



HAL
open science

Etude des systèmes de biosynthèse des agrégats de métaux de transition par cryo-microscopie électronique en conditions anaérobies

Mickael V Cherrier

► **To cite this version:**

Mickael V Cherrier. Etude des systèmes de biosynthèse des agrégats de métaux de transition par cryo-microscopie électronique en conditions anaérobies. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2019. tel-03717044

HAL Id: tel-03717044

<https://hal.science/tel-03717044v1>

Submitted on 8 Jul 2022

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

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

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Ecole doctorale Chimie & Sciences du vivant

Université Grenoble Alpes (UGA)

Présentée par

Mickaël V. CHERRIER

Groupe Métalloprotéines

Institut de biologie Structurale (IBS)

**Etude des systèmes de biosynthèse des agrégats de
métaux de transition par cryo-microscopie
électronique en conditions anaérobies.**

Soutenue le 18 juin 2019 devant le jury composé de

Rapporteurs : **Dr. DESSEN Andrée**

Dr. ENNIFAR Eric

Pr. GOUET Patrice

Examineurs : **Dr. BRON Patrick**

Pr. WEISSEHORN Winfried



Table des matières

Synthèse des activités de recherche.....	5
1 Thèse de doctorat	7
2 Recherches postdoctorales	10
2.1 Cryo-microscopie électronique	10
2.2 Scientifique sur la ligne de lumière BM16 de l'ESRF.....	15
2.3 Études structurales de métalloprotéines artificielles et bioinformatique.....	21
3 Maitre de conférences UCBL.....	28
3.1 <i>Helicobacter pylori</i>	28
3.2 Etude structurale de la régulation de la réplication de <i>Bacillus subtilis</i>	34
3.3 Etude structurale de la phospholipase D de plante.....	35
4 Maitre de conférences UGA.....	38
Projet de recherche	41
1 Microscopie électronique	43
1.1 Pourquoi le microscope électronique	43
1.2 Microscopie électronique et biologie structurale	45
2 Etude structurale de la biosynthèse des cofacteurs métalliques.....	54
2.1 Mécanismes de transfert des cofacteurs métalliques.....	54
2.2 Métalloprotéines et agrégats fer – soufre	57
2.3 Microscopie électronique des métalloprotéines et conditions anaérobies....	59
3 Machineries de métalloprotéines étudiées.....	63
3.1 Biogenèse mitochondriale des agrégats [Fe-S] chez les mammifères	63
3.2 Maturation de l'agrégat FeMo-co de la nitrogénase	71
3.3 Perspectives de recherche à long terme.....	81
Curriculum Vitae	83
Références	97

Synthèse des activités de recherche

Mon activité de recherche se découpe en trois parties, à savoir :

- Le travail que j'ai réalisé durant ma thèse de doctorat à l'Université Joseph Fourier (devenue Université Grenoble Alpes - UGA)
- Mes expériences de recherche postdoctorale aux États-Unis et en France
- Les travaux de recherche réalisés suite à mon recrutement en tant que maître de conférences à l'Université Claude Bernard de Lyon (UCBL), puis ma mutation à l'UGA.

1 Thèse de doctorat

Dates : Octobre 2002 - Novembre 2006

Diplôme : Thèse de cristallographie et RMN biologiques

Laboratoire : LCCP – Institut de biologie structurale (IBS) – Grenoble – France

Responsable du laboratoire : Juan Carlos Fontecilla-Camps

Directeur de thèse : Juan Carlos Fontecilla-Camps

Le nickel est un cofacteur essentiel à l'activité enzymatique de plusieurs protéines telle que l'uréase ou l'hydrogénase à NiFe. Ce métal constitue un facteur de virulence pour certains pathogènes, dont le plus connu est *Helicobacter pylori*. Étant donné que le nickel libre, comme les autres métaux de transition, est également toxique pour les cellules, son import est finement régulé. Dans le cas d'*Escherichia coli*, l'import du nickel est assuré par l'opéron *nikABCDE*¹ qui code pour un système du type « ATP Binding Cassette » (ABC) composé de cinq protéines, dont la protéine périplasmique NikA (Figure 1). L'expression de cet opéron est régulée par l'action conjointe d'un activateur, la protéine Fumarate Nitrate Réductase (FNR), qui régule de façon globale le métabolisme aérobie/anaérobie de la bactérie grâce à sa capacité de détection de l'oxygène, et d'un répresseur, la protéine NikR, sensible à la présence de nickel libre dans le cytoplasme.

Mon travail de thèse avait donc pour objectif une meilleure compréhension des mécanismes d'import et de régulation du nickel chez la bactérie modèle *E. coli* grâce à la résolution des structures cristallines des protéines NikA et NikR.

La première étape de ce travail a été de surproduire et purifier la protéine NikA native ainsi qu'une forme marquée au sélénium, afin de faciliter la résolution de sa structure. J'ai ensuite obtenu des cristaux de NikA par micro-ensemencement, puis collecté des données de diffraction à 2,8 Å de résolution. Dans le cas du répresseur de l'opéron, NikR, la protéine

purifiée nous a été fournie par l'équipe de M.A. Mandrand-Berthelot (UMG/INSA Lyon). J'ai pu obtenir deux formes cristallines différentes qui ont diffracté à 3,0 Å de résolution.

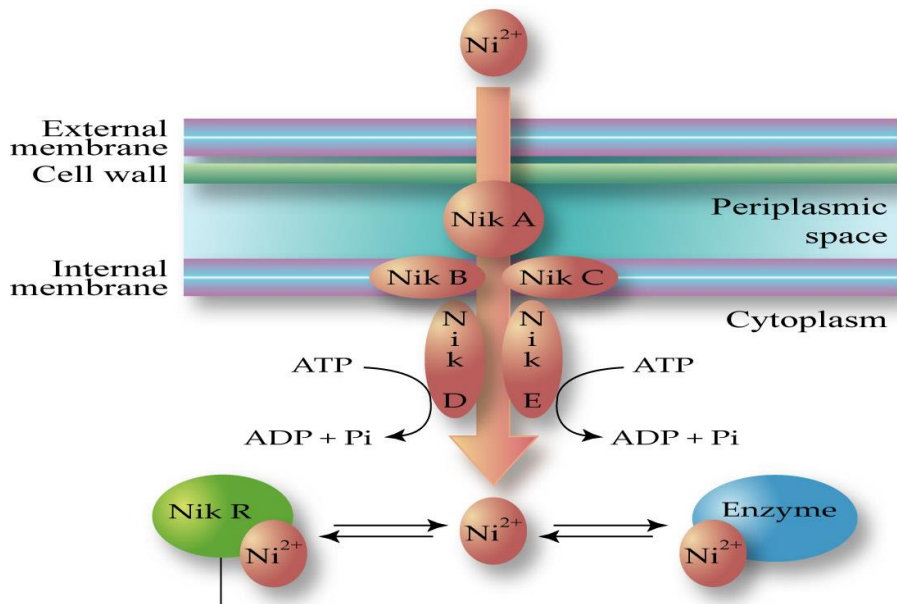


Figure 1 : Système d'import du nickel, du type ABC, codé par l'opéron *nikABCDE* d'*E. coli*, et régulé par les protéines FNR et NikR.

