induisait la dénaturation des protéines. Ainsi, on a finalement opté pour une lyse chimique dans un environnement anaérobie.

#### A. Lyse mécanique aérobie

Le culot de protéine fut resuspendu dans un tampon A (Tris/HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M), enrichi en fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 2 mM (Sigma Aldrich) et 400 µg/mL de lysozyme (MP Biomedicals). Puis, les membranes et les parois des cellules bactériennes ont été lysées par ultrasons (Branson Sonifier 450) en effectuant 5 cycles de sonication de 2 minutes, le mélange réactionnel fut incubé sur un bain de glace afin de diminuer l'activité des protéases.

#### B. Lyse chimique anaérobie

Le culot de protéine a été resuspendu dans un tampon A (Tris/HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M), enrichi en PMSF (Sigma Aldrich) 4 mM et 800 µg/mL de lysozyme (MP Biomedicals). On y ajoute 0,1% de triton X-100 (Sigma Aldrich) et 6 µL de benzonase nucléase ( $\geq 250$  unités/µL, pureté  $\geq 90\%$ ) (Millipore Sigma). Le mélange a été laissé sur glace et sous agitation pendant 1 heure.

### 3.1.7. Purification d'*apo*-CCIS2b

Après la lyse, le lysat a été centrifugé (13 000 RPM, 40 min, 4 ° C) (Biofuge Stratos) afin de séparer les fractions soluble (surnageant) et insoluble contenant les débris cellulaires et les protéines insolubles (culot). Le surnageant a été chargé sur une colonne Ni-NTA sur un système FPLC (ÄKTA start) préalablement équilibrée avec le tampon A. Cette étape chromatographique permet une purification aisée des protéines possédant une queue polyhistidine. Les fractions

protéiques ont été éluées avec un gradient par étapes de 50 mM, 90 mM et 175 mM d'imidazole (Sigma Aldrich) dans le tampon A. Les fractions ont été récupérées et ensuite analysées sur un gel d'électrophorèse afin de vérifier que la protéine pure a été éluée lors de l'étape finale d'imidazole à 175 mM.

### 3.1.8. Électrophorèse SDS-PAGE

Après avoir récupérés les fractions purifiés, on a vérifié la pureté et la masse des protéines par électrophorèse (Amersham Pharmacia EPS-601). Ainsi, 5 mg de protéines ont été dénaturées par chauffage à 95°C dans du tampon de dénaturation (Tris-HCl 250 mM pH=6,8, SDS 10 %, glycérol 50 %, bleu de bromophénol (BPP) 0,5 %, Dithiothréitol (DTT) 500 mM) (MP Biomedicals). Les échantillons protéiques dénaturés furent déposés dans les puits du gel de polyacrylamide contenant du SDS (tableau 3.1). Ensuite, les protéines migraient lors du passage d'un courant électrique de 300 V et 50 mA pendant approximativement 90 minutes. Les bandes correspondant aux protéines ont été révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0,1 %, méthanol 40 %, acide acétique 10%) suivi d'une décoloration dans une solution décolorante (méthanol 10 %, acide acétique 10 %).

Tableau 3.1 : composition des gels d'électrophorèse.

Réactifs	Gel de séparation 12 %	Gel de concentration 12%
Eau distillée	4,80 mL	2,93 mL
Acrylamide/Bisacrylamide	6 mL	670 µL
Tris-Base 1,5 M pH=8,8	3,9 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH=6,8	-	1,3 mL
SDS 10 %	150 µL	50 µL
APS 10%	150 µL	50 µL
Temed	15 µL	5 µL

### 3.1.9. Concentration de CCIS2b

Après purification, la protéine a été concentrée par ultrafiltration dans une cellule de concentration Amicon 3KDa (Millipore Sigma) avec un tampon (50 mM Tris/HCl pH 8 ou 25 mM Tris/HCl pH 7,5).

### 3.1.10. Reconstitution chimique du cluster Fe-S dans CCIS2b

La reconstitution chimique du cluster Fe-S se déroula dans une boîte à gants sous atmosphère contrôlée ( $O_2 < 4$  ppm) (Vacuum Atmospheres). On incuba l'apoprotéine CCIS2b purifiée (à des concentrations allant de 40 à 150 micromolaires) avec un agent réducteur (DTT ou bêta-mercaptoéthanol) (Bio Basic). Différentes concentrations d'agent réducteur ont été testées, de 5 mM à 10 mM, pour obtenir un ratio final agent réducteur : cystéines de 2,1 : 1. Ce mélange réactionnel fut laissé sur glace pendant différentes durées, de 30 minutes à 1 heure. Après l'ajout de l'agent réducteur, on incorpora la source de fer avec un ratio source de fer : cystéines de 1,2 : 1 (plusieurs sources de fer ont été testées, dont le chlorure de fer, le nitrate de fer et le citrate d'ammonium ferrique) (Alfa Aesar). Ensuite, la source de soufre a été ajoutée successivement avec un ratio source de soufre : cystéines de 1,2 : 1 (plusieurs sources de soufre ont été testées, notamment le sulfure de sodium et l'hydrogénosulfure de sodium). La durée d'incubation varia selon les expériences, allant de 1 à 24 heures. La solution brunâtre fut ensuite concentrée et chargée sur une colonne Ni-NTA équilibrée avec un tampon de 50 mM Tris pH 8,3. La protéine, de couleur brune, fut collectée après avoir éliminé l'excès de fer et de soufre. Enfin, un spectre d'absorption UV-visible et un dosage de fer ont été réalisés à la fin de chaque reconstitution.

## 3.2. Analyses biochimiques

### 3.2.1. Dosage de CCIS2b

Les protéines ont été dosées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop One (Thermo Fisher).

### 3.2.2. Dosage du fer dans CCIS2b

Le dosage du fer fut effectué selon une méthode colorimétrique quantitative. Une gamme d'étalonnage fut tout d'abord réalisée afin de pouvoir déterminer ensuite la quantité de fer présente dans un échantillon protéique (tableau 3.2).

### 3.2.3. Gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage a été réalisée à l'aide d'une solution de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ ) (Fisher Scientifique) dont la concentration est ajustée à 0,4 mM. Des Eppendorfs contenant différentes quantités de fer ont été préparés comme décrit dans le tableau 2, en ajustant le volume à 100  $\mu\text{L}$  avec de l'eau ultra pure.

Tableau 3.2 : gamme d'étalonnage du Fe (II) de 0 à 0,4mM.

Solution Fe <sup>2+</sup> [0,5mM] ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	[Fe <sup>2+</sup> ] finale (mM)
0	100	0,00
8	92	0,04
16	84	0,08
24	76	0,12
32	68	0,16
40	60	0,20
48	52	0,24
56	44	0,28
64	36	0,32
72	28	0,36
80	20	0,40
CCIS2b (5 $\mu$ L)	95	-
CCIS2b (10 $\mu$ L)	90	-

Chaque étalon fut alors traité de la façon suivante :

- 100  $\mu$ L de solution de Solution Fe<sup>2+</sup> (en ajustant la dilution).
- 100  $\mu$ L d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 22% (Fisher Chemical).
- On mélange par inversion et on incube les solutions à 95°C pendant 30 minutes.
- On laisse les tubes refroidir à température ambiante.
- On ajoute 600  $\mu$ L d'acétate d'ammonium (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) 7,5% (Fisher Chemical). Sert à neutraliser le milieu.
- On mélange par inversion et on centrifuge brièvement.
- On ajoute 100  $\mu$ L d'acide ascorbique (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) 12,5% (Bio Basic). Ce produit est un réducteur qui permet de mettre tout le fer présent en solution sous forme de Fe<sup>2+</sup>.
- On ajoute 100  $\mu$ L de sel disodique de l'acide 3-(2-pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-triazine-5',5''-disulfonique ou ferène (Sigma Aldrich). Il s'agit d'un chélateur de fer.
- On mélange par inversion et on laisse 30 minutes à température ambiante.



La même procédure a été appliquée avec 5  $\mu$ L et 10  $\mu$ L de CCIS2b en duplicata afin d'obtenir une meilleure précision des résultats. Dans cette gamme de pH, le complexe formé entre le fer et le ferène est bleu. La couleur de la solution est proportionnelle à la quantité de fer présente dans l'échantillon. La mesure de l'absorbance à 593 nm a été effectuée pour chaque échantillon. La gamme d'étalonnage fut obtenue en portant l'absorbance à 593 nm en fonction de la concentration en fer.

#### 3.2.4. Échantillons de CCIS2b

Des échantillons de concentration connue en protéine et ayant un volume final de 1 ml ont été préparés et traités de la même façon que les étalons. La lecture de l'absorbance à 593 nm a permis de déterminer la quantité de fer présente dans la protéine.

### 3.3. Analyses bio-informatiques

#### 3.3.1. Méthodologie pour l'étude de la prédiction des protéines Fe-S

Deux types de logiciels (AlphaFold et I-TASSER) ont été utilisés pour étudier les variantes de CCIS2b selon les méthodes suivantes :

##### *Méthodologie pour I-TASSER :*

- Il a fallu se rendre sur le site web d'I-TASSER (Version 5.1) (url : <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) (Yang J & Zhang, 2015)
- Sur la page d'accueil, il a fallu choisir entre deux modes de prédiction, soit par défaut ou soit avancé. Le mode avancé offrait des options supplémentaires pour personnaliser la prédiction. Dans cette étude, nous avons utilisé le mode par défaut.
- La séquence d'intérêt fut entrée dans la section soumission de séquence, la séquence devait être en format FASTA.
- La prédiction a été lancée en cliquant sur le bouton « Submit ».
- Une fois que la soumission a été effectuée, I-TASSER commença la prédiction de la structure la protéine d'intérêt en utilisant sa méthode d'assemblage de fragments.

- Une fois la prédiction terminée, différentes sections expérimentales ont été présentées (prédiction de la structure, évaluation de la qualité de la prédiction, génération de modèles alternatifs, prédiction des sites de liaison ou des ligands, comparaison avec des structures connues et fonction ou rôle biologique).
- Après avoir téléchargé la structure d'intérêt, il a été possible d'explorer la structure avec *Pymol* afin d'évaluer les distances, les angles entre les différents atomes et/ou les ligands dans la structure prédite.

*Méthodologie pour AlphaFold :*

- Il a fallu se rendre sur l'interface d'AlphaFold (ColabFold v1.5.5: AlphaFold2) (url : <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>).
- La séquence d'intérêt a été soumise sous le format FASTA.
- La prédiction a été lancée.
- Une fois que la prédiction fut terminée, il a été possible de visualiser les résultats incluant la structure tridimensionnelle prédite de la protéine. Des évaluations de la confiance de la prédiction, interactions et liaisons, comparaison avec des structures connues, domaines fonctionnels, conservation des résidus ont été présentés.
- Après avoir téléchargé la structure d'intérêt, il a été possible d'explorer la structure avec *Pymol* afin d'évaluer les distances, les angles entre les différents atomes et/ou les ligands dans la structure prédite.

## CHAPITRE 4 – RÉSULTATS & DISCUSSION

### 4.1. Choix et design de la protéine

Pour amorcer nos investigations, nous avons entrepris la conception de la séquence de la protéine d'intérêt, CCIS2b. Cette séquence a été élaborée en référence aux travaux de Grzyb (Grzyb J. , et al., 2012). Leurs études portaient sur le développement d'une protéine Fe-S non naturelle (CCIS) par le biais d'une approche informatique. Par la suite, ces recherches ont conduit à la création de différentes variantes de cette protéine, dont fait partie CCIS2b, afin d'améliorer la stabilité du cluster Fe-S. Ces types de protéines présentent un intérêt particulier pour la compréhension de la photosynthèse et l'oxydation mitochondriale, ainsi que pour les processus biotechnologiques, tels que la production de biohydrogène par les hydrogénases. Ces protéines peuvent également être utilisées pour améliorer ou contrôler la photosynthèse *in vivo*.

La séquence de CCIS2b utilisée dans cette étude a été enrichie d'une queue poly-histidine (tag histidine). L'ajout de ce tag histidine constitue une stratégie courante visant à faciliter la purification ultérieure par chromatographie Ni-NTA. L'emplacement des résidus de cystéine est déterminant, car leur participation à la coordination des ions de fer et de soufre est fondamentale pour la stabilité globale de la protéine CCIS2b. Ainsi, la séquence intègre quatre cystéines, judicieusement positionnées exclusivement sur les hélices 1 et 3. La présence de cystéine contribue à la stabilité structurale en formant des liaisons covalentes avec les clusters, guidant ainsi la formation des clusters. Conformément à la section 1.3, un motif tel que CxxC, fréquemment observé dans les protéines Fe-S, a orienté la conception pour optimiser l'expression et faciliter la coordination du cluster [4Fe-4S], créant ainsi un environnement propice à la liaison des clusters. Pour finir, des motifs spécifiques, tels que TSN (thréonine-sérine-asparagine) et GSVP (glycine-sérine-valine- proline), sont présent afin de favoriser les interactions entre les différentes hélices (figure 4.1). La séquence conçue permet ainsi le lancement de l'expression de la protéine.

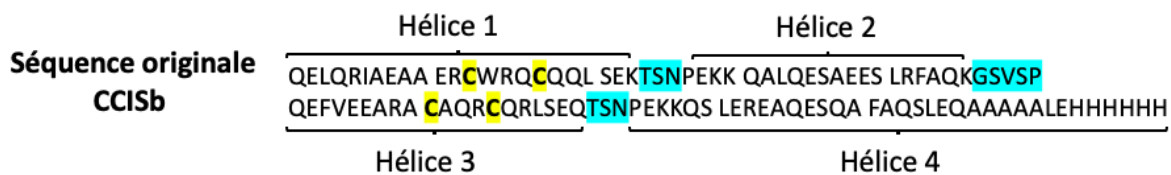


Figure 4.1 : séquence polypeptidique de CCIS2b. Les cystéines sont représentés en jaune. Les boucles de connexions entre les hélices sont représentés en bleu.

#### 4.2. Tentative d'expression d'*holo*-CCIS2b

Deux approches d'expression pour CCIS2b ont été examinées en vue de produire la protéine d'intérêt.

Nos investigations ont débuté par la tentative de production de l'*holo*-CCIS2b (section 3.1.5 A), où la protéine serait exprimée directement avec son cofacteur intégré. Cette stratégie, déployée dans *E. coli* BL21 (DE3) (induite par l'IPTG), impliquait la surexpression de CCIS2b en présence de citrate d'ammonium ferrique et de méthionine pour incorporer le cofacteur [4Fe-4S] *in vivo*. La purification par Ni-NTA du mélange réactionnel a abouti à une solution de couleur jaune clair, suggérant l'absence de clusters au sein de la protéine. La spectroscopie UV-visible a confirmé ces observations, révélant une absence de bandes d'absorption dans la plage 300-600 nm, typique des clusters Fe-S et plus spécifiquement à 414 nm la longueur d'onde typique des clusters [4Fe-4S] comme le suggère la littérature (Valer, Rossetto, Scintilla, Hu, & Tomar, 2022). On observe un seul pic à 280 nm qui correspond à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique (figure 4.2).

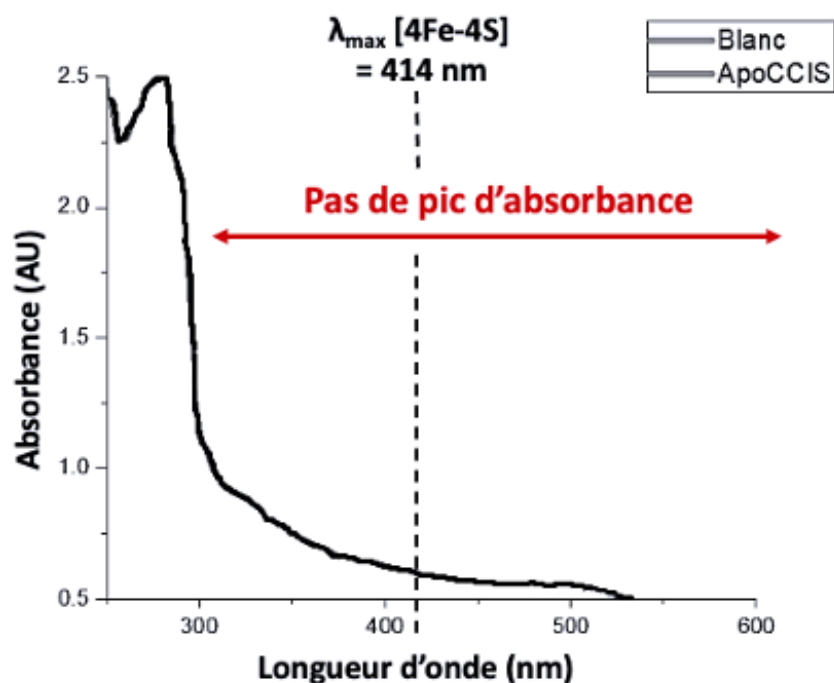


Figure 4.2 : spectre d'absorption UV-visible enregistré lors de la tentative de production de l'*holo*-CCIS2b en utilisant une cuve avec une épaisseur optique de 1 cm, dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 0,5M.

Malgré des essais variés pour améliorer l'incorporation du cluster au sein de la protéine (voir tableau 4.1), aucune réussite n'a été enregistrée, et la solution de couleur jaune claire obtenue pour chaque essai indiquait l'absence de clusters Fe-S, suggérant une difficulté de la protéine à lier son cofacteur. Ces tentatives infructueuses peuvent être attribuées à la non-reconnaissance des sites de liaison par la machinerie d'assemblage spécifique à certains cluster Fe-S. En effet, la prédominance d'*apo*-CCIS2b suggère que les souches bactériennes utilisées dans la production de protéines peuvent être déficientes en termes de biosynthèse et de trafic de cofacteurs, ainsi que de machineries d'assemblage, ce qui nécessite l'introduction et l'optimisation de ces voies pour un système hétérologue. Ainsi, les protéines Fe-S *de novo* conçues sur la base de critères structuraux et chimiques pour la coordination de cofacteurs métalliques peuvent manquer de séquences ou de motifs structuraux appropriés qui permettent aux protéines chaperonnes de recruter les cofacteurs vers l'apoprotéine cible contrairement à leurs homologues naturels comme évoqué dans la section 1.4.1. Des analyses bio-informatiques approfondies

pourraient être entreprises pour identifier si de tels motifs sont impliqués dans l'assemblage *in vivo* des clusters Fe-S.