La seconde étape devait alors être la réalisation du phasage, grâce au marquage au sélénium des résidus de méthionine, par les techniques SAD et MAD, des données de diffraction collectées, afin d'obtenir les structures des protéines NikA et NikR. Malheureusement, à la fin de ma première année de thèse, les structures de ces deux protéines furent résolues simultanément par deux équipes différentes.^{2,3} J'ai alors initié une étude comparative entre les structures publiées et celle obtenue à partir des données que nous avons précédemment collectées. Dans le cas de NikR, je n'ai pu caractériser que le domaine C-terminal du tétramère, le domaine de fixation à l'ADN (N-terminal) étant désordonné dans nos cristaux. En revanche, dans le cas de NikA, même si notre structure s'est révélée très similaire à celle déjà publiée, le site putatif de fixation du nickel contenait une densité électronique surprenante. Je me suis alors rendu compte que contrairement à ce qui avait été proposé par nos concurrents, le site de fixation de NikA ne contenait pas un atome de nickel penta-hydraté, mais un complexe de $FeEDTA(H_2O)^-$ (Figure 2). L'EDTA, qui n'est pas une molécule physiologique, provenait, dans notre cas, mais également dans le cas de nos concurrents, de l'étape d'extraction de protéines du périplasma bactérien.

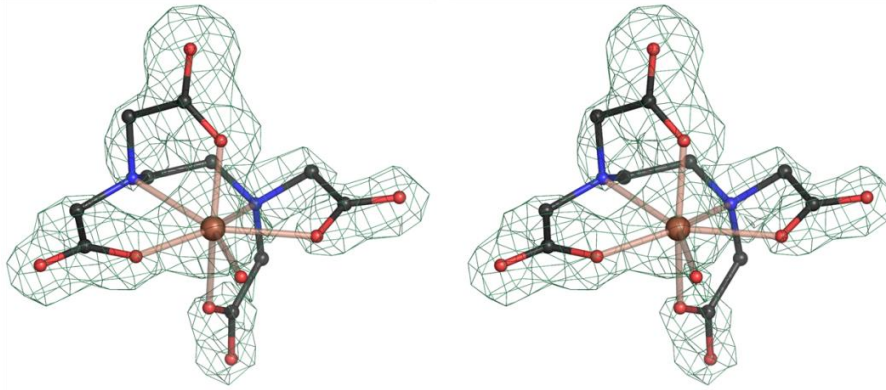


Figure 2 : Vue stéréoscopique de la densité électronique « omit », (Fobs-Fcalc sans la contribution de l'EDTA ni le nickel) contournée à 3σ, observée dans le site de fixation de NikA.

Sa présence nous a laissé penser que le transport du nickel par NikA pourrait impliquer un métallore spécifique du nickel, qui présenterait de fortes similarités structurales avec l'EDTA⁴ et que l'on a alors appelé nickelophore. Le système de transport NikABCDE fonctionnerait ainsi de façon similaire à celui du fer par des sidérophores. Par la suite, en remplaçant l'étape d'extraction périplasmique à l'EDTA par une extraction au chloroforme, j'ai résolu une seconde structure de NikA correspondant à une forme de la protéine plus fermée que précédemment (Figure 3). Dans ce dernier cas, le site de fixation de la protéine contenait un nickel en complexe avec une molécule de structure proche de l'EDTA. Il est fort probable que cette dernière soit le nickelophore physiologique. D'après la densité électronique, le meilleur modèle structural en serait l'acide 3-(carboxy)hexanedioïque⁵ (Figure 4).

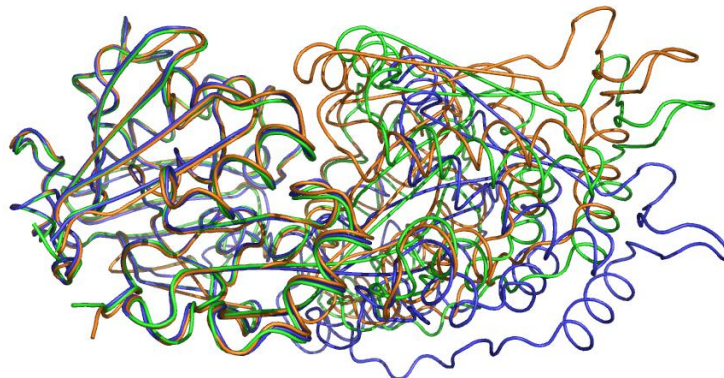


Figure 3 : Superposition, sur les domaines I, des structures de NikA apo (sans métal ; bleu), NikA contenant le complexe de Fe-EDTA (vert) et NikA le nickelophore (orange).

Mon travail de thèse a ainsi permis de mettre en évidence pour la première fois l'existence d'un métallore spécifique du nickel chez *E. coli*, ce qui n'avait jamais été envisagé auparavant. Le terme nickelophore choisi pour le définir, a été depuis accepté par la communauté,^{6,7} et son existence chez d'autres organismes est également envisagée.⁸

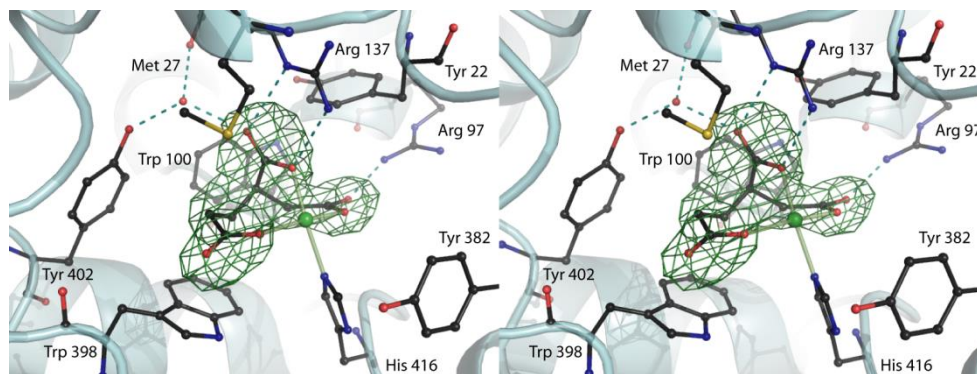


Figure 4 : Vue stéréoscopique du site de fixation de NikA. Les liaisons hydrogène entre l'acide 3-(carboxy)hexanedioïque et la protéine sont représentées par des traits en pointillés. La densité électronique « omit » est représentée en vert. Le nickel et les molécules d'eau sont représentés respectivement par des sphères vertes et rouges.