Lors de la tentative d'expression de l'*holo*-CCIS2b, un second élément crucial à considérer est l'exposition à l'oxygène, facteur connu pour influencer la formation et la stabilité des clusters Fe-S, comme mentionné au point 1.5.2. La présence d'oxygène lors de l'expression de la protéine peut favoriser l'oxydation des résidus de cystéine impliqués dans la coordination du cluster, entraînant ainsi la désintégration du cluster [4Fe-4S]. Les liaisons Fe-S, sensibles à l'oxydation, peuvent être altérées, compromettant ainsi la structure tridimensionnelle et la fonction de la protéine. Ainsi, à l'issue de la purification, l'absence de cluster peut être dû à une possible dégradation du cluster Fe-S. L'exposition à l'air pendant l'expression et la purification de la protéine, pourraient contribuer à cette instabilité du cluster. Pour optimiser le protocole, des précautions accrues vis-à-vis de l'oxygène, en effectuant l'expression et la purification sous atmosphère contrôlée ou l'utilisation d'agents réducteurs, pourraient constituer des solutions à explorer pour atténuer l'impact de l'oxygène sur la stabilité du cluster lors de l'expression de l'*holo*-CCIS2b. Cette considération permettrait de maximiser les chances de former la protéine fonctionnelle tout en minimisant les risques d'oxydation et de désintégration du cofacteur métallique.

L'exploration de cette méthode était motivée par son potentiel d'insertion efficace et contrôlée du cofacteur, en contraste avec la production *in vitro*.

Tableau 4.1 : différents paramètres testés pour la tentative de production de l'*holo*-CCIS2b.

Essais	Volume de culture (L)	Avant IPTG			Après IPTG			Rendement						
		H <sup>2</sup> (h)	T <sup>1</sup> (°C)	RPM	H (h)	T (°C)	RPM	[Fe <sup>3+</sup> ]	[S <sup>-2</sup> ]	V <sup>3</sup> (μL)	[CCIS2b] (mM)	Couleur	Cluster Fe-S	
<b>Propriétés idéales</b>											<b>Brune</b>	<b>✓</b>		
1	2	3	37	200	3	30	125	200	50	150	-	Jaune claire	X	
2	2	5			3					180				
3	2	5			5			400	100	200			5,75	X
4	5	5			5					350			6,61	

#### 4.3. Expression et purification d'*apo*-CCIS2b

Poursuivant nos recherches, l'expression *in vitro* de CCIS2b selon le protocole rapporté à la section 3.1.5B a été privilégiée, avec une anticipation délibérée de la production de la protéine dans son état *apo*. Cette préférence découle de nos résultats expérimentaux obtenus au préalable et des défis associés à la formation du cluster Fe-S lors de l'expression *in vivo*. L'expression a également été réalisée dans *E. coli* BL21 (DE3) en induisant la surexpression par l'IPTG, dans des conditions d'expression standard. Dans cette approche *in vitro*, les *apo*-CCIS2b exprimés ont été dotés d'une extension polyhistidine pour faciliter leur purification par chromatographie d'affinité Ni-NTA. Comme escompté, la sortie de colonne a révélé une solution jaune claire, reflétant la prédominance attendue de la protéine sous forme *apo*. Il faut noter que le SDS-PAGE ne permet pas d'observer le poids moléculaire de l'*holo*protéine, car l'expérience est conçue de telle sorte que la protéine est toujours dénaturée, et que les cofacteurs sont donc perdus. L'analyse SDS-page ne confirme pas exactement la taille prévue de CCIS2b, d'approximativement

<sup>1</sup>H : heure

<sup>2</sup>T : température

<sup>3</sup>V : volume

12563,72 Da (figure 4.3), dans les extraits cellulaires. En effet, comme on peut apercevoir sur le gel SDS-page, l'apoprotéine n'a pas migré exactement à la masse prévue cela est dû au fait que la protéine est de petite taille et les écarts par rapport à la référence en termes de poids moléculaire sont courants pour les protéines de petite taille. L'absence de contaminants sur le gel polyacrylamide atteste de la pureté de la protéine obtenue.

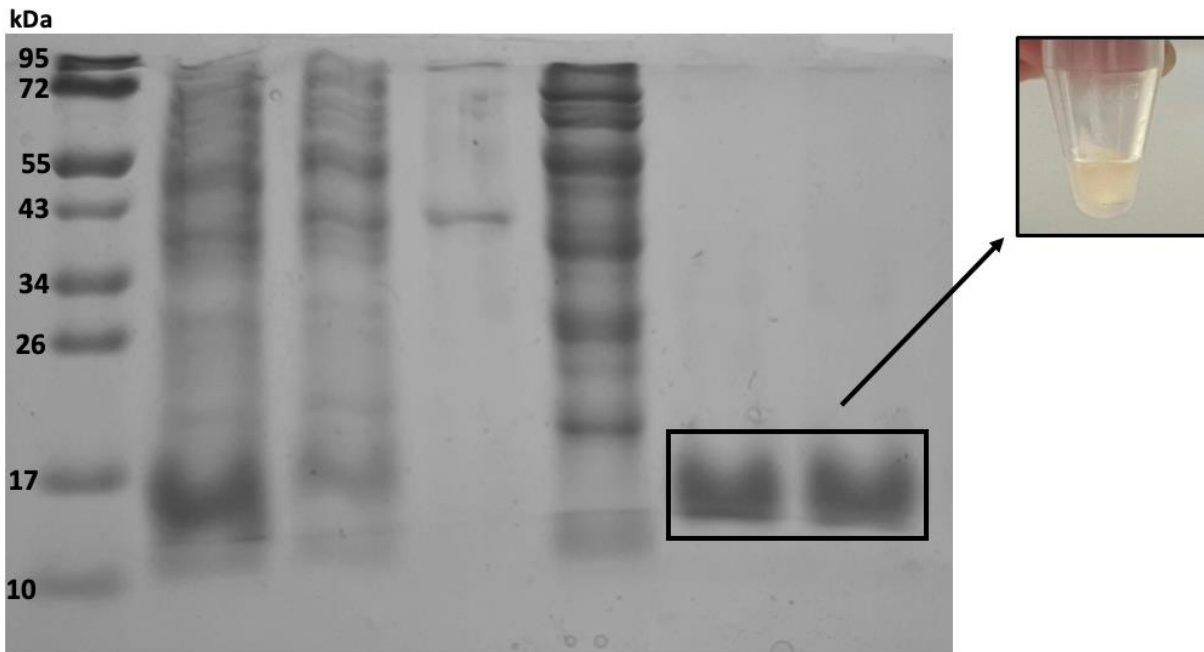


Figure 4.3 : gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes obtenus durant la purification de CCIS2b. 1 : marqueur de poids moléculaire (en kDa) ; 2 : fraction protéique totale ; 3 : fraction de lavage ; 4-5 impuretés ; 6-7 : protéine CCIS2b. L'apo-CCIS2b es représenté par la solution jaune claire.

Les analyses par spectroscopie UV-visible consolident également notre observation de l'absence de pics d'absorbance caractéristiques dans la plage attendue (300-600 nm) (figure 4.4), on observe également dans ce spectre un seul pic à 280 nm qui correspond à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. Ces observations sont cohérentes dans les conditions expérimentales d'expression *in vitro*.

Ces résultats, permettent d'amorcer la reconstitution chimique du cofacteur afin de permettre une insertion du cluster au sein de l'apo-CCIS2b. Cette approche pourrait potentiellement surmonter les obstacles liés à la production *in vivo*. Des ajustements précis des



conditions expérimentales de reconstitution seront explorés, visant à optimiser la formation du cluster [4Fe-4S] robuste et fonctionnelle.

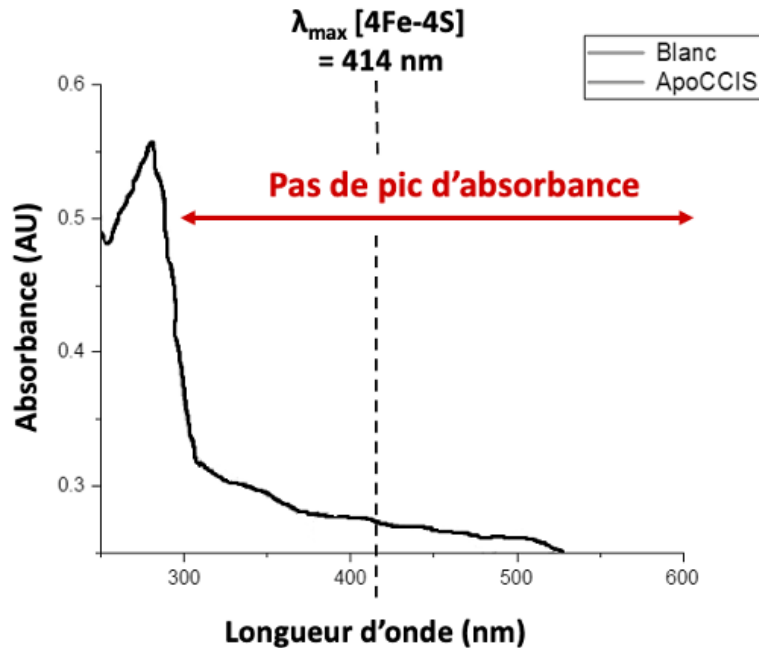


Figure 4.4 : spectre d'absorption UV-visible enregistré lors de la production de l'*apo*-CCIS2b en utilisant une cuve avec une épaisseur optique de 1 cm, dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 0,5M.

#### 4.4. Reconstitution du cluster Fe-S : formation de rec-CCIS2b

Afin d'instaurer la reconstitution du cluster Fe-S dans des conditions anaérobies, les protéines sont incubées avec une source de fer et de soufre, accompagnée d'un agent réducteur, sous atmosphère anaérobie au sein d'une boîte à gants, pour prévenir toute oxydation. Une fois la protéine reconstituée, elle est purifiée et débarrassée de l'excès de soufre et de fer à travers une colonne de purification.

##### 4.4.1. Choix des réactifs de la reconstitution

###### 4.4.1.1. Agents réducteur

Pour débiter, l'*apo*-CCIS2b était prétraité avec du DTT comme agent réducteur, incubé pendant 30 minutes, en conditions anaérobies. Ce prétraitement est nécessaire car les cystéines de la protéine doivent être réduites pour réagir avec les ions de fer. Cependant, des observations,

corroborées par certaines références (Gao H. , Function and maturation of the Fe–S center in dihydroxyacid dehydratase from Arabidopsis) (Vranish, Russell, Yu, Cox, & Barondeau, 2014), ont mis en évidence une potentiel interférence lors de l'utilisation du DDT dans la réaction de reconstitution, en raison de ses deux fonctions thiol additionnelles qui peuvent concurrencer les clusters Fe-S pour les liaisons thiol des cystéines. Ainsi, le protocole a été ajusté en éliminant le DTT, en le remplaçant par du  $\beta$ -mercaptoéthanol. Par la suite, on ajoute la source de fer au mélange réactionnel.

#### 4.4.1.2. Sources de fer

Des sources variées de fer ont également été explorées, compte tenu de la réactivité variable des sels de fer.

En commençant par le  $\text{FeCl}_2$  qui a été privilégié par rapport au  $\text{FeCl}_3$  pour des questions liées aux propriétés chimiques des ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ), ainsi qu'à la nature des clusters présents dans les protéines Fe-S. Les clusters Fe-S présents sont principalement sous l'état d'oxydation +2 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou dans un équilibre entre les états +2 et +3. L'utilisation du  $\text{FeCl}_2$  garantit que le fer soit dans l'état d'oxydation approprié pour le cluster. De plus, les clusters Fe-S sont sensibles à l'oxydation. Ainsi le  $\text{Fe}^{2+}$  est moins oxydant que le  $\text{Fe}^{3+}$ . Son utilisation réduit les risques d'oxydation et est plus compatible avec des conditions réductrices (notamment lors d'ajout d'agents réducteurs comme le DTT lors de la reconstitution chimique). Malgré ces précautions, les observations montraient que ce dernier était trop réactif et induisait des particules insolubles au sein de la solution protéique. Ensuite, le  $\text{FeNO}_3$  a été essayé, le réactif n'était pas stable dans nos conditions expérimentales malgré l'absence de particules insolubles dans les échantillons obtenus. Le  $(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$  a été notre choix final et a permis une insertion plus contrôlée du cofacteur.

#### 4.4.1.3. Sources de soufre

De même, le choix de source de soufre a été méticuleux après l'élimination d'une source contaminée ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), en évaluant différentes alternatives en prenant en compte la pureté du réactif ainsi que sa réactivité. Des tests de reconstitution ont permis de déterminer la source

optimale, sous forme de HNaS, contribuant ainsi à une insertion plus efficace du soufre lors de la réaction.

Ces expérimentations ont permis d'évaluer les réactifs optimaux à la reconstitution chimique (figure 4.5).

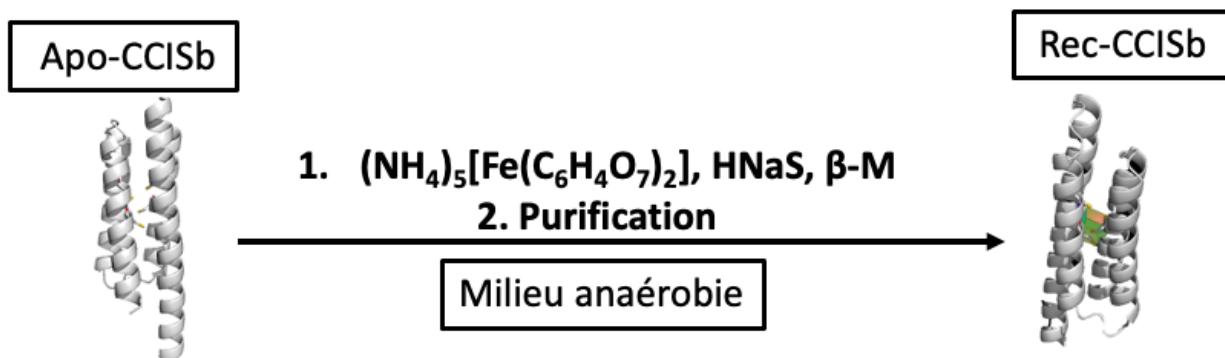


Figure 4.5 : schéma simplifié des paramètres optimaux pour la reconstitution chimique du cluster de rec-CCIS2b.

#### 4.4.2. Optimisation des conditions expérimentales de la reconstitution

##### 4.4.2.1. Influence de la concentration des réactifs

Une augmentation de la concentration des réactifs s'est avérée bénéfique pour améliorer l'efficacité de la reconstitution. Cette optimisation a été soutenue par des analyses à différentes concentrations, où le doublement de la concentration des réactifs, passant de 5 mM à 10 mM pour chacun, a été observé.

##### 4.4.2.2. Influence de la composition du tampon

Les ajustements de la composition du tampon et du pH ont également influencé la réaction, montrant une amélioration nette en travaillant à un pH plus alcalin.

L'incorporation de NaCl dans le tampon de reconstitution a également été envisagée afin de favoriser l'insertion du cluster selon la littérature (Grzyb J. , et al., 2010). NaCl offre plusieurs avantages : elle stabilise les interactions hydrophobes entre les protéines et les cofacteurs, contribuant ainsi à maintenir une conformation structurée pendant la réaction de reconstitution ;

elle influence la solubilité des composés, prévenant la formation de agrégats insolubles et améliorant ainsi l'efficacité de la purification ultérieure. En outre, l'ajout de NaCl peut également réguler la force ionique du milieu réactionnel, ce qui peut avoir des effets sur la cinétique et l'équilibre de la réaction de reconstitution et peut influencer positivement l'efficacité de la liaison des cofacteurs métalliques aux protéines, favorisant ainsi une formation de cluster Fe-S plus contrôlée.

#### 4.4.2.3. Choix de la méthode de purification

Une colonne de dessalage PD-10 initialement utilisée pour la purification s'est révélée inefficace en raison de la présence de particules insolubles, nécessitant un changement vers une purification via Ni-NTA pour garantir une purification efficace. L'observation de l'agrégation dans les échantillons étaient également corroboré par les études de Grzyb avec CCIS, ce qui souligne les défis liés à la stabilité.

Malgré la teinte brune de la solution obtenue, suggérant la liaison réussie de l'apoprotéine à son cofacteur, et donc de la formation du rec-CCIS2b, la protéine était sujette à une instabilité structurelle. Des études, utilisant la plateforme de simulation moléculaire AMBER (Salomon-Ferrer, 2013), ont mis en évidence des modifications dans la structure du modèle CCIS, notamment un écartement des ligands des rotamères initialement spécifiés, potentiellement dû à la contrainte imposée sur le site de liaison par le pli du faisceau à quatre hélices. Ainsi, pour améliorer la stabilité de cette protéine, une révision significative de l'échafaudage de départ serait nécessaire, ce qui pourrait impliquer une réévaluation des résidus impliqués dans la liaison du cluster Fe-S.

Tous les paramètres ayant menés à assurer une reconstitution chimique efficace ont été résumé dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : différents paramètres testés pour l'insertion du cluster Fe-S.

Essais	Apo-CCIS ( $\mu\text{M}$ )	Tampon de reconstitution	Réactifs			Observation	Cluster Fe-S
			Fe (10 mM)	S <sup>2-</sup> (10 mM)	Agent Réducteur (10 mM)		
<b>Propriétés optimales</b>						<b>Solution brune</b>	<b>✓</b>
<b>1</b>	20	50 mM Hepes, pH 8.0	FeCl <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O	DTT	Solution noire + Agrégation solide noir	<b>✗</b>
<b>2</b>	40	50 mM Hepes, pH 8.0	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		$\beta$ -M	Solution noire sans agrégation	<b>✗</b>
<b>3</b>		Tris 25mM, pH 7.5		<b>✗</b>	Solution brune foncée	<b>✗</b>	
<b>4</b>		Tris 25mM, pH 7.5		$\beta$ -M	Solution brune clair + Agrégation solide noir	<b>✗</b>	
<b>5</b>		Tris 25mM, pH 7.5		<b>✗</b>	Solution noire sans agrégation	<b>✗</b>	
<b>6</b>		25 mM, Tris pH 7.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	HNaS	$\beta$ -M	Solution noire sans agrégation	<b>✗</b>
<b>7</b>		25 mM Tris, pH 8.3		<b>✗</b>	Solution brune-orange foncée	<b>✗</b>	
<b>8</b>		25 mM Tris-0,5 M NaCl, pH 8.3		$\beta$ -M	Solution brune-orange foncé	<b>✓</b>	
<b>9</b>		25 mM Tris-0,5 M NaCl, pH 8.3		$\beta$ -M	Solution brune foncée	<b>✓</b>	
<b>12</b>	150	25 mM Tris-0,5 M NaCl, pH 8.3		$\beta$ -M	Solution brune foncée	<b>✓</b>	

#### 4.4.2.4. Influence du temps sur la formation du cluster Fe-S

La durée d'incubation des protéines avec les cofacteurs a également, été optimisée permettant de déterminer la durée d'incubation des réactifs optimale afin de favoriser une interaction complète sans compromettre la stabilité de la protéine. Ces ajustements temporels ont été réalisés en tenant compte de la cinétique réactionnelle spécifique de la formation du cluster. Il s'agit d'un équilibre entre assurer une interaction suffisamment prolongée pour permettre une liaison complète des cofacteurs, tout en évitant une exposition excessive qui pourrait conduire à des processus indésirables, tels que l'agrégation ou la dégradation. Une incubation trop courte pourrait ne pas permettre une interaction complète entre la protéine et les cofacteurs,

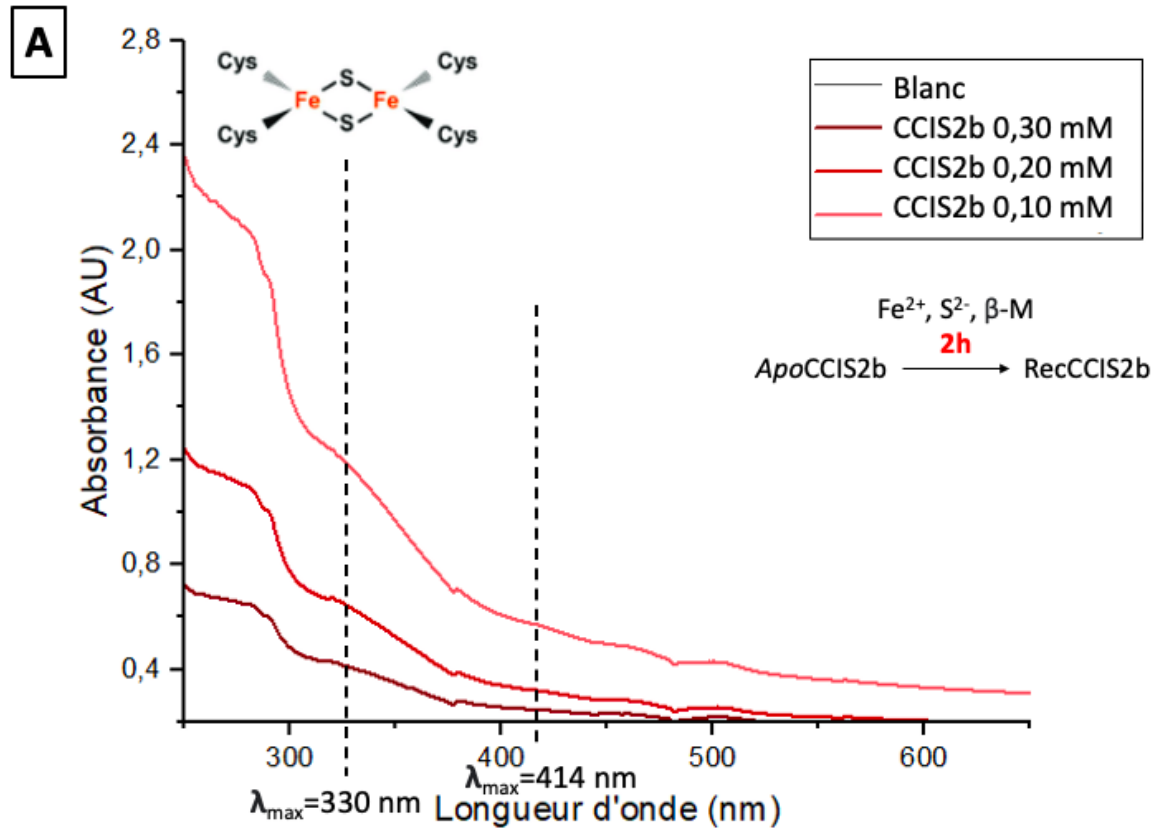
compromettant ainsi la formation du cluster Fe-S. D'un autre côté, une incubation excessive peut potentiellement conduire à des changements conformationnels indésirables ou à des réactions secondaires, affectant la structure et la fonction de la protéine. Ainsi, des essais ont été menés à différents intervalles (2h, 18-24h), surveillant la formation des clusters via des analyses par spectroscopie UV-visible.

À la suite de la reconstitution chimique, des analyses des spectres UV-visible des protéines reconstituées ont été entreprises pour évaluer la formation du clusters Fe-S. Les échantillons incubés selon un protocole court (à 4°C pendant 2 heures) ont principalement montrés de clusters [2Fe-2S], tandis que ceux incubés selon un protocole long (à 4°C pendant 18-24 heures) ont présentés un mélange de clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S] (figure 4.6).

La prédominance des clusters [2Fe-2S] lors du protocole court a été confirmé par l'épaulement à 320-350 nm dans le spectre 4.6A. On peut également observé qu' à 414 nm (Lippard & Berg, 1994), la longueur d'onde typique des cluster [4Fe-4S], il y a une absence de pic d'absorbance. En prolongeant le temps d'incubation des protéines reconstituées (18-24h), l'objectif était de favoriser la formation complète des clusters [4Fe-4S]. Le spectre 4.6B nous indique bien la formation du cluster [4Fe-4S] à 414 nm mais également à 330 nm la présence de cluster [2Fe-2S], le spectre présente un mélange de clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. Les clusters [4Fe-4S] présentent une absorbance à 414 nm, longueur d'onde typique également référencer dans la littérature. Toutefois déterminer la nature du cluster Fe-S incorporé s'avère complexe, et les proportions variables entre les clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S] suscitent des questionnements. Cette variabilité pourrait résulter d'une propriété intrinsèque de la protéine, suggérant sa capacité à assembler les deux types de clusters Fe-S, ou être attribuable à des conditions *in vitro* divergentes des conditions physiologiques. Il est envisageable que la protéine possède initialement un cluster [2Fe-2S], qui, en présence d'un excès de fer et de soufre dans le milieu réactionnel, pourrait se transformer en un cluster [4Fe-4S]. Alternativement, la protéine pourrait contenir un cluster [4Fe-4S] sujet à une désintégration partielle comme évoqué dans la section 1.5.2. Cette complexité suscite des questionnements sur les mécanismes sous-jacents.

Dans le cas de la protéine CCIS2b, ajuster le temps d'incubation vise à optimiser les conditions pour favoriser une reconstitution efficace du cluster Fe-S. Bien que la synthèse du

cofacteur ait été démontrée, le cluster d'intérêt, [4Fe-4S], n'a pas pu être synthétisé de manière exclusive. Des ajustements du protocole doivent être envisagés pour obtenir le cluster souhaité.



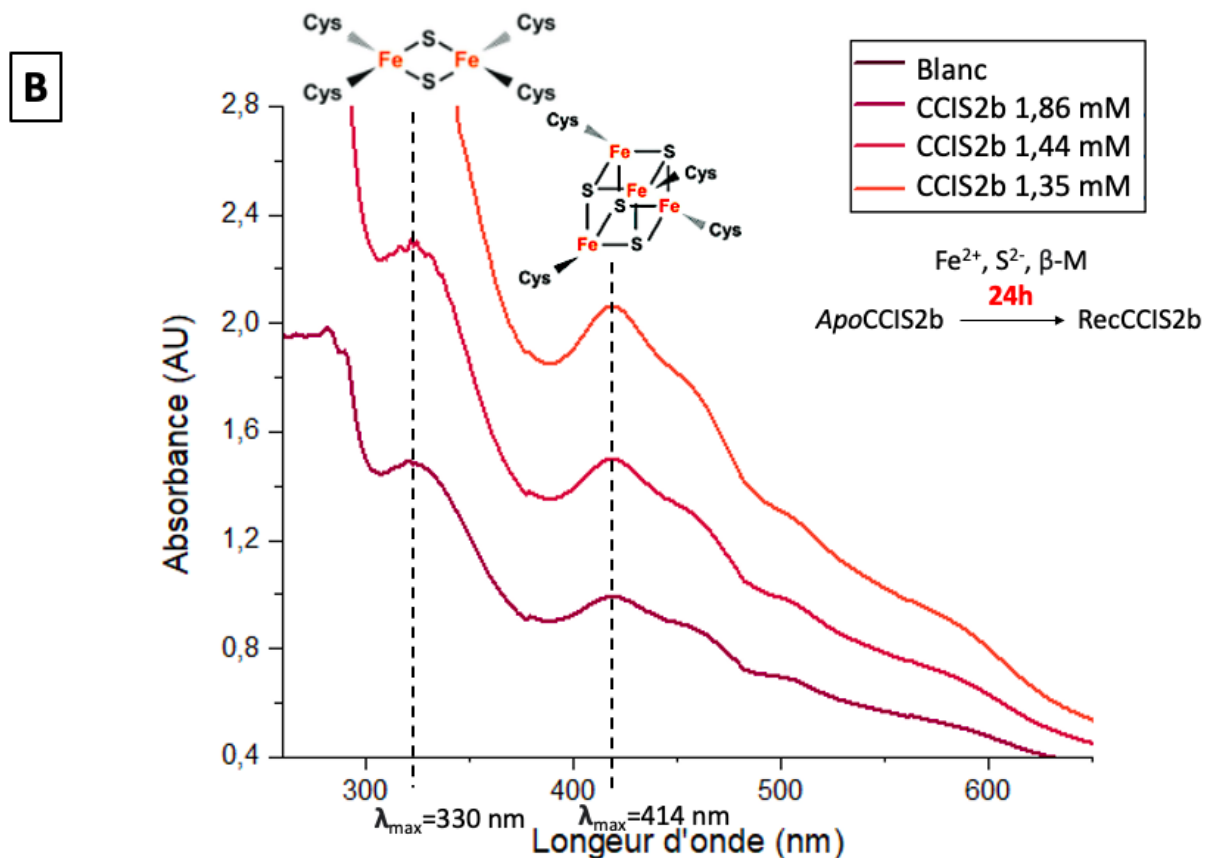


Figure 4.6 : spectre d'absorption UV-visible de la protéine rec-CCIS2b. (A) Spectre enregistré après 2 heures d'incubation. (B) Spectre enregistré après 24h d'incubation, en utilisant une cuve avec une épaisseur optique de 1 cm, dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,3.

#### 4.5. Quantification et évaluation du rendement en cluster

Le dosage du fer dans les échantillons de CCIS2b, post-purification, a été réalisé selon plusieurs préparations, comme détaillé dans la section 3.2.2 (voir tableau 3.2).

La spectroscopie UV-Visible a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage du fer (Figure 4.7), offrant ainsi une méthode fiable pour déterminer la concentration de fer au sein des échantillons de CCIS2b. Parallèlement à l'analyse du contenu en fer, le rendement en cluster des protéines reconstituées a été évalué pour quantifier l'efficacité du processus d'assemblage. À partir des données obtenues par spectroscopie UV-visible, le pourcentage en cluster a été calculé en rapportant la concentration de fer déterminée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage au coefficient d'extinction déterminé pour les rec-CCIS2b, fixé à  $21750 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Ainsi, pour une



quantité de 0,34 mM de protéine total, une quantité de 0,096 mM [4Fe-4S] a été identifiée dans CCIS2b, suggérant ainsi la présence d'approximativement 48% de [4Fe-4S] dans CCIS2b. Le reste du pourcentage correspond aux clusters [2Fe-2S] et les ions de fers n'ayant pas réagi et laissant ainsi des sites de liaison vacants ou des clusters Fe-S incomplet. Ce test ne permet pas de distinguer l'état d'oxydation du fer présent dans les échantillons protéiques puisque la totalité du fer extraite est oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$  par l'acide nitrique et réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  par l'acide ascorbique. L'usage de réactifs spécifiques qui réagissent de manière sélective avec l'état d'oxydation du fer souhaité permettrait d'améliorer la précision du test de dosage du fer dans les échantillons protéiques Fe-S.

La purification peut influencer le rendement en entraînant une perte des réactifs. Pendant la reconstitution du cluster, des réactions secondaires non désirées peuvent se produire en parallèle de la réaction principale. Ces réactions peuvent impliquer la formation d'agrégats de protéines, des complexes non spécifiques ou des réarrangements chimiques conduisant à des structures différentes que celle recherchée. Un rendement élevé, où la proportion de protéines ayant intégré leur cofacteur Fe-S de manière fonctionnelle permet de garantir une haute qualité des échantillons et une disponibilité maximale des protéines fonctionnelles pour les interactions et les réactions subséquentes, en particulier dans le cas spécifique des réactions avec NO, comme évoqué dans la section 1.6.1. Un rendement élevé est nécessaire pour maintenir la sensibilité et la spécificité des interactions NO-protéine (et donc NO-CCIS2b).

Enfin, des rendements faibles pourraient entraîner une diminution de l'efficacité de liaison et des réactions incomplètes, induisant ainsi une variabilité expérimentale et donc une répétabilité des expériences réduite. Ces données sur le rendement en cluster induit la nécessité d'affiner le protocole de reconstitution afin d'optimiser le rendement en cluster.

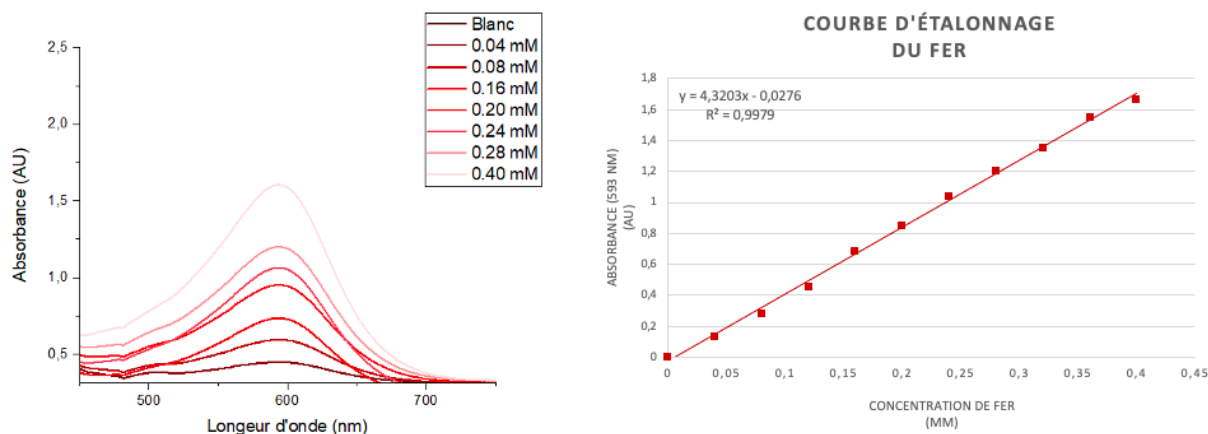


Figure 4.7 : courbe d'étalonnage du fer (0,04 mM à 0,4 mM) effectué à l'aide d'une méthode colorimétrique afin de quantifier la concentration de fer dans les échantillons de protéines reconstituées (rec-CCIS2b).

#### 4.6. Exploration de la structure de CCIS2b et de ses variantes

L'exploration de la structure de CCIS2b et des variantes de CCIS2b, résultant de mutations ciblées dans la séquence polypeptidique, émerge comme une stratégie prometteuse pour contrôler et réguler la formation du cluster Fe-S au sein de la protéine d'intérêt. Ces ajustements structurels délibérés visent à optimiser les interactions moléculaires favorisant l'assemblage des clusters, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans la manipulation contrôlée de cette voie biosynthétique. En parallèle à ces expérimentations, l'utilisation d'outils de modélisation tels qu'AlphaFold et I-TASSER offre une approche complémentaire pour prédire les impacts structuraux des mutations. Ces logiciels exploitent des méthodes de prédiction de la structure tridimensionnelle des protéines basées sur l'apprentissage profond (AlphaFold) et la modélisation par assemblage de fragments (I-TASSER), comme décrit dans la section 2.1.1. Cette combinaison d'approches expérimentales et computationnelles permet d'anticiper et de comprendre les modifications structurales induites par les variantes, de justifier les choix de mutations, et finalement, d'orienter la conception de variantes plus performantes de CCIS2b. Cette synergie entre expérimentation et modélisation constitue une méthode intégrée pour améliorer le contrôle du site de liaison des clusters Fe-S.