Cette période fut extrêmement enrichissante, puisqu'elle m'a permis de compléter et d'approfondir mes connaissances en cristallographie des protéines et en biochimie structurale, mais aussi de me confronter à d'autres techniques plus spécifiques de l'étude des métalloprotéines, telles que, par exemple, la spectroscopie RPE (Résonance Paramagnétique Electronique), ou l'EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) qui ont permis de mieux caractériser la nature et la coordination des métaux dans la protéine.

2 Recherches postdoctorales

2.1 Cryo-microscopie électronique

Dates : Février 2007 - Juin 2009

Laboratoire : Rossmann Laboratory – Purdue University – West Lafayette – IN / USA

Responsable du laboratoire : Michael G. Rossmann

A la fin de mes travaux de thèse, j'ai estimé que l'utilisation conjointe des différentes techniques de biologie structurale était un réel avantage pour avoir une compréhension plus complète des systèmes biologiques. J'ai alors décidé d'enrichir mes connaissances techniques en biologie structurale en apprenant la cryo-microscopie électronique (cryoEM). Pour cela, j'ai rejoint le laboratoire du Professeur M.G. Rossmann, qui jouit d'une renommée mondiale dans le domaine. J'ai ainsi su m'adapter à une thématique nouvelle en travaillant à la résolution de la structure de virus d'eucaryotes.

2.1.1 Etude structurale du virus géant PBCV-1

PBCV-1 (*Paramecium bursaria Chlorella virus-1*) est l'un des virus les plus grands jamais répertoriés (1900 Å de diamètre), et constitue ainsi l'un des modèles d'étude de la famille

des virus géants à ADN. Il infecte l'algue verte eucaryote unicellulaire *Chlorella* NC64A en s'attachant à sa paroi par l'intermédiaire de l'un de ses sommets. Sa structure tridimensionnelle fut résolue précédemment par cryoEM en appliquant la symétrie icosaédrique.⁶ Après la découverte dans notre équipe d'une structure en « étoile » sur un seul des sommets du virus géant mimivirus,⁹ nous nous sommes demandés si PBCV-1 ne pouvait pas lui aussi posséder une structure similaire. Nous avons alors décidé de ré-analyser des images de cryoEM prises précédemment à partir d'un échantillon du virus PBCV-1. Ce dernier nous avait été fourni par notre collaborateur J.L. Van Etten (University of Nebraska, Lincoln), spécialiste de cette famille de virus. Certaines particules présentaient un espace entre la membrane et la capsid sous un des sommets du virus, ce qui n'avait pas été remarqué précédemment. Nous avons alors décidé de réaliser une nouvelle reconstruction à partir de ces données, en appliquant cette fois une moyennation autour d'un axe unique d'ordre 5 au lieu d'une symétrie icosaédrique.¹⁰ PBCV-1 possède en réalité différents éléments ne respectant pas la symétrie icosaédrique, dont un sommet unique portant une aiguille cylindrique (Figure 5). Cette structure est probablement impliquée dans l'infection de la cellule cible, à l'image de ce que font les bactériophages.¹¹

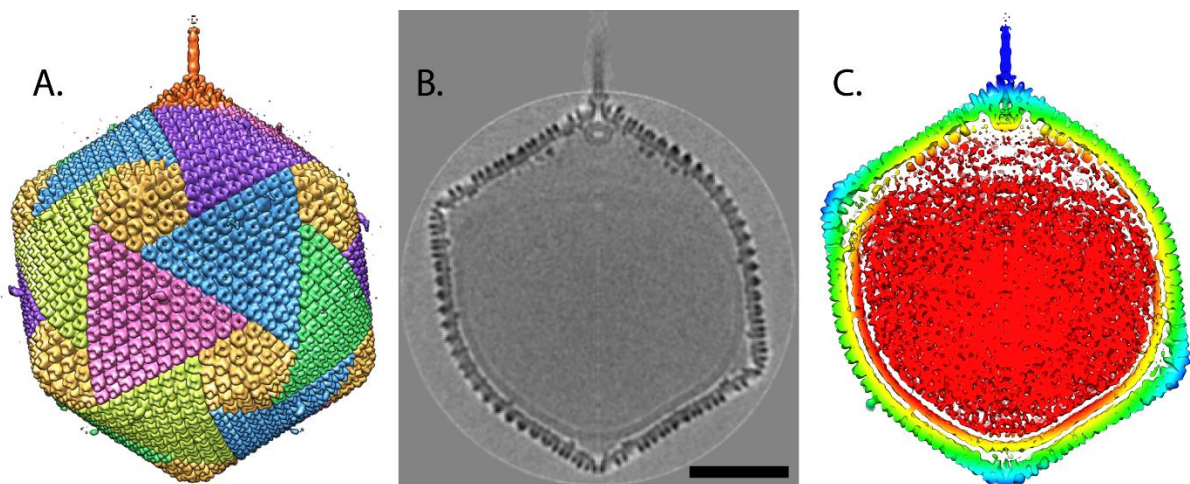


Figure 5 : Reconstruction de la structure de PBCV-1 avec moyennation par une symétrie d'ordre 5. A) Arrangement des capsomères formant les trisymetrons et les pentasymetrons (or). B) Section centrale de la densité électronique. La barre représente 500Å. C) Même vue que B colorée radialement.