L'analyse des diverses structures sera divisée en plusieurs sections. Tout d'abord, nous examinerons la longueur et la forme des sites de liaison prédits des protéines Fe-S naturelles, qui serviront de référence pour cette étude. Ensuite, nous comparerons la protéine d'intérêt à ces protéines Fe-S de référence pour évaluer l'adéquation de CCIS2b en termes de structure et de sites de liaison. Cette comparaison permettra de déterminer si la protéine d'intérêt se rapproche suffisamment des protéines naturelles pour atteindre une structure idéale. Ensuite, nous examinerons et comparerons également le site de liaison et la structure des variantes conçues par mutation dans la séquence de la protéine d'intérêt. Enfin, nous évaluerons la distance inter-hélice entre les protéines de référence et la protéine d'intérêt pour déterminer la faisabilité de l'incorporation du cluster Fe-S, en tenant compte de la flexibilité, de la torsion et du déplacement latéral des hélices..

Ces analyses seront détaillées dans les sections suivantes.

#### 4.6.1. Étude des structures des protéines Fe-S naturelles

Pour explorer les différentes variantes envisageables, il est nécessaire d'évaluer les structures des protéines dotées de sites de liaison optimaux pour l'incorporation du cofacteur, afin de déterminer les longueurs idéales de ces sites pour nos futures conceptions de variantes.

Au commencement de cette analyse, nous examinons la structure du site de liaison de la protéine naturelle Fe-S de *Chromatium vinosum* (PDB : 1NEH). Cette protéine, de type HIPIP, diffère de la protéine d'intérêt, CCIS2b, une ferrédoxine faisant l'objet de la présente étude. Normalement, cette différence devrait entraîner une variation de l'environnement du cluster. Cependant, la protéine HIPIP choisie présente un état réduit  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ , électroniquement identique à l'état fondamental (oxydé) des ferrédoxines régulières. Ainsi, HIPIP-[4Fe-4S] contrôle les potentiels redox de son cluster pour stabiliser la forme oxydée  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$  en créant une « cage » supramoléculaire autour de celui-ci, composée de groupes latéraux d'acides aminés hydrophobes et aromatiques, isolant ainsi le cluster de son environnement sans impact sur les distances interatomiques. Ces caractéristiques font de 1NEH une protéine intéressante pour notre étude.

Dans sa structure la protéine 1NEH, chaque site de liaison présente des longueurs approximativement équivalentes (5,7 ; 5,7 ; 5,9 ; 5,6 angströms) et une configuration tétraédrique qui pourrait favoriser l'insertion du cluster tout en maintenant un espacement optimal pour retenir le cofacteur, permettant ainsi à la protéine d'effectuer des changements conformationnels.

De plus, en se référant à la littérature (Carter, et al., 1972), la distance moyenne entre les atomes de fer et de soufre au sein du cluster Fe-S de *Chromatium* est évaluée (tableau 4.3). Ces données nous permettent d'estimer le volume moyen du cluster Fe-S et, par conséquent, de prédire le site de liaison qui faciliterait l'incorporation du cofacteur présenté sans compromettre la stabilité de la protéine. Ces analyses préliminaires suggèrent que le cluster [4Fe-4S], référence pour cette étude, présente des longueurs moyennes d'environ 2,3 Å (figure 4.8C). Ainsi, en analysant le cluster [4Fe-4S] présenté, il est possible de suggérer que ce cluster pourrait aisément s'intégrer au site de liaison présenté dans la structure de la protéine HIPIP (figure 4.8B).

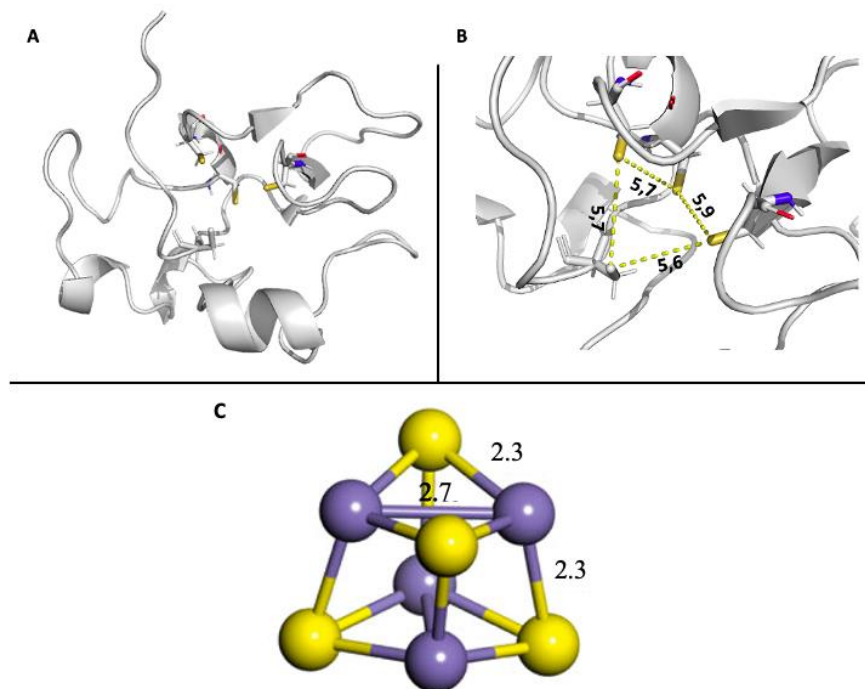


Figure 4.8 : schéma de la structure tridimensionnelle de la protéine Fe-S de *Chromatium vinosum* (toutes les mesures de distance sont exprimées en unités d'angströms). (A) Structure tridimensionnelle où les bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (B) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés jaunes avec la longueur des sites en angströms. Certaines parties du modèle ont été omises pour plus de clarté. (C) Modèle de référence d'un cluster [4Fe-4S]. En jaune sont représentés les atomes de soufre et en violet les atomes de fer. (Gao, et al., 2022)

Tableau 4.3 : valeurs moyennes des longueurs de liaison des atomes de fer et de soufre dans le cluster [4Fe-4S] de HIPIP de *Chromatium* (toutes les mesures de distance sont exprimées en unités d'angströms). Inspiré de (Carter, et al., 1972)

Atomes	Distance moyenne (Å)
Fe <sub>1</sub> -S <sub>1</sub>	2,3
Fe <sub>1</sub> -S <sub>2</sub>	2,2
Fe <sub>1</sub> -S <sub>3</sub>	2,2
Fe <sub>1</sub> -S <sub>4</sub>	2,3
Fe-Fe	2,7

Dans la phase suivante de l'étude, d'autres protéines [4Fe-4S] naturelles ont été examinées de manière similaire à la protéine 1NEH. Ces comparaisons supplémentaires enrichissent notre analyse en permettant une évaluation plus précise du site de liaison optimal du cluster [4Fe-4S], ce qui affine les modèles et améliore leurs prédictions pour la conception de variantes optimales de CCIS2b. Cette analyse comparative élargit notre compréhension des structures protéiques en identifiant les divergences entre les modèles prédictifs et les structures réelles, ce qui guide le développement des variantes futures.

En examinant neuf autres protéines Fe-S naturelles qui serviront de référence (tableau 4.4), nous remarquons que les sites de liaison au cofacteur possèdent généralement des longueurs du site de liaison approximativement similaires, ce qui a également été observé dans l'analyse de la protéine 1NEH. Les protéines comportant plusieurs clusters, telles que SuiB suivent un schéma similaire. De plus, une tendance marquée se dégage concernant les dimensions tétraédriques, comme illustré dans la figure 4.9, ce qui permet d'évaluer une gamme moyenne de distances acceptables entre les ligands (5-7 Å) pour assurer la stabilité de l'amas Fe-S. Cette gamme servira de référence pour les variantes futures de CCIS2b. Il est également notable que le cluster de référence présenté dans la figure 4.8 peut aisément intégrer ces structures tout en maintenant la stabilité de l'amas dans les protéines Fe-S naturelles.

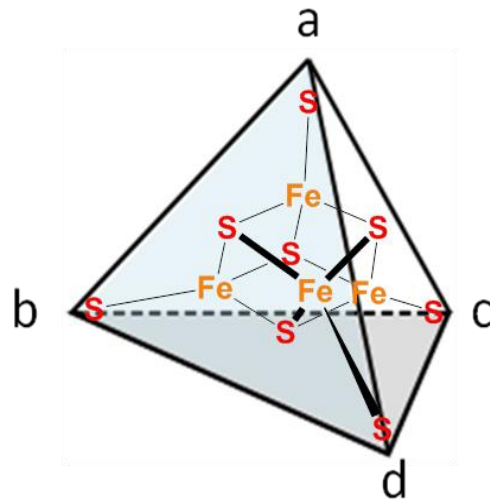


Figure 4.9 : représentation schématique du site de liaison tétraédrique pour un cluster [4Fe-4S]. Où « a », « b », « c » et « d » représentent les résidus cystéines.

Tableau 4.4 : résumé des distances entre les sites de liaisons au cofacteur de 9 protéines Fe-S naturelles (toutes les mesures de distance sont exprimées en unités d'angströms).

Protéine	Organisme	Code PDB	Distance (Å)					
			a-b	a-c	a-d	b-c	b-d	c-d
<b>HIPIP</b>	<i>Allochromatium vinosum</i>	<b>1NEH</b>	5.63	5.75	5.75	5.83	5.93	5.71
<b>NsrR</b>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<b>5N07</b>	6.0	6.2	6.4	6.3	6.3	6.1
<b>2[4Fe-4S] ferredoxin</b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>2ZVS</b>	6.6	6.02	6.6	6.67	6.24	5.73
			6.54	6.11	6.28	6.06	6.93	6.55
<b>Catabolic reductive dehalogenase NpRdhA</b>	<i>Nitratireductor pacificus pht-3B</i>	<b>6ZXU</b>	6.45	6.27	6.48	6.48	6.39	6.5
			6.4	6.58	6.63	6.67	6.1	6.49
<b>SuiB</b>	<i>Streptococcus suis</i>	<b>5V1Q</b>	6.5	6.94	6.03	6.5	6.64	6.63
			6.54	6.59	6.36	6.38	6.61	6.72
<b>[FeFe]-hydrogenase I</b>	<i>Clostridium pasteurianum</i>	<b>7QHF</b>	5.91	6.41	6.38	6.39	6.32	6.6
			6.77	6.44	6.47	6.58	6.07	6.31
			6.16	6.12	6.68	6.47	6.75	6.29
<b>epoxyqueuosine reductase</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<b>5D6S</b>	6.34	6.55	6.29	5.61	5.65	6.16
			6.16	6.55	6.21	6.54	6.06	6.08
<b>HIPIP</b>	<i>Halorhodospira halophila</i>	<b>2HIP</b>	6.42	6.02	5.92	5.65	5.55	6.21
<b>HIPIP</b>	<i>Marichromatium purpuratum</i>	<b>3HIP</b>	6.28	6.12	6.24	6.18	6.11	5.99

Ces observations suscitent des questions quant à la détermination des sites de liaison optimaux pour une protéine Fe-S *de novo*. Elles soulèvent également des pistes pour suggérer quels pourraient être ces sites de liaison idéaux, en prenant en compte divers facteurs tels que la stabilité structurale, l'accessibilité et l'affinité du site. Les protéines naturelles peuvent présenter une certaine plasticité conformationnelle dans leurs sites de liaison, leur permettant de s'adapter à différents environnements cellulaires et de répondre à des besoins spécifiques. Cette flexibilité structurale peut être un défi pour la conception de protéines *Fe-S de novo*.

#### 4.6.2. Étude de la structure de CCIS2b et des variantes de CCIS2b prédite par AlphaFold et I-TASSER

Cette section se focalise sur l'étude de la structure de CCIS2b (non naturelle) et des variantes de CCIS2b, en les comparant aux protéines naturelles Fe-S (section 4.6.1). L'objectif est d'évaluer si les conceptions mutantes de CCIS2b présentent une structure similaire à celles des protéines Fe-S naturelles, et donc si elles ont la capacité d'incorporer aisément le cluster [4Fe-4S] dans leur site de liaison au cofacteur, en se basant sur les critères optimaux observés dans les protéines de référence. Ainsi en analysant les valeurs déterminées pour les distances ligand-ligand de chaque protéines de références, notamment pour les ligands cystéines (CysS-CysS) ou les ligands non-cystéines CysS-XxxX), la distance optimale moyenne a pu être déterminé afin d'obtenir une gamme idéale se situant entre 5,7 Å et 6,9 Å.

Ces analyses sont résumés dans le tableau 4.5 et seront détaillés pour chaque conception.

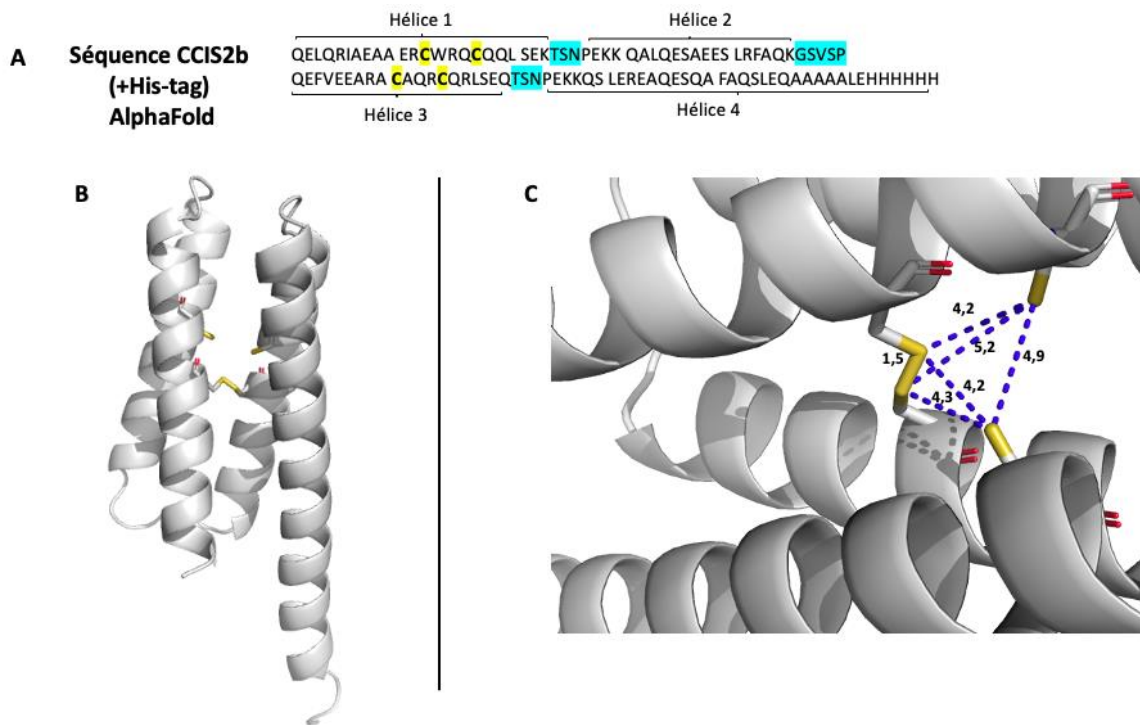
##### 4.6.2.1. Prédiction de CCIS2b

La séquence initiale de CCIS2b étiquetée d'un his-tag structurellement prédite par AlphaFold, révèle un arrangement triangulaire du site de liaison au cofacteur avec des longueurs de liaison de 4,2 ; 5,2 ; 4,9 ; 4,2 ; 4,3 et 1,5 angströms (voir figure 4.10C). Cette configuration, inhabituelle pour les protéines Fe-S, suggère dans la prédiction une oxydation de la protéine avec une liaison covalente entre deux cystéines, ce qui diffère nettement des protéines de référence. Une seconde hypothèse de cette liaison peut être également due à une fonction dans *Pymol* qui force la représentation d'une liaison lorsque la distance entre les deux atomes est suffisamment courte. Il est crucial de noter qu'AlphaFold ne fournit pas d'indications spécifiques sur les sites de liaison au cofacteur, se limitant à prédire uniquement la structure tridimensionnelle de la protéine comme mentionné dans la section 2.1.1.

En revanche, la prédiction de la même séquence par I-TASSER révèle une configuration souvent observée chez les protéines Fe-S. La divergence de forme du site de liaison au cofacteur prédite par les deux logiciels de prédiction souligne la complexité de la prédiction des structures protéiques, en particulier lorsqu'il s'agit de sites de liaison spécifiques tels que les sites de liaison au cofacteur. Une particularité d'I-TASSER est sa capacité à fournir des indications sur les sites



potentiels de liaison au cofacteur grâce à son algorithme « COFACTOR », bien que ces estimations puissent différer des sites réels. En effet, en se basant sur les travaux antérieurs de Grzyb (Grzyb J. , et al., 2010), la prédiction par I-TASSER des sites de liaison ainsi que les acides aminés impliqués dans l'insertion du cluster au sein de la protéine ne correspondent pas à ceux prédit par ce groupe de recherche. Ces divergences soulignent les limites inhérentes aux logiciels de prédiction actuels, comme mentionné dans la section 2.1.2. Le modèle prédit par I-TASSER est basé sur la bibliothèque PDB pour trouver des analogues structurellement similaires à la protéine d'intérêt, générant ainsi plusieurs structures tridimensionnelles alternatives de la protéine CCIS2b, classées par score, offrant ainsi une comparaison détaillée des structures prédites.



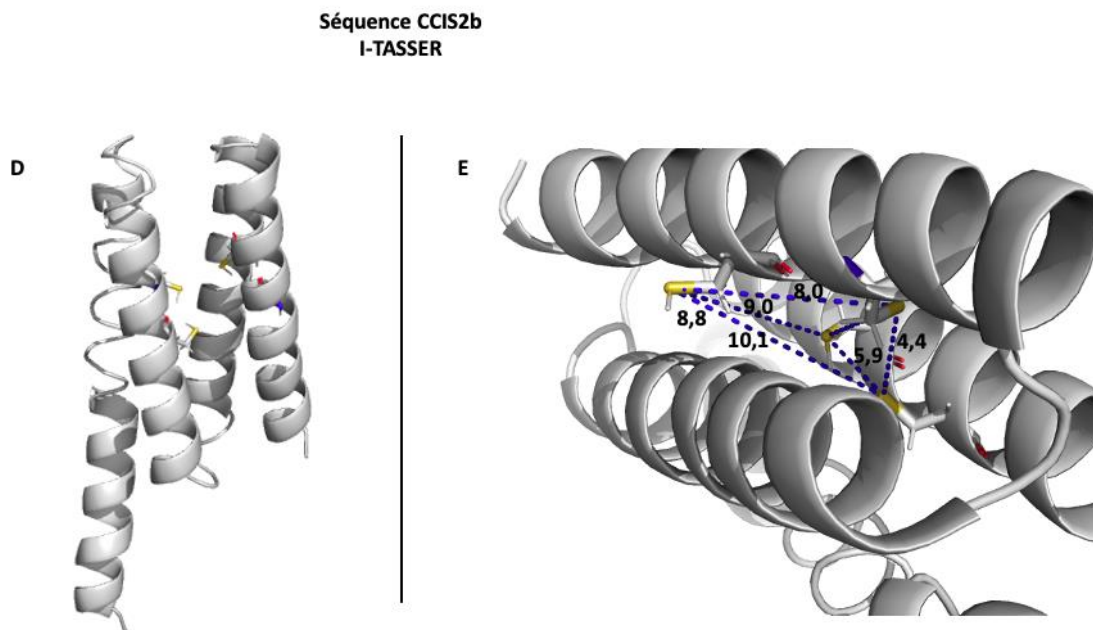


Figure 4.10 : schéma des structures tridimensionnelles de la protéine CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de CCIS2b où les sites de liaisons sont 4 cystéines représentés en jaune (C13, C17, C61 et C65) et en bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés jaunes avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de CCIS2b prédite par I-TASSER avec des représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté.

Ces données obtenus confirme le manque de fiabilité que les prédictions peuvent présenter, notamment en ce qui concerne la prédiction des sites de liaison au cofacteur des métalloprotéines, en raison des limitations algorithmiques et des connaissances incomplètes sur les interactions métal-protéine. Il convient de souligner que la difficulté de prédire avec précision la structure et les sites de liaison au cofacteur de CCIS2b provient également du fait que cette protéine est conçue *de novo*, et sa séquence n'est pas dérivée d'une protéine naturelle existante. Les protéines *de novo* représentent un défi pour les logiciels de prédiction structurelle.

#### 4.6.2.2. Mutations impliqués dans la conception des variantes de CCIS2b

Dans le cadre de l'optimisation de la conception de CCIS2b, nous avons entrepris d'explorer la structure des variantes. Comme mentionné dans la section 1.2, les clusters Fe-S peuvent être supportés par d'autres résidus que la cystéine, induisant ainsi des propriétés rédox et des effets stabilisants différents. Pour cette raison, nous avons conçu différentes variantes de CCIS2b en introduisant des mutations ciblées impliquant l'alanine et l'aspartate.

Premièrement, du point de vue des propriétés, l'alanine, en tant qu'acide aminé non polaire, contribue à la stabilité globale de la protéine en participant à des interactions hydrophobes. Bien qu'elle ne soit pas directement impliquée dans la coordination des clusters Fe-S, l'alanine peut aider à protéger le cluster en maintenant la structure tridimensionnelle de la protéine intacte. Quant à l'aspartate, il agit comme un ligand pour coordonner directement les clusters Fe-S et contribue à la stabilisation de la protéine en formant des liaisons hydrogène avec d'autres résidus (Low & Hill, 2000).

Deuxièmement, ces choix sont motivés par les rôles distincts que ces acides aminés peuvent jouer dans la réactivité à l'interface du cluster Fe-S face au NO. Comme mentionné dans l'introduction la protéine NsrR, est l'une des rares protéines naturelles connues dédiées à la détection du NO, utilisant un cluster [4Fe-4S] différencié par un site lié à trois ligands cystéines (thiolate) et un ligand aspartate (carboxylate). Cette géométrie de coordination spéciale permet à NsrR d'induire un contrôle unique sur le mécanisme de nitrosylation. Des études antérieures menées par ma directrice de recherche ont exploré trois variantes de NsrR (NsrR D8A, NsrR D8C et wt-NsrR) et ont observé des différences significatives dans le taux de réactivité initiale de la protéine envers le NO (Dodd & Le Brun, 2024). Ces différences étaient dues à des modifications du ligand carboxylate de NsrR, respectivement en cystéine et en alanine non liante. Les vitesses de réaction se sont avérées affectées par la substitution, avec D8A > wt-NsrR > D8C. De plus, un schéma différent de repliement des protéines a été observé pour le variant D8C au cours de la réaction de nitrosylation, par rapport à l'autre variant et à la protéine native. Enfin, l'utilisation de variante permet un contrôle de la réaction de nitrosylation.

Mes travaux actuels sont une continuité de cette étude et visent à explorer davantage les différences de réactivité au niveau du cluster en analysant les structures des variantes et leur effet sur la réactivité à l'interface du cluster de CCIS2b. En général, ces mutations nous permettront

d'étudier l'impact sur la structure 3D et d'évaluer les sites de liaison des variantes de CCIS2b par rapport à la protéine native, ainsi que le contrôle potentiel de la réactivité au niveau du cluster. Pour ces conceptions, nous concentrons les mutations uniquement au niveau des résidus cystéines en position 13 et 61, localisés respectivement sur l'hélice 1 l'hélice 3 de la protéine. Cette sélection est appuyée par le fait que la mutation d'une cystéine présente au niveau d'une même hélice n'induit pas de changement significatif et n'est donc par conséquent pas pertinent pour cette étude qui vise à étudier l'incidence des mutations qui induirait des changements plus significatif. Les logiciels de prédiction utilisés ne faisant pas de différence significative sur la mutation des cystéines au sein d'une même hélice.

#### 4.6.2.2.1. Prédiction de C13D CCIS2b : mutation de la cystéine 13 par aspartate

Dans notre première conception, la variante de CCIS2b présente un site de liaison différent de la prédiction structurelle des protéines de référence. La mutation de la cystéine 13 par une aspartate (figure 4.11A) au sein de la séquence de CCIS2b représente une modification notable avec des implications potentiellement importantes pour la coordination optimale du cluster Fe-S par la protéine.

La prédiction par AlphaFold révèle une géométrie de coordination du cluster rectangulaire (4,0 ; 19,9 ; 6,9 ; 23,3 ; 20,8 ; 23,0 angströms) (figure 4.11C). Cet arrangement n'est pas fréquent dans les protéines Fe-S et le site de liaison est notablement éloigné entre les quatre hélices alpha par rapport à la configuration d'origine de la protéine, entraînant une diminution des inter-hélices. Ces observations suggèrent que la distance peut affaiblir les interactions entre les résidus et le cluster, compromettant la formation optimale de ce dernier.

La prédiction par I-TASSER quant à elle présente une configuration du site de liaison tétraédrique (4,6 ; 7,9 ; 8,1 ; 8,6 ; 7,9 ; 3,6 angströms) (figure 4.11E) et une taille des hélices alpha plus courte avec une perte de l'hélice dans certaine région par rapport à la protéine CCIS2b de départ. Cette particularité pourrait entraver la disposition spatiale des résidus, compromettant ainsi la capacité du site de liaison à coordonner efficacement le cluster. Contrairement à cette dernière, I-TASSER prédit un site de liaison plus conforme à la structure initiale, suggérant ainsi une meilleure adéquation avec la configuration native de la protéine.

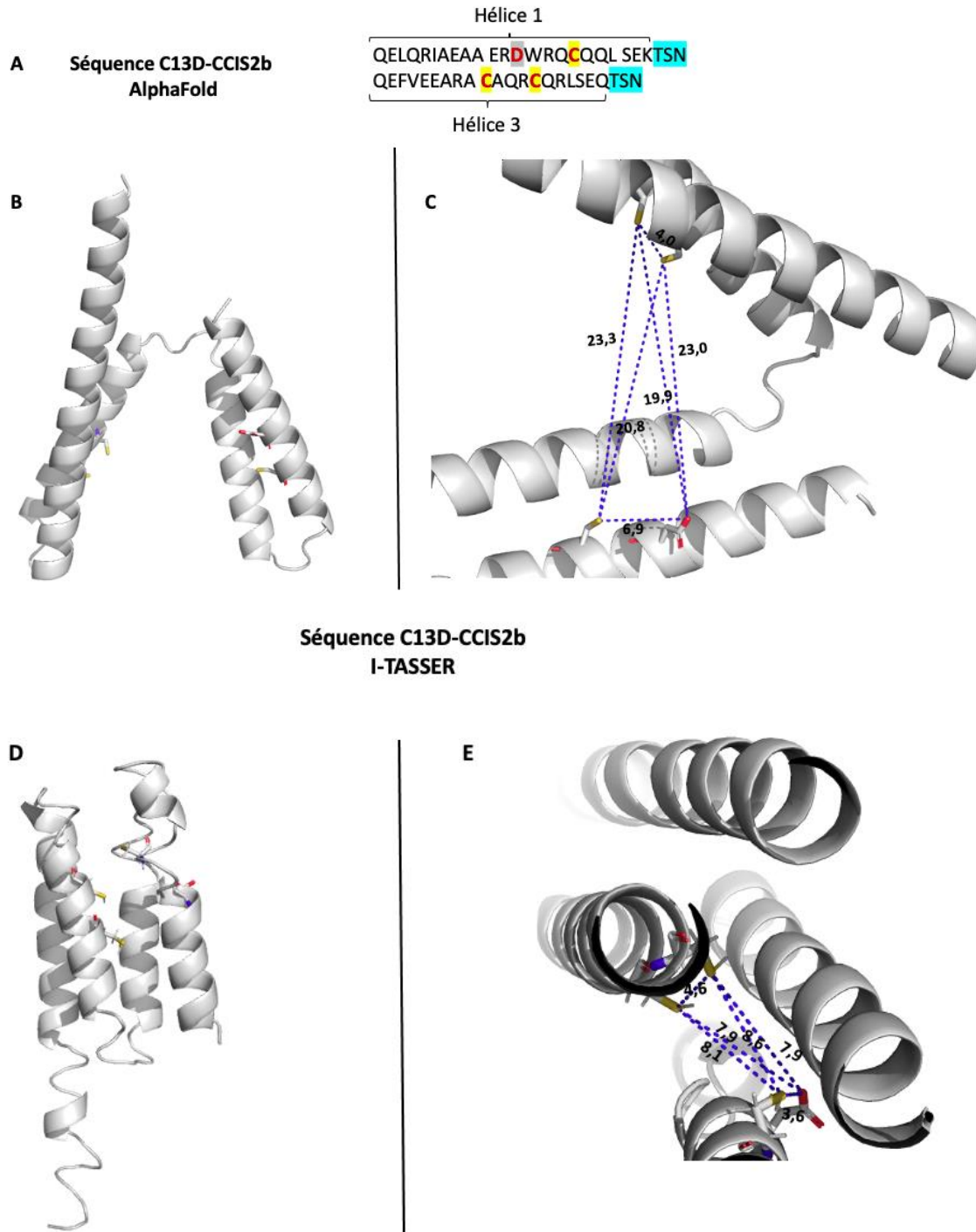


Figure 4.11 : schéma des structures tridimensionnelles de C13D CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de C13D CCIS2b où les sites de liaisons sont 3 cystéines représentés en jaune (C17, C57 et C61) et en gris une aspartate remplace la cystéine 13 de départ. En bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de C13D CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de

liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de C13D CCIS2b prédite par I-TASSER avec des représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté.

#### 4.6.2.2.2. Prédiction de C61D CCIS2b : mutation cystéine 61 par aspartate

Dans la deuxième prédiction, une autre mutation est envisagée, impliquant cette fois la cystéine 61 de la séquence de la protéine (figure 4.12A). Cette mutation représente une modification moins significative de la structure par rapport à la première mutation.

L'analyse par AlphaFold révèle que cette nouvelle mutation conduit à un site de liaison au cofacteur plus conforme à la prédiction structurelle aux protéines de référence ( (figure 4.12C), suggérant ainsi une préservation de la stabilité et des interactions. Ceci dit, en se basant sur le cluster de référence élaboré dans la figure 4.8C, il est possible que le site de liaison au cofacteur soit exigü pour laisser entrer de manière aisée le cluster. Comparativement à la conception C13D CCIS2b, le remplacement de la cystéine 61 pour la prédiction par AlphaFold entraîne des modifications moins prononcées..

La prédiction par I-TASSER pour cette mutation est similaire à la première prédiction par I-TASSER, mais le site de liaison au cofacteur est de taille un peu plus important (8,1 ; 9,8; 5,2 angströms) (figure 4.12E). Ici, la taille des hélices alpha sont conservés. Cette variation pourrait éventuellement faciliter l'insertion du cofacteur au vu de la taille du site de liaison. Cependant, seules 3 liaisons sont représentés puisque l'orientation du ligand cystéine dans cette variante n'est pas appropriée pour la liaison. En effet, le squelette de la protéine se trouve entre la cystéine et tout ligand Fe-S potentiel. Ce qui va impacter fortement la stabilité du site de liaison.

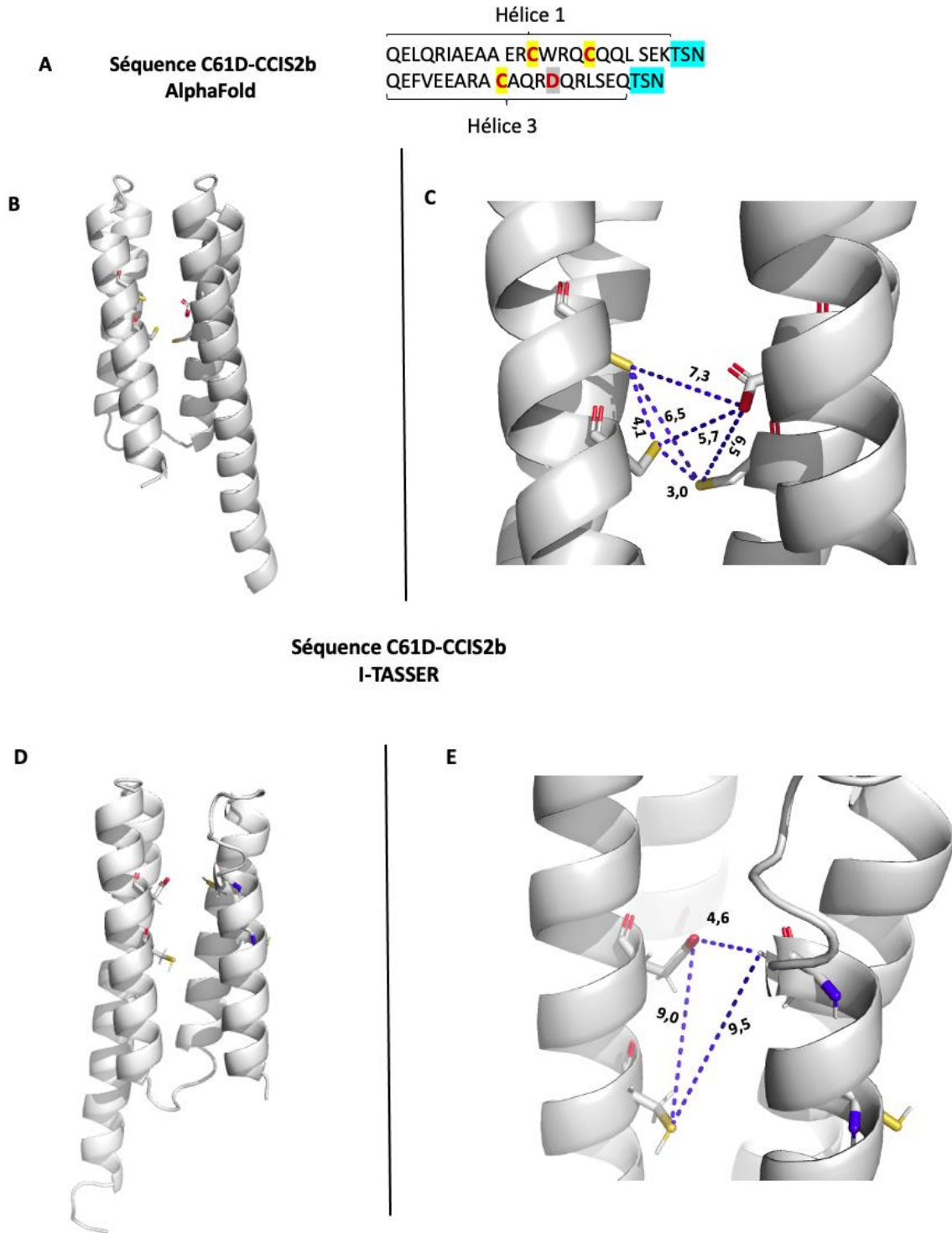


Figure 4. 12 : schéma des structures tridimensionnelles de C61D CCIS2b 2prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de C61D CCIS2b où les sites de liaisons sont 3 cystéines représentés en jaune (C13, C17, C57) et en gris une aspartate remplace la cystéine 61 de départ. En bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de C61D CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de

liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de C61D CCIS2b prédite par I-TASSER avec des représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté.

#### 4.6.2.2.3. Prédiction de C13A CCIS2b : mutation cystéine 13 par alanine

Dans la troisième prédiction, la substitution d'une cystéine par une alanine dans la séquence de CCIS2b entraîne également des modifications au niveau de la structure et des interactions moléculaires. L'alanine est souvent choisie comme mutation intéressante lors de la conception de variantes de CCIS2b en raison de ses caractéristiques particulières. Dans cette évaluation, il est clair que l'alanine n'est pas en mesure de lier le fer et il est uniquement utilisé pour quantifier l'orientation de cet acide aminé.