A l'intérieur du virus, sous le sommet unique, est également présente une poche partiellement vide qui doit pouvoir servir, comme pour certains bactériophages,¹² de réservoir aux enzymes nécessaires aux premières étapes de l'infection de *Chlorella*. Cette étude a permis de montrer que plusieurs caractéristiques essentielles de PBCV-1 avaient été « effacées » préalablement par l'application de la symétrie icosaédrique. Ce travail a ainsi ouvert la voie à la réalisation d'études structurales et biochimiques plus complètes de PBCV-1, permettant ainsi une meilleure compréhension de son cycle de vie.^{13,14} Il permet également d'envisager que

d'autres virus peuvent eux aussi avoir, même transitoirement, des structures ne répondant pas à la symétrie principale de la particule.¹⁵

2.1.2 Etude structurale de complexes de Fab-virus mettant en lumière le rôle des flavivirus partiellement maturés

Mon second projet de recherche portait sur l'étude structurale de deux flavivirus pathogènes humains que sont le virus de la dengue (DENV) et celui du Nil occidental (WNV). Ces virus sont constitués d'une couche externe protéique, composée de la protéine d'enveloppe (E) et de la protéine membranaire (M). A l'extrémité de la protéine E est exposée la « boucle de fusion » qui est conservée chez tous les flavivirus. Elle est nécessaire à la fusion de la membrane du virus avec celle de l'endosome de la cellule hôte, lors de l'infection. L'infection par les flavivirus nécessite une étape de maturation qui se produit pendant le passage à travers l'appareil de Golgi. L'environnement acide dans cette structure provoque une réorganisation des protéines de surface du virus, s'accompagnant de l'exposition d'un site de clivage à la furine du précurseur prM de la protéine membranaire (Figure 6).

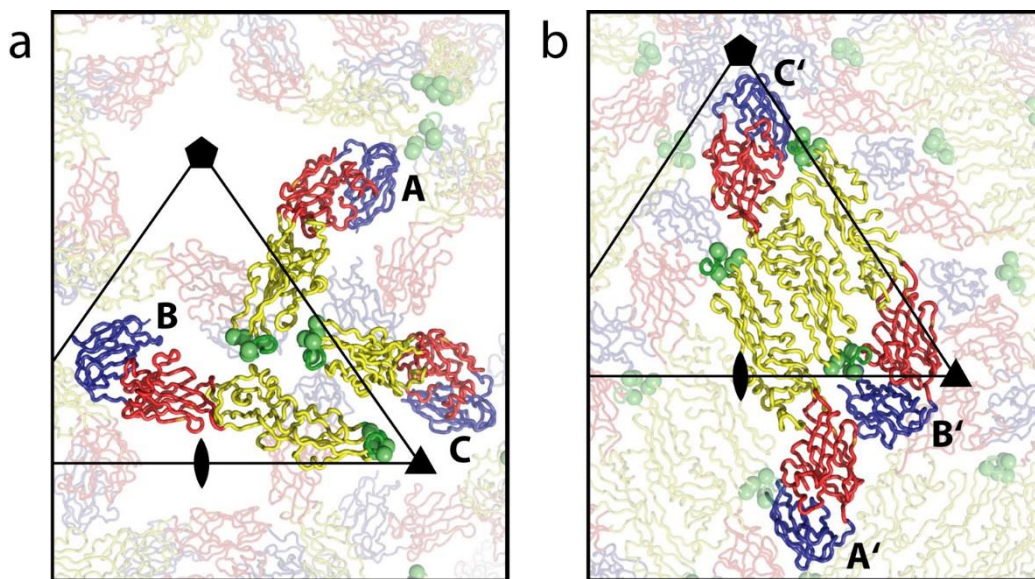


Figure 6 : Organisation de la glycoprotéine E à la surface du virus (a) immature et (b) mature. Les domaines DI, DII et DIII sont représentés en rouge, jaune et bleu respectivement. La boucle de fusion est colorée en vert. Le triangle noir représente l'unité asymétrique de la géométrie icosaédrique. Les sphères vertes représentent les résidus de l'épitope.

Le travail que nous avons mené a permis d'obtenir les premières reconstructions par cryoEM de la forme immature de DENV et de WNV en complexe avec le fragment Fab d'un anticorps dirigé contre la boucle de fusion (Fab-E53) (Figure 7), qui nous a été fourni par l'équipe de M.S. Diamond (Washington University School of Medicine, St Louis).¹⁶