Dans la prédiction par AlphaFold, le site de liaison présente une configuration complexe avec un site de liaison étroit (4,0 ; 5,8 ; 8,3 ; 5,7 ; 5,4 ; 4,9 angströms) (figure 4.13C). Cette complexité suggère une possible insertion plus délicate du cofacteur dans le site de liaison.

D'autre part, la séquence prédite par I-TASSER présente une structure du site de liaison similaire (9,0 ; 10,6 ; 9,5 ; 9,7 ; 6,4 ; 6,2 angströms) (figure 4.13E) à celle prédite pour la C61D CCIS2b par le même logiciel (figure 4.12E). La taille des quatre hélices alpha sont conservés et où le site de liaison laisse place à une éventuelle incorporation du cofacteur.



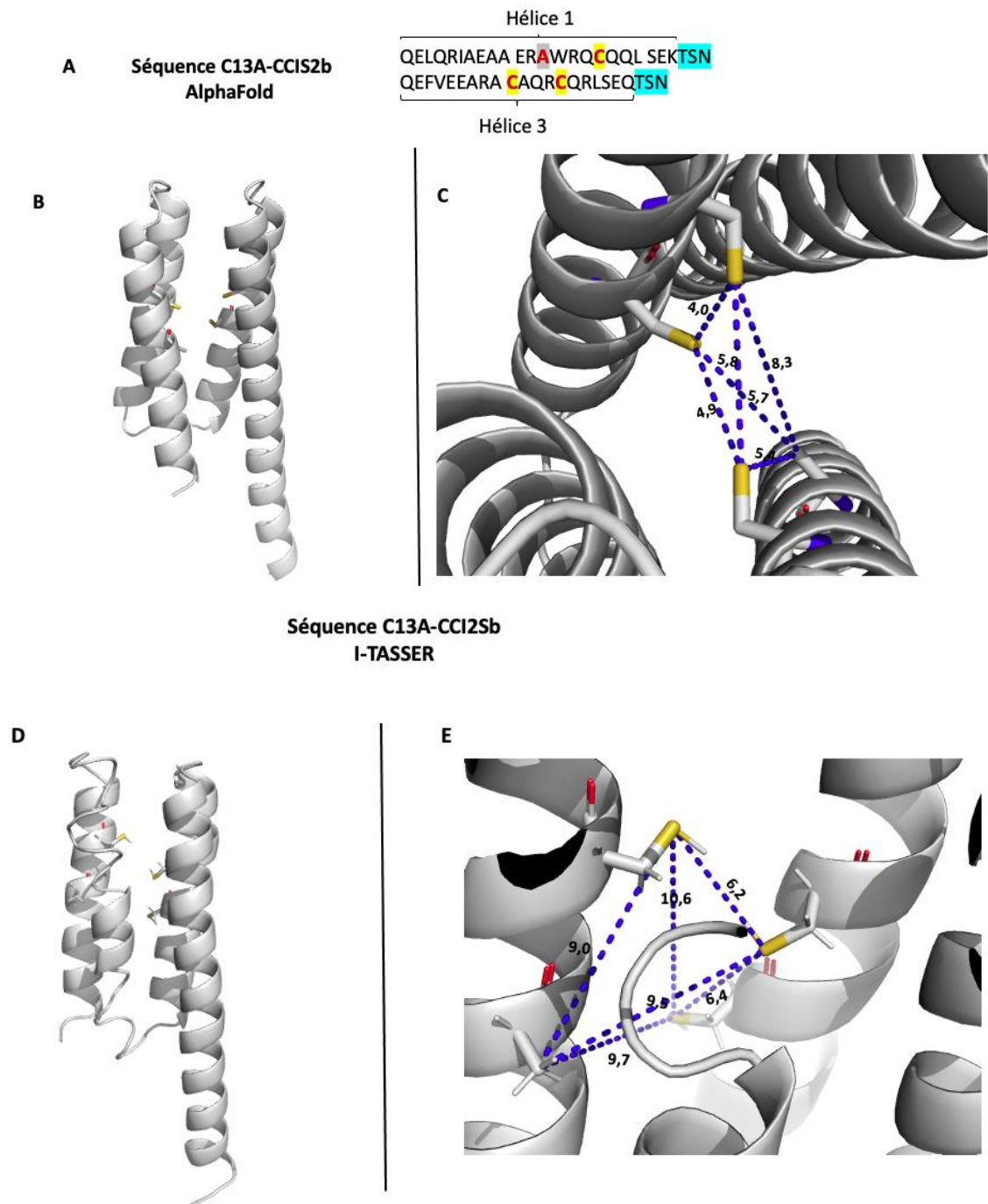


Figure 4.13 : schéma des structures tridimensionnelles de C13A CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de C13A CCIS2b où les sites de liaisons sont 3 cystéines représentés en jaune (C17, C57, C61) et en gris une alanine remplace la cystéine 13 de départ. En bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de C13A CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de C13A CCIS2b prédite par I-TASSER avec des bâtonnets représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de

liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté.

#### 4.6.2.2.4. Prédiction de C61A CCIS2b : mutation cystéine 61 par alanine

Dans la dernière prédiction, par AlphaFold, la mutation de la cystéine 61 par l'alanine, présente pour la structure du site de liaison de type pyramidale (4,0 ; 4,2 ; 5,2 ; 6,6 ; 5,4 ; 5,2 angströms) (figure 4.14C). Comme pour la mutation C13A CCIS2b, dans cette évaluation, il est également clair que l'alanine n'est pas en mesure de lier le fer et il est uniquement utilisé pour quantifier l'orientation de cet acide aminé. Contrairement à la mutation de la cystéine 13, qui se trouve sur l'hélice 1, la cystéine 61 est située sur l'hélice 3. Cette localisation différente entraîne des effets distincts sur la structure tridimensionnelle de la protéine. L'observation selon laquelle la mutation de la cystéine 61 en alanine conduit à un site de liaison plus proche de la structure originale que la mutation de la cystéine 13 suggère que cette substitution peut maintenir une stabilité structurelle plus étroite et des interactions moléculaires plus préservées. Cette proximité avec la structure d'origine peut avoir des implications intéressantes pour la fonctionnalité et les propriétés de CCIS2b, soulignant ainsi l'importance de l'emplacement spécifique des mutations dans la conception de variants protéiques.

Dans la prédiction par I-TASSER, la structure du site de liaison est similaire à C61D CCIS2b et C13A CCIS2b (5,2 ; 8,1 ; 9,8) (figure 4.14E) mais la taille des hélices alpha est modifiée, où les quatre hélices alpha présente une taille plus courte par rapport à la protéine de départ. De plus, seules 3 liaisons sont représentés puisque l'orientation du ligand cystéine dans cette variante n'est pas appropriée pour la liaison. En effet, le squelette de la protéine se trouve entre l'aspartate et tout ligand Fe-S potentiel. Ce qui pourrait impacter la stabilité du site.

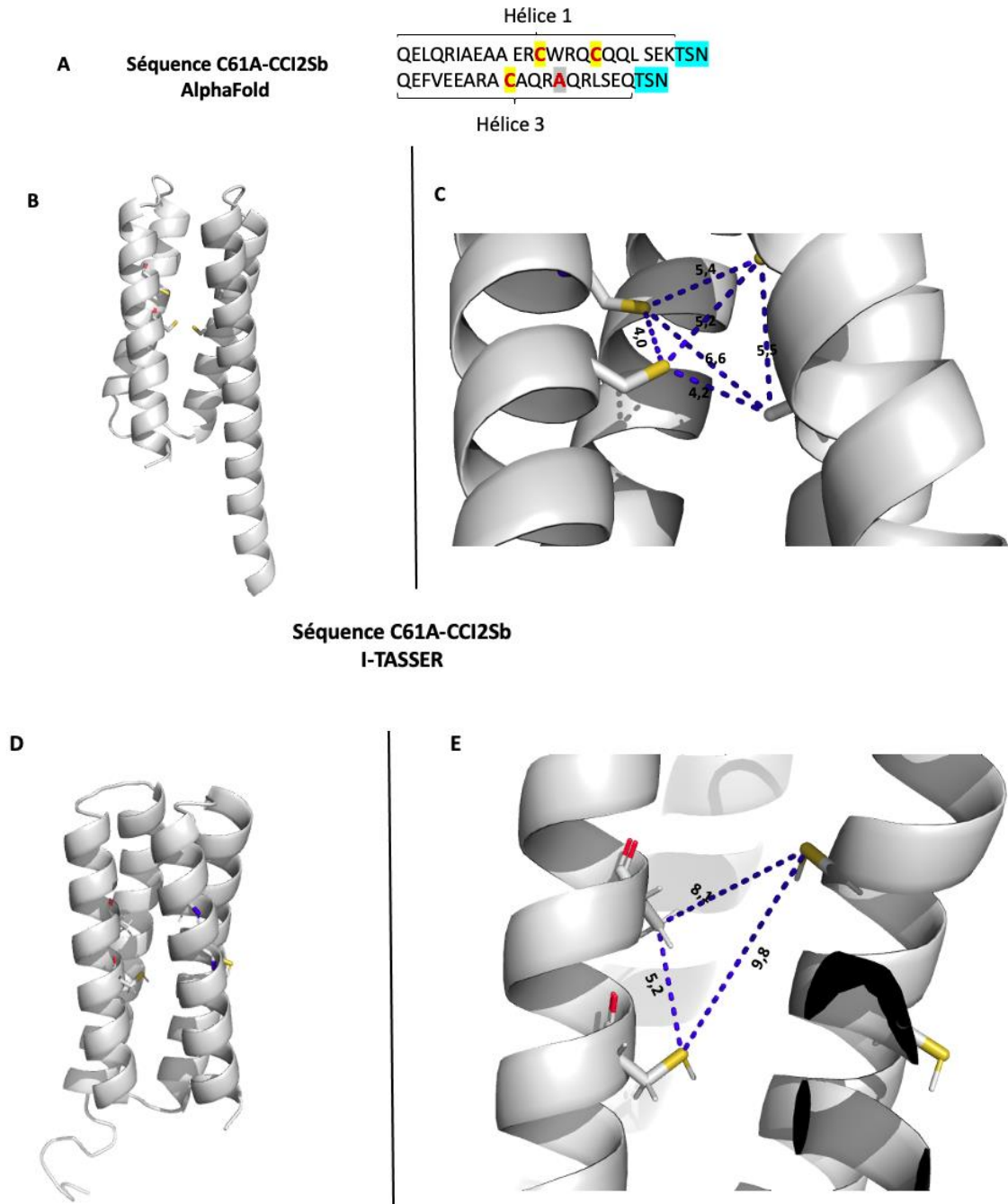


Figure 4.14 : schéma des structures tridimensionnelles de C61A CCIS2b prédite par AlphaFold (B-C) et I-TASSER (D-E). (A) Séquence de C61A CCIS2b où les sites de liaisons sont 3 cystéines représentés en jaune (C13, C17, C57) et en gris une alanine remplace la cystéine 61 de départ. En bleu sont représentés les boucles de connexions entre les différentes hélices alpha. (B) Structure tridimensionnelle de C61A CCIS2b prédite par AlphaFold avec des bâtonnets

représentant les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (C) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par AlphaFold. (D) Structure tridimensionnelle de C61A CCIS2b prédite par I-TASSER avec des représentants les acides aminés impliqués dans le site de liaison au cofacteur. (E) Les sites de liaisons sont représentés en lignes pointillés bleus avec la longueur des sites en angströms par I-TASSER. Certaines parties des modèles ont été omis pour plus de clarté.

L'étude des distances entre les atomes chélateurs des résidus du ligand nous a permis de mieux comprendre la complexité de la formation d'un site optimal de liaison. Parmi les variantes conçues, il est apparu après nos observation que certaines présentaient des arrangements structuraux en dehors de la plage idéale estimée, ce qui suggère des défis potentiels pour leur efficacité. De plus, certaines variantes (C61D CCIS2b et C61A CCISb) ne possédaient pas une orientation de leurs résidus optimale pour la possibilité de création d'un site de liaison. Ces analyses confirment la complexité de mettre en œuvre une protéine Fe-S *de novo* fonctionnelle.

Tableau 4.5 : résumé des distances ligand-ligand (en angströms) des différentes structures Fe-S (protéines naturelles et variantes de CCIS2b).

Code PDB	Distance ligand-ligand (Å)						Distance idéale (Å)	
	a-b	a-c	a-d	b-c	b-d	c-d	✓	✗
<b>1NEH</b>	5,63	5,75	5,5	5,83	5,93	5,71	5,7-6,9	
<b>5N07</b>	6,01	6,24	6,42	6,34	6,35	6,12		
<b>2ZVS</b>	6,60	6,02	6,62	6,67	6,24	5,73		
<b>6ZXU</b>	6,54	6,11	6,28	6,06	6,93	6,55		
<b>5V1Q</b>	6,45	6,27	6,48	6,48	6,39	6,55		
<b>7QHF</b>	6,77	6,44	6,47	6,58	6,07	6,31		
<b>5D6S</b>	6,34	6,55	6,29	5,61	5,65	6,16		
<b>2HIP</b>	6,42	6,02	5,92	5,65	5,55	6,21		
<b>3HIP</b>	6,28	6,12	6,24	6,18	6,11	5,99		
<b>Variantes</b>	<b>AlphaFold</b>						<b>Similarité</b>	
C13D CCIS2b	23,3	20,8	19,9	20,8	6,9	4,0	✗	
C61D CCIS2b	7,3	6,5	5,7	4,1	6,5	3,0	✓	
C13A CCIS2b	4,0	5,8	5,7	5,4	4,9	8,3	✗	
C61A CCIS2b	4,0	5,4	5,2	5,5	4,2	6,6	✓	
<b>Variantes</b>	<b>I-TASSER</b>							
C13D CCIS2b	4,6	8,6	3,6	7,9	8,1	7,9	✗	
C61D CCIS2b	4,6	9,0	9,5	-	-	-	✗	
C13A CCIS2b	6,2	10,6	6,4	9,5	9,7	9,0	✓	
C61A CCIS2b	5,2	9,8	8,1	-	-	-	✗	

Toutes ces comparaisons mettent en lumière les faiblesses des logiciels de prédiction dans la prédiction structurale de protéine Fe-S *de novo*. Pour une même variante les deux logiciels prédisent des structures protéiques distinctes ainsi que des sites de liaisons au cofacteur également différent. Pour des variantes optimales, l'importance de concevoir des sites de liaison au cofacteur qui se rapprochent structurellement de ceux des protéines naturelles Fe-S est crucial. En observant les protéines naturelles utilisés comme référence dans cette étude, on s'aperçoit qu'elles présentent des caractéristiques spécifiques, telles que des distances et des arrangements atomiques particuliers, on peut conclure que ces caractéristiques sont le résultat d'une évolution et d'une adaptation pour assurer une liaison efficace et stable avec le cofacteur. Ainsi, si l'objectif est de concevoir des protéines Fe-S *de novo* optimales, il est logique de s'efforcer de reproduire ces caractéristiques dans la conception des sites de liaison au cofacteur. Ainsi, la protéine CCIS2b, ainsi que les variantes de cette protéine mise en œuvre doit viser à reproduire ces caractéristiques pour obtenir des performances optimales.

#### 4.6.3. Comparaison des distances inter-hélices dans les structures naturelles Fe-S et les variantes de CCIS2b

En plus de l'étude détaillée de la structure du site de liaison, l'analyse de la distance inter-hélices joue un rôle crucial dans l'insertion et la stabilité du cluster Fe-S. La disposition spatiale des hélices peut soit faciliter soit entraver l'incorporation du cluster Fe-S, offrant ainsi à la protéine une certaine flexibilité conformationnelle (rotation, flexion, déplacements latéraux), ce qui favoriserait une insertion aisée du cluster. Cette analyse permettrait d'identifier les configurations optimales favorisant l'insertion et la stabilité du cluster Fe-S.

Il a été choisi de mesurer l'aspect de la distance approximative entre les hélices en plus des distances entre les atomes chélateurs sur les résidus du ligand (section 4.6.1) , car cela nous permet d'obtenir une vision plus complète de la structure la plus optimale. Les mesures de distance entre les hélices sont importantes car elles nous aident à prendre en compte une partie de la flexibilité intrinsèque à la protéine, qui peut ne pas être immédiatement évidente lorsque l'on se concentre uniquement sur les distances entre les atomes chélateurs sur les résidus du ligand. En effet, la distance entre les hélices peut varier en fonction de la conformation de la protéine et de

sa capacité à se plier ou à se tordre pour interagir avec d'autres molécules ou protéines. En incluant la mesure de la distance entre les hélices, nous sommes en mesure de mieux comprendre comment la flexibilité de la protéine peut influencer sa capacité à se lier au cofacteur et à remplir son rôle biologique. Ces informations complémentaires nous aident à obtenir une analyse plus précise de la structure optimale de la protéine, ce qui est essentiel pour une conception efficace de variantes de protéines et pour comprendre leur comportement dans des environnements biologiques complexes.

Pour déterminer la plage idéale de distance entre les hélices, nous nous sommes appuyés sur les structures naturelles de Fe-S comme référence dans notre étude. Cette approche vise à établir des critères plus précis pour concevoir des protéines contenant des clusters Fe-S, en vue d'optimiser leur efficacité et leur stabilité. Nous avons examiné neuf structures et synthétisé les distances entre les hélices dans le tableau 4.6. Cette analyse nous a permis de définir une plage optimale moyenne pour la distance inter-hélices, située entre 8 et 11 Å. Il convient de noter qu'un nombre limité de protéines Fe-S adoptent une structure en hélice alpha (comme la structure de CCIS2b). Ainsi, les protéines de référence ne possédant pas d'hélice alpha n'ont pas été soumises à cette évaluation. Pour garantir une évaluation solide, des protéines naturelles avec des hélices alpha ont été ajoutées à ces analyses. Ces observations fournissent une base solide pour orienter la conception de nouvelles protéines contenant des clusters Fe-S, en assurant une distance inter-hélice adaptée pour une insertion efficace et une stabilité optimale du cluster.

Tableau 4.6 : résumé des distances inter-hélices (en angströms) des différentes structures Fe-S (protéines naturelles et variantes de CCIS2b).

Code PDB	Distance inter-hélices (Å)				Dimensions acceptables pour l'incorporation du [4Fe-4S] stable	
	Hel <sub>1</sub> -Hel <sub>2</sub>	Hel <sub>2</sub> -Hel <sub>3</sub>	Hel <sub>3</sub> -Hel <sub>4</sub>	Hel <sub>4</sub> -Hel <sub>1</sub>	✓	✗
<b>1NEH</b>	-	-	-	-		
<b>5N07</b>	10,1	11,6	14,7	12,2		
<b>2ZVS</b>	-	-	-	-		
<b>6ZXU</b>	7,6	13,3	13,5	9,3		
<b>5V1Q</b>	9,4	10,4	12,1	11,7		
<b>7QHF</b>	10,1	8,3	12,4	6,6		
<b>5D6S</b>	5,7	8,7	6,4	10,2		
<b>2HIP</b>	-	-	-	-		
<b>3HIP</b>	-	-	-	-		
<b>1P59</b>	10,3	9,3	10,6	8,4		
<b>1KEA</b>	8,1	10,0	5,7	8,1		
<b>1WEF</b>	8,2	8,9	12,7	11,3		
<b>2ABK</b>	6,2	7,7	12,2	9,8		
<b>Variantes</b>	<b>AlphaFold</b>					
C13D CCIS2b	3,9	15,9	5,7	25,7		
C61D CCIS2b	7,5	8,7	4,8	8,8		
C13A CCIS2b	5,3	8,7	6,0	12,0		
C61A CCIS2b	4,3	11,5	7,6	8,6		
	<b>I-TASSER</b>					
C13D CCIS2b	7,8	11,1	5,0	11,0		
C61D CCIS2b	6,7	10,9	8,1	7,7		
C13A CCIS2b	6,9	8,2	7,8	12,0		
C61A CCIS2b	5,7	9,6	5,3	12,1		

Les données obtenues excluent les conceptions C13D, C13A et C61A CCIS2b prédites par AlphaFold, ainsi que C61A prédite par I-TASSER car elles se situent en dehors de la plage acceptable évaluée. Les conceptions prédites par I-TASSER sont en majorité dans la plage acceptable estimée. Il faut prendre en compte que les protéines peuvent adopter une diversité de conformations, ainsi la prédiction précise reste un défi. Cette divergence met en évidence les défis présent dans la conception de protéines Fe-S *de novo*, où la fiabilité des prédictions

logicielles et la complexité inhérente des structures des protéines Fe-S représentent des obstacles majeurs. Il est essentiel de reconnaître que malgré les avancées dans les outils de prédiction, les écarts entre les résultats obtenus par différents logiciels soulignent la nécessité de développer des approches plus fiables et précises pour la conception de protéines Fe-S *de novo*. Ainsi, des validations et analyses expérimentales (cristallographie à rayons X, RMN, spectroscopie à dichroïsme circulaire ou spectroscopie infrarouge) doivent confirmer ou infirmer la fiabilité et la qualité des prédictions et la structure 3D.

La RMN permet d'observer la structure moléculaire en solution, reflétant ainsi le comportement des protéines dans leur environnement biologique, elle est utile à condition que la métalloprotéine soit diamagnétique. Même si une structure complète n'est pas déterminée, elle peut être utilisée pour montrer les acides aminés impliqués dans les hélices alpha. Ainsi, elle fournit des données sur la conformation tridimensionnelle des protéines. Les spectres RMN expérimentaux peuvent être comparés aux spectres prédits à partir des modèles de structure théorique pour valider et affiner la structure des variantes proposées.

La cristallographie aux rayons X permet de déterminer la structure des protéines en analysant les motifs de diffraction des rayons X diffractés par les atomes du cristal. Cette technique fournit des structures protéiques à résolution atomique et est considérée comme une référence de qualité pour valider les modèles théoriques. Les structures protéiques permettent d'observer la disposition des atomes dans la protéine, ce qui aide à confirmer la précision des modèles de prédiction théoriques.

La spectroscopie à dichroïsme circulaire est une technique sensible à la structure secondaire des protéines, permet de détecter les changements dans la répartition des hélices alpha, des feuillets bêta et d'autres éléments de structure secondaire. Elle est particulièrement utile pour étudier les changements conformationnels des protéines en réponse à des stimuli externes ou à des interactions avec d'autres molécules.

La spectroscopie infrarouge analyse l'absorption des vibrations moléculaires spécifiques des liaisons chimiques dans une protéine. En identifiant les groupes fonctionnels présents dans la molécule, elle fournit des informations sur sa composition chimique et sa structure. Elle peut détecter les changements de conformation des protéines ainsi que leurs interactions avec d'autres molécules biologiques, comme les ligands.



En combinant toutes ces techniques expérimentales avec les prédictions théoriques générées par les logiciels de prédiction, il est possible d'affiner et valider la structure des protéines avec une haute précision. Cette approche permettra une meilleure compréhension plus complète et plus fiable de la structure de CCIS2b et des variantes conçu.

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette étude était d'explorer la réactivité à l'interface du cluster Fe-S. Pour ce faire, nous avons entrepris la production de la protéine CCIS2b selon deux méthodes, *in vivo* et *in vitro*. Malheureusement, malgré nos efforts, la méthode *in vivo* s'est avérée non concluante. Quant à la méthode *in vitro*, bien que la protéine CCIS2b ait pu être produite, des problèmes de stabilité du cluster formé ont entravé l'obtention d'un rendement optimal lors de la formation du cluster [4Fe-4S].

Face à ces défis, la conception et la prédiction de variantes de CCIS2b a été entreprise dans le but d'explorer la conception la plus optimale possible. En se concentrant sur la coordination efficace des clusters Fe-S, une analyse approfondie de la structure des sites de liaison et de la distance inter-hélices a été menée, identifiant ainsi des critères essentiels pour optimiser l'insertion et la stabilité de ces clusters dans la protéine. Pour atteindre cet objectif, des variantes de la protéine CCIS2b ont été conçues en introduisant des mutations au sein de la séquence polypeptidique. L'optimalité de ces conceptions a été évalué l'aide de deux logiciels de prédiction. Cependant, les résultats obtenus ont révélé une faiblesse dans les prédictions des conceptions, mettant en lumière la difficulté d'évaluation des protéines Fe-S *de novo* conçu. Les résultats ont révélé l'importance cruciale de la disposition spatiale des hélices alpha et de la conformité du site de liaison pour garantir une coordination adéquate du cluster Fe-S. En exploitant des données structurales provenant de structures analogues dans la PDB, nous avons pu définir une plage idéale pour la distance inter-hélice, offrant ainsi des directives pour la conception de protéines contenant des clusters Fe-S. Malgré ces défis, cette étude a posé des bases solides pour de futures recherches dans le domaine de la conception de protéines Fe-S *de novo*. Les résultats obtenus mettent en évidence la nécessité de développer des méthodes de prédiction plus fiables et précises, ainsi que d'approches expérimentales complémentaires (RMN, cristallographie aux rayons X et spectroscopie à dichroïsme circulaire et infrarouge) pour surmonter les obstacles rencontrés lors de la conception et prédiction de protéines Fe-S *de novo*.

À court terme, ce projet pourrait bénéficier de perspectives telles que l'optimisation des méthodes de production de la protéine CCIS2b. En affinant les méthodes de production *in vitro* et

*in vivo*, il serait possible d'améliorer le rendement et la stabilité du cluster Fe-S formé, ouvrant ainsi la voie à des expériences plus robustes et reproductibles. De plus, la validation expérimentale des variantes de protéines CCIS2b conçues pourrait être entreprise pour confirmer leur capacité à coordonner efficacement les clusters Fe-S. Parallèlement, l'exploration de nouveaux outils de modélisation moléculaire et de prédiction pourrait être envisagée pour améliorer la fiabilité des prédictions des conceptions de protéines Fe-S *de novo*.

À long terme, les perspectives pourraient inclure le développement de protéines Fe-S *de novo* sur mesure. En utilisant les connaissances acquises dans ce projet, il serait possible de concevoir des protéines Fe-S avec des propriétés fonctionnelles spécifiques, adaptées à des applications biotechnologiques précises telles la libération de molécules de signalisation gazeuses pertinentes . Ces protéines optimisées pourraient également être utilisées dans une gamme d'applications médicales afin de lutter contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques en ciblant le système bactérien de réponse au NO.

## BIBLIOGRAPHIE

- 8959j. (2022, Décembre 5). 4Fe-4S Oxidation States of Fe<sup>3+</sup>. Récupéré sur Wikipedia: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:4Fe-4S\\_Oxidation\\_States\\_of\\_Fe3%2B.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:4Fe-4S_Oxidation_States_of_Fe3%2B.png)
- Agarwal, A., Li, D., & Cowan, J. A. (1995). Role of aromatic residues in stabilization of the [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] cluster in high-potential iron proteins (HiPIPs): physical characterization and stability studies of Tyr-19 mutants of Chromatium vinosum HiPIP. *Proceedings of the national academy of sciences*, 92 (21), 9440-9444.
- Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., & Rovira, C. (2009 ). The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *131* (33 ).
- Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S., & Leibold, E. A. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9), 1468–1483.
- Anderson, J. L., Armstrong, C. T., Kodali, G., Lichtenstein, B. R., Watkins, D. W., Mancini, J. A., . . . Dutton, P. L. (2014). Constructing a man-made c-type cytochrome maquette in vivo: electron transfer, oxygen transport and conversion to a photoactive light harvesting maquette. *Chemical science*, 5(2), 507-514 .
- Aussignargues, C., Pandelia, M.-E., Sutter, M., Plegaria, J. S., Zarzycki, J., Turmo, A., . . . Kerfeld, C. A. (2016 ). Structure and Function of a Bacterial Microcompartment Shell Protein Engineered to Bind a [4Fe-4S] Cluster. *Journal of the American Chemical Society* , 138 (16), 5262-5270.
- Ayala-Castro, C., Saini, A., & Outten, F. (2008). Fe-S Cluster Assembly Pathways in Bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* , 72, 110.
- Bates, D. M., Popescu, C. V., Khoroshilova, N., Vogt, K., Beinert, H., Münck, E., & Kiley, P. J. (2000). Substitution of leucine 28 with histidine in the Escherichia coli transcription factor FNR results in increased stability of the [4Fe-4S](2+) cluster to oxygen. *The Journal of biological chemistry*, 275(9), 6234–6240.
- Beinert, H., & Lee, W. (1961). Evidence for a new type of iron containing electron carrier in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 5, 40-45.
- Beinert, H., Griffiths, D., & Wharton, D. (1962). Properties of the Copper Associated with Cytochrome Oxidase as Studied by Paramagnetic. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 2337-2346.
- Beinert, H., Holm , R., & Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science (New York, N.Y.)*, 653–659.

- Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J. T., Jarrett, J. T., & Drennan, C. (2004). Crystal Structure of Biotin Synthase, an S-Adenosylmethionine-Dependent Radical Enzyme. *Science*, 303(5654), 76-79.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., . . . Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank,. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242.
- Blanc, B., Gerez, C., & Ollagnier de Choudens, S. (2015). Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems: Biochemistry of the bacterial ISC system,. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(6).
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., . . . Schäfer, F. (2009). Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. *Methods in Enzymology*, 27, 439-473.
- Bobrik, M. A., Jr, L. Q., & Holm, R. H. (1974). Synthetic analogs of the active sites of iron-sulfur proteins. IV. Ligand substitution reactions of the tetranuclear clusters tetrathiotetrakis(alkyl or arylthiolato)tetrairon(2-). *Journal of the American Chemical Society*, 96(1), 285-287.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10), 907–916.
- Bonomi, F., Werth, M. T., & Kurtz Jr, D. M. (1985). Assembly of [FenSn(SR)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> (n = 2, 4) in aqueous media from iron salts, thiols, and sulfur, sulfide, or thiosulfate plus rhodanese. *Inorganic Chemistry*, 24 (25), 4331-4335.
- Broderick, J. B., Duffus, B. R., Duschene, K. S., & Shepard, E. M. (2014). Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chemical reviews*, 114(8), 4229–4317.
- Calabrese, V., Mancuso, C., M, C., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., & Stella, A. M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(10), 766–775.
- Calhoun, M. W., Thomas, J. W., & Gennis, R. B. (1994). The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(8), 325-330.
- Cammack, R. (2011). Metals and metalloids: Iron-sulfur proteins. *Biochemical society*.
- Carter, C. W., Joseph Kraut, S. T., Nguyen-huu, X., Richard A, A., & Robert G, B. (s.d.). Two-Angstrom Crystal Structure of Oxidized Chromatium High Potential Iron Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 249(13), 4212 - 4225.
- Carter, C. W., Kraut, J., Freer, S. T., Alden, R. A., Sieker, L. C., Adman, E., & Jensen, L. H. (1972). A comparison of Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> clusters in high-potential iron protein and in ferredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(12), 3526–3529.

- Coldren, C., Hellenga, H. W., & Caradonna, J. P. ((1997)). The rational design and construction of a cuboidal iron-sulfur protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 13, 6635-40.
- Coletta, C. A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K. P., Gerö, D., Sharina, I., . . . Szabo, C. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 9161–9166.
- Constantinescu-Aruxandei, D., Petrovic-Stojanovska, B., Penedo, J. C., White, M. F., & Naismith, J. H. (2016). Mechanism of DNA loading by the DNA repair helicase XPD. *Nucleic Acids Research*, 44(6), 2806–2815.
- Crack, J. C., Munnoch, J., Dodd, E. L., Knowles, F., Al Bassam, M. M., Kamali, S., . . . Le Brun, N. E. (2015). NsrR from *Streptomyces coelicolor* is a nitric oxide-sensing [4Fe-4S] cluster protein with a specialized regulatory function. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 12689–12704 .
- Crofts, A. R. (2004). The cytochrome bc1 complex: Function in the context of structure. *Annual Review of Physiology*, 66, 689-733.
- CubeBiotech. (2013). *NTA Versus IDA: What's The Difference?* Récupéré sur Cube biotech: <https://cube-biotech.com/knowledge/protein-purification/nta-or-ida/>
- Dodd, E. L., & Le Brun, N. E. (2024). Probing the mechanism of the dedicated NO sensor [4Fe-4S] NsrR: the effect of cluster ligand environment. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 252.
- Dong, G., & Ryde, U. (2016). Protonation states of intermediates in the reaction mechanism of [NiFe] hydrogenase studied by computational methods. *Journal of biological inorganic chemistry*, 21.
- Drapier, J. C. (1997). Interplay between NO and [Fe-S] clusters: relevance to biological systems. *11* (3), 319–329.
- Drapier, J. C., Pellat, C., & Henry, Y. (1991). Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *Journal of biological chemistry*, 266(16), 10162-10167.
- Ekanger, L. A., Oyala, P. H., Moradian, A., Sweredoski, M. J., & Barton, J. K. (2018 ). Nitric Oxide Modulates Endonuclease III Redox Activity by a 800 mV Negative Shift upon [Fe4S4] Cluster Nitrosylation. *Journal of the American Chemical Society*, 140 (37), 11800-11810.
- Fei, S., Xia, H., Yujia, Z., Aojin, W., Xu, J., Dan, S., . . . Rao, Z. (2005). Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II,. *Cell*, 121(7), 1043-1057.

- Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature Chemical Biology*, 2, 171–174.
- Fuchs, M. G., & Meyer, F. (2010). A combined computational and experimental investigation of the [2Fe–2S] cluster in biotin synthase. *J Biol Inorg Chem*, 15, 203–212.
- Fujikawa, M., Kobayashi, K., & Kozawa, T. (2012). Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry*, 287(42), 35702–35708.
- Fujikawa, M., Kobayashi, K., & Kozawa, T. (2012). Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry*, 287(42), 35702–35708.
- Gao, H. (s.d.). Function and maturation of the Fe–S center in dihydroxyacid dehydratase from Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 293(12), 4422–4433.
- Gao, H., Azam, T., Randeniya, S., Couturier, J., Rouhier, N., & Johnson, M. K. (s.d.). Function and maturation of the Fe–S center in dihydroxyacid dehydratase from Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 293(12), 4422–4433.
- Gao, J., Sui, H., Wu, S., Zhang, R., Zhang, M., Cui, B., & Chu, H. (2022). Interaction Study of Oxygen and Iron-Sulfur Clusters Based on the Density Functional Theory. *International Journal of Chemical Engineering*, 1-9.
- Gardner, P. R., & Fridovich, I. (1991). Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *The Journal of biological chemistry*, 266(29), 19328–19333.
- Golinelli-Cohen, M.-P., & Bouton, C. (2017). Fe-S Proteins Acting as Redox Switch: New Key Actors of Cellular Adaptive Responses. *Current Chemical Biology*, 11(2).
- Grabarczyk, D. B., Ash, P. A., Myers, W. K., Dodd, E. L., & Vincent, K. A. (2019). Dioxygen controls the nitrosylation reactions of a protein-bound [4Fe4S] cluster. *Dalton Trans*, 48(37), 13960–13970.
- Green, J., Scott, C., & Guest, J. R. (2001). Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Advances in microbial physiology*, 44, 1–34.
- Grzyb, J., Xu, F., Nanda, V., Łuczowska, R., Reijerse, E., Lubitz, W., & Noy, D. (2012). Empirical and computational design of iron-sulfur cluster proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817, 1256–1262.
- Grzyb, J., Xu, F., Weiner, L., Reijerse, E. J., Lubitz, W., Nanda, V., & Noy, D. (2010). De novo design of a non-natural fold for an iron-sulfur protein: alpha-helical coiled-coil with a four-iron four-sulfur cluster binding site in its central core. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(3), 406–413.