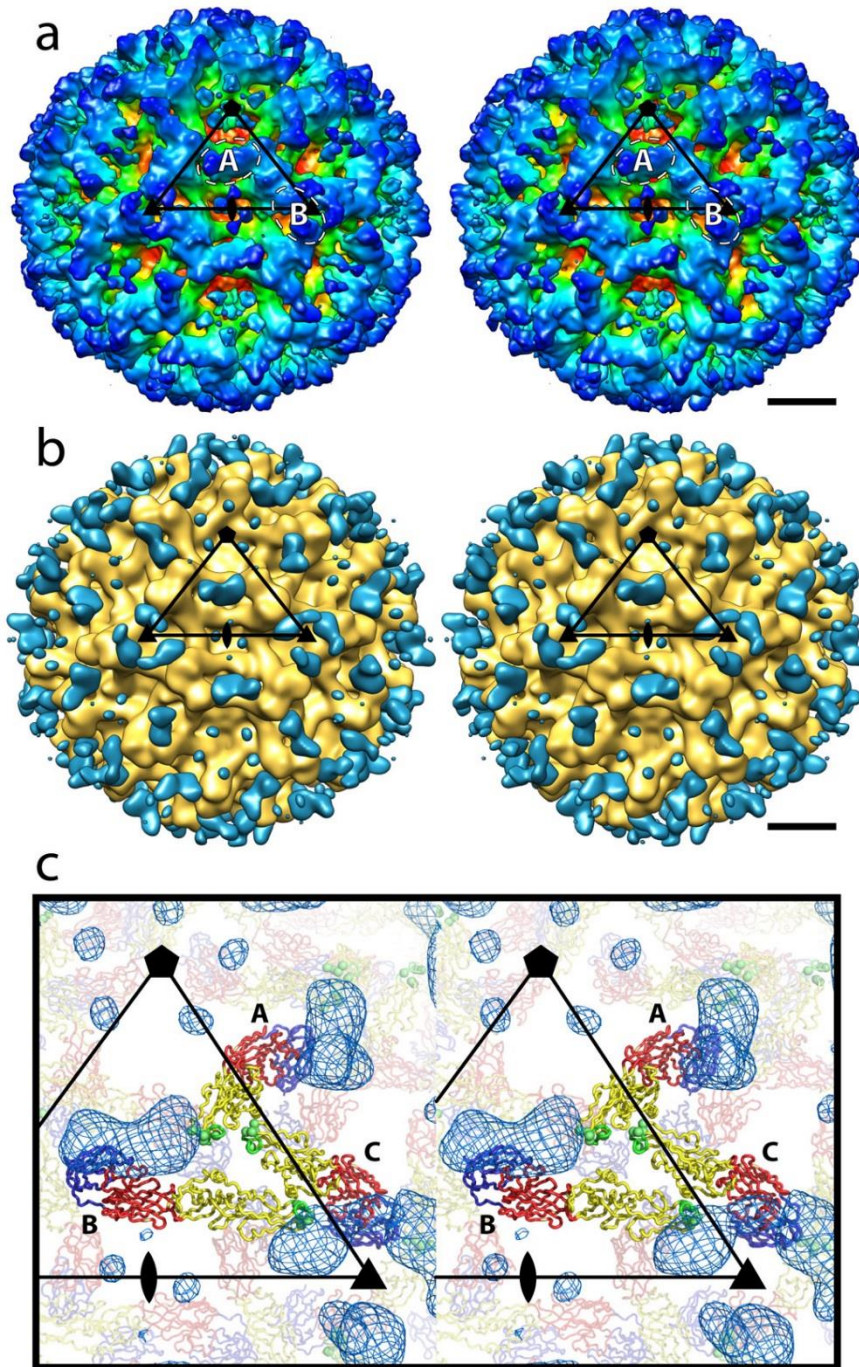


Figure 7 : Reconstruction par cryo-microscopie électronique du Fab de l'anticorps E53 en complexe avec WNV. a) Vue stéréoscopique du complexe WNV immature-Fab E53 coloré radialement. Les pointillés localisent le Fab E53. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de DENV. (b) Vue stéréoscopique montrant la carte de différence entre les densités du complexe WNV / Fab-E53 et du virus immature (bleu). Le virus immature est représenté en doré. (c) Superposition de la densité différence (bleu) et de la structure atomique de la protéine E. Les triangles représentent l'unité asymétrique de l'icosaèdre. La barre représente 100 Å.

Ces anticorps présentent en général une réactivité croisée et constituent une partie importante de la réponse humorale humaine, alors qu'ils ne sont que faiblement neutralisants. Par la suite, l'équipe de notre collaborateur D.H. Fremont (Washington University School of Medicine, St Louis) a résolu, en parallèle de notre étude, la structure tridimensionnelle de Fab-E53 en

complexe avec l'ectodomaine de la protéine E de WNV par cristallographie aux rayons-X, ce qui a permis d'affiner notre analyse du mode de fixation de cet anticorps. Cette étude nous a montré que les anticorps dirigés contre la boucle de fusion fixent préférentiellement les flavivirus immatures non infectieux, alors qu'ils sont incapables de reconnaître la forme mature, infectieuse, du virus. L'action neutralisante d'E53 proviendrait donc de son interaction avec un troisième type de particules infectieuses : les virus partiellement maturés, résultant d'une digestion incomplète de la protéine prM par la furine (Figure 8).

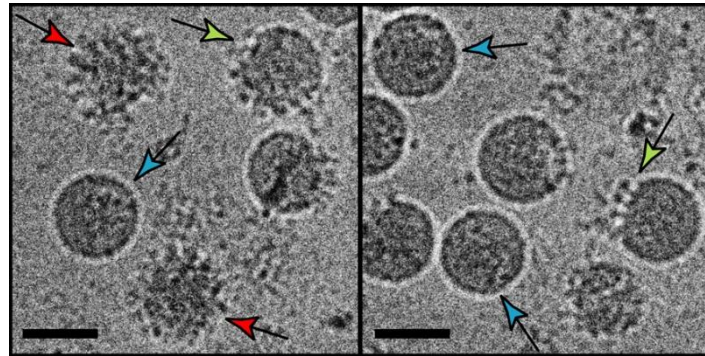


Figure 8 : Images de cryo-microscopie électronique de deux échantillons de WNV mature (flèches bleues). Des particules immatures (flèches rouges) ainsi que partiellement immatures (flèches vertes) sont également visibles. Les mêmes types de particules sont également visibles dans un échantillon de DENV mature. La barre représente 500 Å.

En augmentant la population des virus infectieux, ces particules contribuent donc sûrement à la pathogénicité des flavivirus. L'exposition de structures protéiques matures et immatures sur la même particule virale pourrait ainsi leur donner un avantage afin d'échapper au système immunitaire.

L'existence et l'importance des virus partiellement maturés doit être de fait prise en compte lors de la mise au point de vaccins. Cette recherche a permis à la communauté scientifique de mieux appréhender le rôle joué par les anticorps dirigés contre la boucle de fusion,¹⁷⁻¹⁹ ainsi que l'importance des virions partiellement maturés,^{15,20,21} lors de l'infection par un flavivirus. Cette étude contribue ainsi à faire progresser la recherche de vaccins dirigés contre le virus de la dengue.²²

Ces deux projets de recherche m'ont permis de me former, puis de devenir rapidement autonome, à l'analyse et au traitement des données de microscopie électronique. J'ai pu aussi apprendre à analyser les reconstructions obtenues, ainsi qu'à réaliser le recalage moléculaire de la structure cristallographique de la protéine lorsqu'elle est disponible. J'ai également enrichi mes connaissances sur les virus d'eucaryotes. Enfin, cette expérience m'a permis de découvrir et de m'adapter au système de recherche anglo-saxon.

2.2 Scientifique sur la ligne de lumière BM16 de l'ESRF

Dates : Septembre 2009 - Juin 2011

Laboratoire : Ligne de lumière BM16 – European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) – Grenoble – France

Responsable de la ligne de lumière BM16 : Wilfried Schildkamp

A mon retour des États-Unis, j'ai rejoint, en tant que scientifique, la ligne de lumière espagnole BM16 à l' « European Synchrotron Radiation Facility » (ESRF) de Grenoble. La ligne BM16 présentait la particularité d'avoir la capacité de réaliser des expériences de diffraction aux rayons-X sur cristaux, ainsi que des collectes de données de diffusion des rayons-X aux petits angles (SAXS). J'ai ainsi pu acquérir de nouvelles compétences techniques concernant le développement et le réglage d'une ligne de lumière de synchrotron. Ces deux années ont également été très riches scientifiquement car ma position d'aide aux utilisateurs (« local contact ») m'a permis de tisser des liens avec les utilisateurs français et étrangers de BM16. En parallèle de cette activité, mon poste de scientifique de ligne impliquait une activité de recherche pour laquelle j'ai établi des collaborations avec différents membres permanents du groupe Métalloprotéines de l'IBS, dirigé par J.C. Fontecilla-Camps. Celles-ci m'ont permis à la fois de développer mes propres projets de recherche, ainsi que d'apporter mon expertise sur des sujets développés au sein du groupe.

2.2.1 Étude par diffusion aux petits angles de la protéine HydG

Pour le premier de ces projets, j'ai collaboré avec Y. Nicolet et J.C. Fontecilla-Camps du groupe Métalloprotéines de l'IBS. Ce travail a consisté en l'étude de l'enzyme bactérienne HydG,²³ impliquée dans la maturation des hydrogénases à fer-fer, grâce à la production de molécules de CN⁻ et CO.^{24,25} Même si la structure tridimensionnelle précise d'HydG était inconnue, nous envisagions à l'époque qu'elle respecte un repliement « TIM-barrel » contenant un agrégat [4Fe-4S]²⁺ comme un grand nombre de protéines de la famille des radical S-adénosyl-L-méthionine (SAM) à laquelle HydG appartient. Il s'agit d'une enzyme exceptionnelle fonctionnant comme une « nano chaîne de montage », puisque les différentes étapes de la réaction (clivage de la SAM, formation / par chimie radicalaire, de déhydroglycine / synthèse de CO et CN⁻) se produisent le long du « TIM-barrel », commençant au premier agrégat [4Fe-4S]²⁺ et finissant au second [4Fe-4S]²⁺ de la protéine. D'après les analyses de séquence, ce dernier devait être contenu dans le domaine C-terminal, lui-même probablement localisé à la partie N-terminale du tonneau-β. La localisation de ce domaine est donc importante

pour la compréhension de la réaction catalysée. Aucun cristal d'HydG n'étant disponible à l'époque, nous avons décidé de l'étudier par diffusion des rayons-X aux petits angles. Les deux agrégats $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ d'HydG la rendent extrêmement sensible à l'oxygène, et elle doit donc être maintenue dans une atmosphère anaérobie. C'est la raison pour laquelle j'ai développé, avec F. Fauth et E. Fraga de l'équipe de BM16, une cellule permettant la collecte de données SAXS en conditions anaérobies, adaptée aux contraintes de notre ligne de lumière (Figure 9).

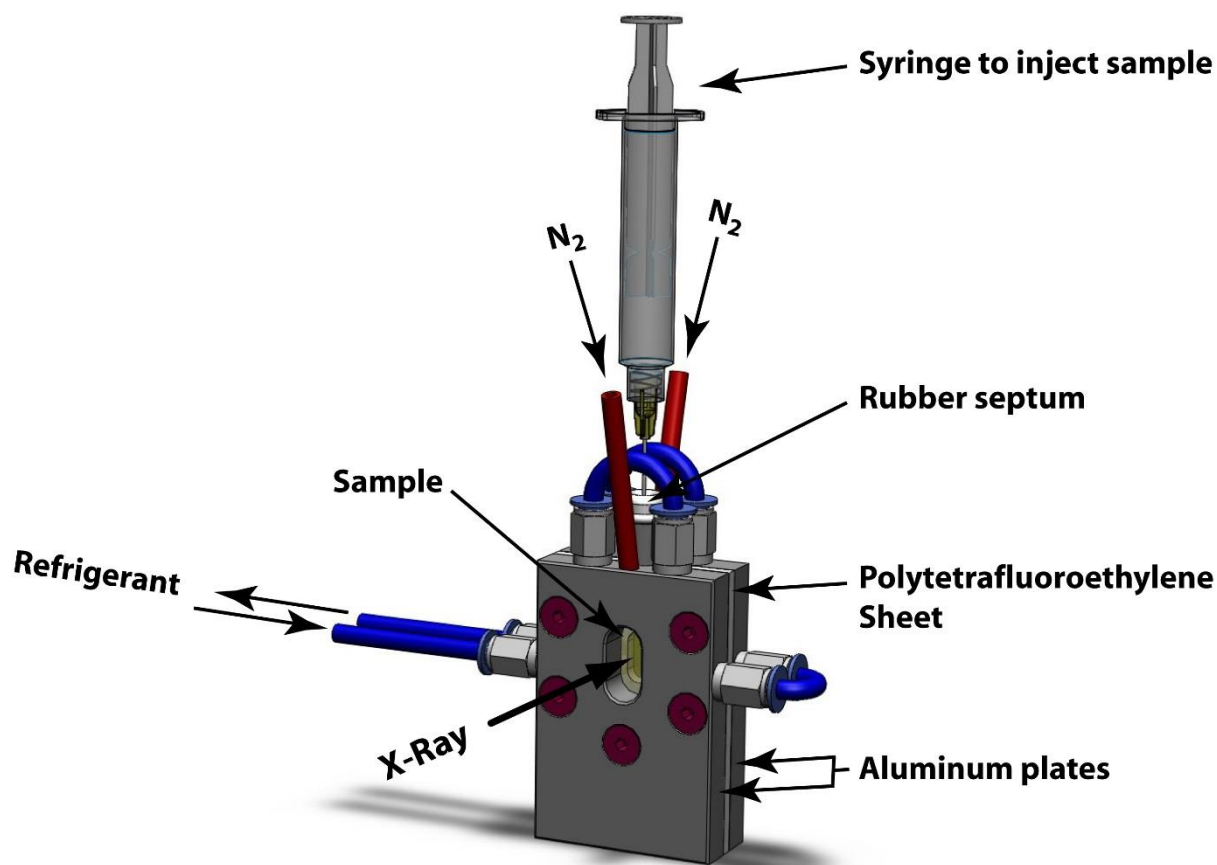


Figure 9 : Cellule SAXS anaérobie de BM16.

Nous avons ensuite collecté des données de diffusion aux petits angles à partir de la protéine HydG de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*Tte*) sauvage, mais aussi d'un mutant de la protéine ne contenant plus le domaine C-terminal.²⁶ La comparaison des enveloppes SAXS calculées suggèrent alors que le domaine C-terminal est étroitement associé au domaine « TIM-barrel », plaçant ainsi le second agrégat $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ spatialement proche du produit de la réaction radicalaire, nécessaire à la synthèse d'une molécule de CO. Ceci a constitué le premier résultat structural expérimental obtenu sur la protéine HydG (Figure 10).