- Gurbiel, R. J., Ohnishi, T., Robertson, D. E., Daldal, F., & Hoffman, a. B. (1991). Q-Band ENDOR Spectra of the Rieske Protein from *Rhodobacter capsulatus* Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase Show Two Histidines Coordinated to the [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry*, 30(49), 11579-11584.
- GYassineMrabetTalk. (2007, Décembre 27). *Spectrophotométrie*. Récupéré sur Wikipédia: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spectrophotometer-fr.svg>
- Han, G. W., Yang, X. L., McMullan, D., Chong, Y. E., Krishna, S. S., & Rife, C. L. (2010). Structure of a tryptophanyl-tRNA synthetase containing an iron-sulfur cluster. *Acta Crystallographica*, 66(10), 1326-1334.
- Harrop, T. C., Tonzetich, Z. J., Reisner, E., & Lippard, S. J. (2008 ). Reactions of Synthetic [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Clusters with Nitric Oxide and Nitrosothiols. *130*(46).
- Hauska, G., Schütz, M., & Büttner, M. (2004). *The Cytochrome b6f complex-composition, structure and function*.
- Hill, R. B., Raleigh, D. P., Lombardi, A., & Degrado, W. F. (2000). De novo design of helical bundles as models for understanding protein folding and function. *Accounts of Chemical Research*, 33(11 ), 745 - 754.
- Huang, P., Boyken, S., & Baker, D. ((2016)). The coming of age of de novo protein design. . *Nature* , 537, 320–327 .
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *84*(24), 9265–9269.
- Inomata, S., Tobita, H., & Ogino, H. (1992). Synthesis and structure of mixed-ligand iron-sulfur cubane-like clusters [(eta-C5Me5)3(Ph2C2S2)Fe4S5]n (n = 0 and 1+). *Inorganic Chemistry* , 31 (5), 722-723.
- Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E., & Dean, D. R. (1989 ). Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Molecular & general genetics* , 219(1-2), 49–57.
- Jafari, S., Tavares Santos, Y., & Bergmann, J. (2022). Benchmark Study of Redox Potential Calculations for Iron-Sulfur Clusters in Proteins. *Inorganic chemistry*, 61(16), 5991–6007.
- Jagilinki, B. P., Ilic, S., Trncik, C., Tyryshkin, A. M., Pike, D. H., Lubitz, W., . . . Nanda, V. (2020). In Vivo Biogenesis of a De Novo Designed Iron–Sulfur Protein. *ACS Synthetic Biology*, 9, 3400-3407.
- Jagilinki, B. P., Ilic, S., Trncik, C., Tyryshkin, A. M., Pike, D. H., Lubitz, W., . . . Nanda, V. (2020). In Vivo Biogenesis of a De Novo Designed Iron–Sulfur Protein. *ACS Synthetic Biology* , 9 (12), 3400-3407.



- Jaroschinsky, M., Pinske, C., & Gary Sawers, R. (2017). Differential effects of isc operon mutations on the biosynthesis and activity of key anaerobic metalloenzymes in *Escherichia coli*. *Microbiology*, *163* ( 6), 878-890 .
- Jaroschinsky, M., Pinske, C., & Sawers, G. R. (2017). Differential effects of isc operon mutations on the biosynthesis and activity of key anaerobic metalloenzymes in *Escherichia coli*. *Microbiology* , *163*(6), 878-890.
- Johnson, D. C., Dos Santos, P. C., & Dean, D. R. (2005). NifU and NifS are required for the maturation of nitrogenase and cannot replace the function of isc-gene products in *Azotobacter vinelandii*. *Biochemical Society Transactions*, *33*(1), 90–93.
- Johnson, D., Dean, D., Smith, A., & Johnson, M. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual review of biochemistry*, 47–281.
- Kästner, J., & Blöchl, P. E. (2007 ). Ammonia Production at the FeMo Cofactor of Nitrogenase: Results from Density Functional Theory. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(10), 2998-3006.
- Kambayashi, H., Nagao, H., Tanaka, K., Nakamoto, M., & Peng, S.-M. (1993). Stabilization of superoxidized form of synthetic Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster as the first model of high potential iron sulfur proteins in aqueous media. *Inorganica Chimica Acta*, *209*(2), 143-149.
- Kiley, P. J., & Beinert, H. (1998). Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS microbiology reviews*, *22*(5), 341–352. *FEMS microbiology reviews*, *22*(5), 341–352.
- Kiley, P. J., & Beinert, H. (2003). The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(2), 181-185.
- Krämer, T. K. (2013). Theoretical spectroscopy of the Ni(II) intermediate states in the catalytic cycle and the activation of [NiFe] hydrogenases. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology*, *14*(14), 1898–1905.
- Kryshtafovych, A., Schwede, T., Topf, M., Fidelis, K., & Moulton, J. (2019). Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP). *Proteins*, *87*, 1011–1020 .
- Kuroda, Y., Sasaki, Y., Shiroiwa, Y., & Tabushi, I. (1988 ). Cyclodextrin sandwiched Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster. *Journal of the American Chemical Society* , *110* (12), 4049-4050.
- Lauble, H., Beinert, H., & Stout, C. (1992). Crystal Structures of Aconitase with Isocitrate and Nitroisocitrate Bound. *Biochemistry*, *31*, 2735-48.
- Leggate, E., Bill, E., Essigke, T., & Hirst, J. (2004). Formation and characterization of an all-ferrous Rieske cluster and stabilization of the [2Fe-2S]<sub>0</sub> core by protonation. *National Academy of Sciences*, *101*.

- Leimkühler, S. (2014). The Biosynthesis of the Molybdenum Cofactor in *Escherichia coli* and Its Connection to FeS Cluster Assembly and the Thiolation of tRNA. *Advances in Biology*, 2014, 1-21.
- Li, L., Rose, P., & Moore, P. K. (2011). Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 51, 169–187.
- Li, N., Zhao, J., Warren, P. V., T. Warden, J., Bryant, D. A., & Golbeck, J. H. (1991). PsaD Is Required for the Stable Binding of PsaC to the Photosystem I Core Protein of *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Biochemistry*, 30, 7863-7872.
- Lippard, S. J., & Berg, J. M. (1994). *Principles Of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books.
- Lippard, S., & Berg, J. (1994). *Principles of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books.
- Lloyd, S. J., Lauble, H., Prasad, G. S., & Stout, C. D. (1999). The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a : citrate complex. *Protein science*, 8(12), 2655–2662.
- Lo, W., Scott, T. A., Zhang, P., Ling, C.-C., & Holm, R. H. (2011). Stabilities of cubane type  $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4]^{2-}$  clusters in partially aqueous media. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(4), 497-508.
- Low, D. W., & Hill, M. G. (2000). Backbone-engineered high-potential iron proteins: Effects of active-site hydrogen bonding on reduction potential. *Journal of the American Chemical Society*, 122 (44), 11039-11040.
- Mascharak, P. K., Hagen, K. S., Spence, J. T., & Holm, R. H. (1983). Structural distortions of the  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  core of  $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{S-t-C}_4\text{H}_9)_4]^{2-}$  in different crystalline environments and detection and instability of oxidized ( $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ ) clusters. *Inorganica Chimica Acta*, 80, 157-170.
- McHugh, J. P., Rodríguez-Quinoñes, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E., & Andrews, S. C. (2003). Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *The Journal of biological*, 278(32), 29478–29486.
- Medina, M., Hatchikian, E. C., & Cammack, R. (1996). Studies of light-induced nickel EPR signals in hydrogenase: comparison of enzymes with and without selenium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1275(3), 227-236.
- Messerschmidt, A., Huber, R., Poulo, T., & Wieghardt, K. (2001). Handbook of metalloproteins. *Biological Crystallography*, 1.
- Metropolis, N. a.-3. (1949). The Monte Carlo Method. *ournal of the American Statistical Association*, 44, 335-341.

- Mettert, E. L., & Kiley, P. J. (2014). Coordinate regulation of the Suf and Isc Fe-S cluster biogenesis pathways by IscR is essential for viability of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *196*(24), 4315–4323.
- Mui, T. P., Fuss, J. O., Ishida, J. P., Tainer, J. A., & Barton, J. K. (2011). ATP-stimulated, DNA-mediated redox signaling by XPD, a DNA repair and transcription helicase. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(41), 16378–16381.
- Mulholland, S. E., Gibney, B. R., Rabanal, F., & Dutton, P. L. (1999). Determination of nonligand amino acids critical to [4Fe-4S](2+/+) assembly in ferredoxin maquettes. *Biochemistry*, *38*(32).
- Mutter, A. C., Tyryshkin, A. M., Campbell, I. J., Poudel, S., Bennett, G. N., Silberg, J. J., . . . Falkowski, P. G. (s.d.). De novo design of symmetric ferredoxins that shuttle electrons in vivo. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, *116*( 29), 14557-14562 .
- Nanda, V., Senn, S., Pike, D. H., Rodriguez-Granillo, A., Hansen, W. A., Khare, S. D., & Noy, D. (2016). Structural principles for computational and de novo design of 4Fe-4S metalloproteins. *Biochimica et biophysica acta*, *1857*(5), 531–538.
- Naqui, A., Chance, B., & Cadenas, E. (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annual review of biochemistry*, *55*, 137–166.
- Neves, J., Haider, T., Gassmann, M., & Muckenthaler, M. (2019). . Iron Homeostasis in the Lungs—A Balance between Health and Disease. *Pharmaceuticals*, *12*(5).
- Oakley, K. M. (2021 ). Generation of H<sub>2</sub>S from Thiol-Dependent NO Reactivity of Model [4Fe-4S] Cluster and Roussin's Black Anion. *Inorganic chemistry*, *60*(21), 15910–15917.
- O'Brien, E., Holt, M. E., Thompson, M. K., Salay, L. E., Ehlinger, A. C., Chazin, W. J., & Barton, J. K. (2017). The [4Fe4S] cluster of human DNA primase functions as a redox switch using DNA charge transport. *Science*, *355*(6327).
- Ogihara, N. L., Ghirlanda, G., Bryson, J. W., Gingery, M., DeGrado, W. F., & Eisenberg, D. (2001). Design of three-dimensional domain-swapped dimers and fibrous oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98* (4), 1404-1409.
- Outten, C. E., & O'Halloran, T. V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, *292*(5526), 2488–2492.
- Partridge, J. D., Bodenmiller, D. M., Humphrys, M. S., & Spiro, S. (2009). NsrR targets in the *Escherichia coli* genome: new insights into DNA sequence requirements for binding and a role for NsrR in the regulation of motility. *Molecular microbiology*, *73*(4), 680-684.

- Pérard, J., & Ollagnier de Choudens, S. ( 581–596 (2018)). Iron–sulfur clusters biogenesis by the SUF machinery: close to the molecular mechanism understanding. *Journal Biological Inorganic Chemistry*, 23, 581–596.
- Prast, H., & Philippu, A. (2001 ). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in neurobiology*, 64(1), 51–68.
- Ramachandran, G. N., Sasisekharan, V., & Ramakrishnan, C. J.–9. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of molecular biology*, 7, 95–99.
- Rao, P. V., & Holm, R. H. (2004). *Chemical Reviews* , 104 (2), 527–560.
- Read, A. D., Bentley, R. E., Archer, S. L., & Dunham-Snary, K. J. (2021). Mitochondrial iron–sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology. *Redox Biology*, 47, 2213-2317.
- Ren, B., Zhang, N., Yang, J., & Ding, H. (2008). Nitric oxide-induced bacteriostasis and modification of iron-sulphur proteins in Escherichia coli. *Molecular microbiology*, 70(4), 953–964.
- Rieske, J. S., MacLennan, D. H., & Coleman, R. (1964). Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 15, 338-344.
- Roy, A., Yang, J., & Zhang, Y. (2012). COFACTOR: An accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic acids research.*, 40, 471-477.
- Rubio, L. M., & Ludden, P. W. (2005). Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *Journal of bacteriology*, 187(2), 405–414. .
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W. J., Stark, M. J., & White, M. F. (2006). The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Molecular cell*, 23(6), 801–808.
- Salomon-Ferrer, R. C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput Mol Sci*. *WIREs Comput Mol Sci*, 3(2), 198-210.
- Sazanov , L., & Hinchliffe, P. (2006). Structure of the Hydrophilic Domain of Respiratory Complex I from Thermus thermophilus. *Science*, 311(5766), 1430-1436.
- Scott, T., Berlinguette, C., Holm, R., & Zhou, H.-C. (2005). Initial synthesis and structure of an all-ferrous analogue of the fully reduced [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]O cluster of the nitrogenase iron protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(28), 9741-9744 .
- Senior, A. W., Evans, R., & Jumper, J. (2020). Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature* (577), 706–710 .

- Serrano, P. N., Wang, H., Crack, J. C., Prior, C., Le Brun, N. E., & Cramer, S. P. (2016). Nitrosylation of nitric oxide-sensing regulatory proteins containing [4Fe-4S] clusters gives rise to multiple iron-nitrosyl complexes. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(47), 14575–14579.
- Sommer, D. J., Roy, A., Astashkin, A., & Ghirlanda, G. (2015). Modulation of cluster incorporation specificity in a de novo iron-sulfur cluster binding peptide. *Biopolymers*, 104, 412–418.
- Sontz, P. A., Mui, T. P., Fuss, J. O., Tainer, J. A., & Barton, J. K. (2012). DNA charge transport as a first step in coordinating the detection of lesions by repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), 1856–1861.
- Stein, M., & Lubitz, W. (2001). The electronic structure of the catalytic intermediate Ni-C in [NiFe] and [NiFeSe] hydrogenases. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3, 5115–5120.
- Stevanin, T. M., Read, R. C., & Poole, R. K. (2007). The hmp gene encoding the NO-inducible flavohaemoglobin in *Escherichia coli* confers a protective advantage in resisting killing within macrophages, but not in vitro: links with swarming motility. *Gene*, 398(1-2), 62–68.
- Tanaka, N., Kanazawa, M., Tonosaki, K., Yokoyama, N., Kuzuyama, T., & Takahashi, Y. (2016). Novel features of the ISC machinery revealed by characterization of *Escherichia coli* mutants that survive without iron-sulfur clusters. *Molecular microbiology*, 99(5), 835–848.
- Tokumoto, U., & Takahashi, Y. (2001). Genetic Analysis of the isc Operon in *Escherichia coli* Involved in the Biogenesis of Cellular Iron-Sulfur Proteins. *The Journal of Biochemistry*, 130 (1), 63–71.
- Torres, R. A., Lovell, T., Noodleman, L., & Case, D. A. (2003). Density functional and reduction potential calculations of Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 125 (7), 1923 - 1936.
- Tran, C. T. (2014). Nitric oxide reactivity of [2Fe-2S] clusters leading to H<sub>2</sub>S generation. *Journal of the American Chemical Society*, 136(34), 11874–11877.
- Tran, C. T., Williard, P. G., & Kim, E. (2014). Nitric Oxide Reactivity of [2Fe-2S] Clusters Leading to H<sub>2</sub>S Generation. *Journal of the American Chemical Society*, 136 (34), 11874–11877.
- Uden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Hg, T., Wackwitz, B., & Zeuner, Y. (2002). Control of FNR function of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub> and reducing conditions. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 4, 263.
- Ursu, I. (1968). La résonance paramagnétique électronique. 5.

- Valer, L., Rossetto, D., Scintilla, S., Hu, Y. J., & Tomar, A. (2022). Methods to identify and characterize iron–sulfur oligopeptides in water. *Canadian Journal of Chemistry*, 100(7), 475.
- Varghese, S., Tang, Y., & Imlay, J. A. (2003). Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *Journal of bacteriology*, 185(1), 221–230. *Journal of bacteriology*, 185(1), 221–230.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 373(6515), 580–587.
- Volz, K. (2008). The functional duality of iron regulatory protein 1. *Current opinion in structural biology*, 18(1), 106–111.
- Vranish, J., Russell, W., Yu, L., Cox, R., & Barondeau, D. (2014). Fluorescent Probes for Tracking the Transfer of Iron–Sulfur Cluster and Other Metal Cofactors in Biosynthetic Reaction Pathways. *Journal of the American Chemical Society*, 137.
- Wächtershäuser, G. (1988). Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiological reviews*, 452-484.
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual review of microbiology*(58), 611–647.
- Wehrspan, Z. J., McDonnell, R. T., & Elcock, A. H. (2022). Identification of Iron-Sulfur (Fe-S) Cluster and Zinc (Zn) Binding Sites Within Proteomes Predicted by DeepMind's AlphaFold2 Program Dramatically Expands the Metalloproteome. *Journal of Molecular Biology*, 434(2).
- Wombwell, C., Caputo, C. A., & Reisner, E. (2015). [NiFeSe]-Hydrogenase Chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 48(11), 2858-2865.
- Xueyun, H., Yukako, K., Akihiro, S., Ayumi, T., & Ryouichi, T. (s.d.). The SUFBC2D complex is required for the biogenesis of all major classes of plastid Fe-S proteins. *The Plant Journal*, 90(2), 235-248.
- Yang J, & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W174–W181.
- Yang, L., & Li, L. (2013). The Enzyme-Mediated Direct Reversal of a Dithymine Photoproduct in Germinating Endospores. *International journal of molecular sciences*. *International journal of molecular sciences*, 14, 13137-13153.
- Yeo, W.-S., Lee, J.-H., Lee, K.-C., & Roe, J.-H. (2006). IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins. *Molecular Microbiology*, 61(1), 206–218.

- Yukl, E. T., Elbaz, M. A., Nakano, M. M., & Moëne-Loccoz, P. (2008). Transcription factor NsrR from *Bacillus subtilis* senses nitric oxide with a 4Fe-4S cluster. *Biochemistry*, *47*(49), 13084-13092.
- Zacarias, S., Vélez, M., Pita, M., De Lacey, A. L., Matias, P. M., & Pereira, I. A. (2018). Characterization of the [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Methods in enzymology*, *613*, 169–201.
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F., & Dean, D. R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(7), 2754–2758.
- Zurita, M., & Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends in genetics*, *19*(10), 578–584.