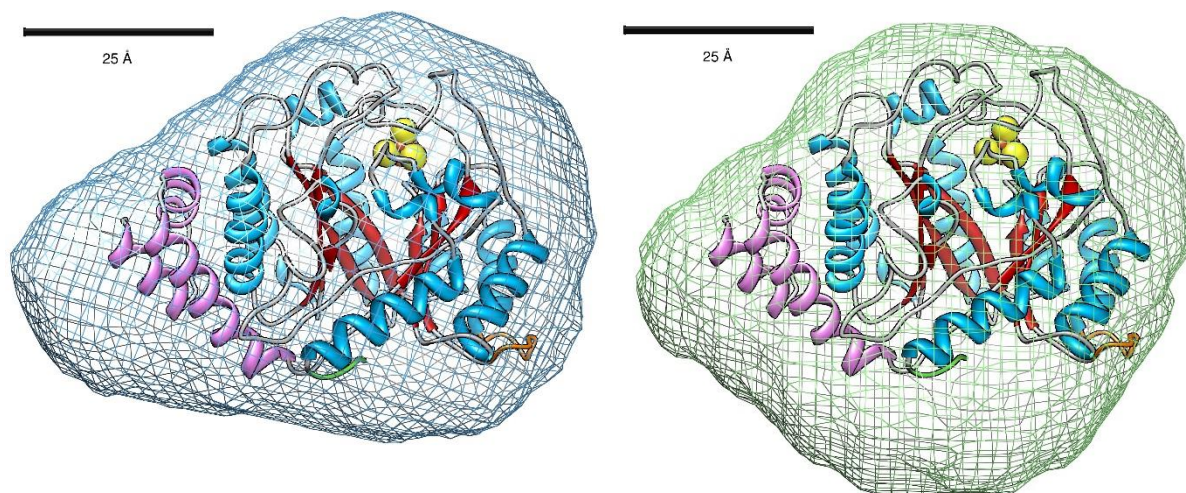


Figure 10 : Recalage moléculaire du modèle obtenu par homologie de séquence de *TteHydG*^{A91} (sans le domaine C-terminal) dans les enveloppes SAXS de *TteHydG*^{A91} (bleu) et *TteHydG* (vert). Les structures secondaires de *TteHydG*^{A91} sont colorées en bleu, rouge et gris pour les hélices, les feuillettes et les boucles respectivement, à l'exception des premières hélices qui sont colorées en rose et qui ne font pas partie du TIM-barrel. Les résidus 180 à 190 et 406 à 410 sont colorés en orange et vert, respectivement. Les sphères jaunes et marron représentent l'agrégat [4Fe-4S].
Étude structurale de la quinolate synthase NadA

2.2.2 Étude structurale de la quinolate synthase NadA

J'ai également participé à l'étude structurale de NadA, une métalloenzyme impliquée, chez les procaryotes, dans la synthèse du NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) à partir de l'aspartate. Ce projet était le fruit d'une collaboration avec, d'une part J.C. Fontecilla Camps du groupe Métalloprotéines de l'IBS, et d'autre part S. Ollagnier - de Choudens de l'équipe biocatalyse (LCBM – IRTSV – CEA Grenoble). Le fait que la majorité des eucaryotes et des procaryotes dispose de voies de biosynthèse du NAD distinctes, fait de NadA une cible thérapeutique potentielle importante pour le développement de nouveaux antibiotiques. A cause de la complexité de la réaction (bi-moléculaire et impliquant une espèce instable, l'iminoaspartate), et de la sensibilité à l'oxygène de l'agrégat [4Fe-4S]²⁺, le mécanisme de la réaction catalysée par NadA n'était pas connu. La compréhension de ce dernier s'avérait donc un réel défi et la résolution de la structure de l'holoenzyme (contenant le centre [4Fe-4S], donc active) était une avancée importante. Lorsque nous avons commencé l'étude structurale de cette enzyme en 2009, seule la structure de l'apoenzyme (sans agrégat [4Fe-4S], donc inactive) de *Pyrococcus furiosus* était connue.²⁷ Nous avons alors essayé de résoudre la structure holo de NadA de *Thermotoga maritima* (*TmNadA*) en conditions anaérobies strictes.

Nous avons assez rapidement réussi, d'une part à obtenir des cristaux de *TmNadA* de couleur marron (Figure 11), ce qui suggère l'intégrité de l'agrégat et, d'autre part à collecter un jeu de données de diffraction. Malheureusement, la résolution de sa structure n'a pas pu aboutir à partir de cette forme cristalline, à cause principalement d'un problème de macle.



Figure 11 : Cristaux de *TmNadA*

La solution à ce problème arriva en 2013 lorsque nous avons cristallisé le mutant K219R de la protéine dans une nouvelle forme cristalline. La mutation de la lysine 219 fut choisie car elle devait être localisée en surface de la protéine. Les données de diffraction que nous avons alors enregistrées nous ont permis de résoudre la structure de l'holoenzyme. Il apparaît que les trois domaines de la protéine sont associés de manière à former un tunnel au fond duquel se trouve l'agrégat $[4Fe-4S]^{2+}$, et donc le site actif (Figure 12).²⁸

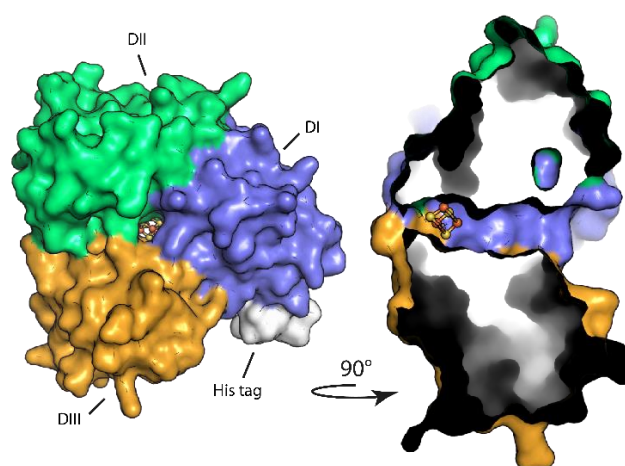


Figure 12 : Structure du mutant K219R de *TmNadA*. Gauche : Les trois sous-unités sont colorées respectivement en bleu, vert et orange. Le centre $[4Fe-4S]^{2+}$ présent au fond du tunnel est représenté en boules et bâtons. Droite : coupure sagittale de la protéine montrant le tunnel entre la surface et le site catalytique.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de la réaction catalysée par NadA, nous avons réalisé l'accostage moléculaire du dernier intermédiaire de réaction, le 5-hydroxy-4,5-dihydroquinolate (5-OH-4,5-DHQA), qui une fois déshydraté, forme l'acide quinolinique (Figure 13).

Le seul résidu idéalement placé pour réaliser cette étape est la Tyr21, conservée chez toutes les protéines NadA. De plus, cet acide aminé est proche d'une triade Thr229-His171-Glu195, elle aussi conservée, rappelant celles présentes dans les protéases et les hydrolases. En réalisant une étude de mutagenèse de ces résidus en collaboration avec

S. Ollagnier – de Choudens, nous avons mis en évidence que ces quatre acides aminés sont essentiels pour l'activité de l'enzyme, ce qui suggère que la Tyr21, une fois déprotonée en ion phénolate par la triade, jouerait le rôle du nucléophile nécessaire à la formation de l'acide quinolinique. Ce mécanisme de déshydratation présente la particularité de différer de ce que l'on trouve chez les aconitases qui sont l'archétype des déshydrogénases à [4Fe-4S]. Cette structure a par la suite ouvert la voie à plusieurs études structurales et fonctionnelles qui continuent à faire progresser notre connaissance du mécanisme de cette enzyme.^{29,30}

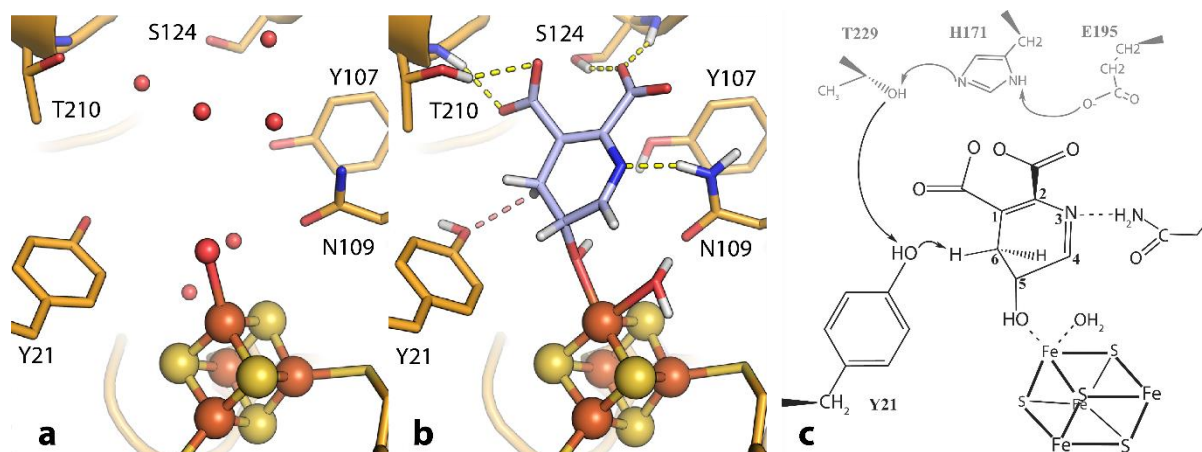


Figure 13 : (A) Vue du site actif de de *TmNadA* ; (B) Position la plus probable du 5-OH-4,5-DHQA obtenue par accostage moléculaire ; (C) Représentation schématique du mécanisme de déshydratation du 5-OH-4,5-DHQA.

2.2.3 Utilisation de la protéine Nika pour comprendre le mécanisme d'une hydroxylation aromatique intramoléculaire

Grâce à mon expertise concernant la cristallographie des protéines, et surtout mes connaissances sur la protéine Nika, qui est impliquée dans l'import du nickel chez *Escherichia coli* et que j'avais étudiée pendant ma thèse, j'ai participé à un projet ayant pour objectif de transformer cette protéine en métalloenzyme artificielle en se servant de sa capacité à fixer un complexe de FeEDTA. Ce travail est le fruit d'une collaboration entre l'équipe de S. Ménage (BioCE-LCBM – IRTSV – CEA Grenoble) et C. Cavazza, et J.C. Fontecilla-Camps du groupe Métalloprotéines de l'IBS. L'objectif est d'obtenir des catalyseurs respectueux de l'environnement, en combinant les atouts respectifs de la chimie inorganique et de la catalyse enzymatique.

La première étape a été d'utiliser la cristallographie aux rayons-X des protéines et la chimie inorganique afin de suivre la cinétique, à l'intérieur d'un cristal de Nika, d'une réaction d'hydroxylation aromatique intramoléculaire d'un catalyseur inorganique de fer. Cette étude a débouché sur la caractérisation, structurale et spectroscopique, de quatre intermédiaires de la réaction, ainsi que du produit de l'hydroxylation aromatique par l'O₂ (Figure 14).³¹ Ceci n'a été

possible que grâce aux contraintes et au ralentissement de la réaction imposés par l'environnement protéique.

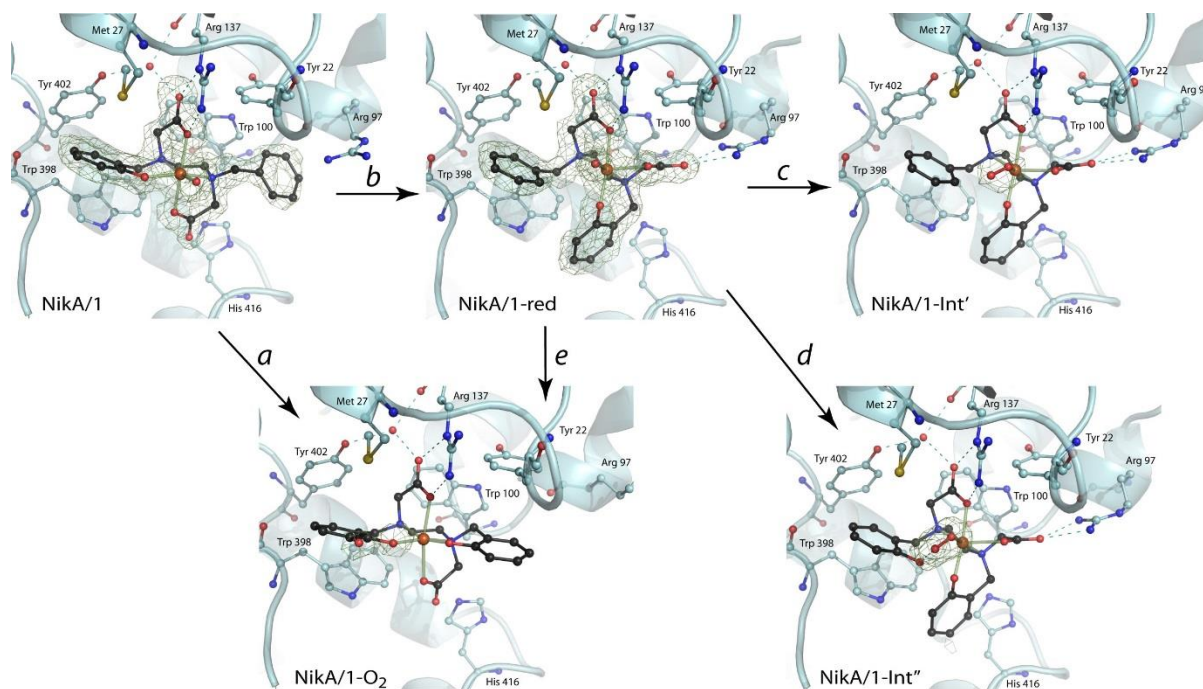


Figure 14 : Structures cristallines et cartes de densité électronique « omit » du complexe 1, dans différents états d'hydroxylation, dans le site de fixation de NikA.

Ce travail a permis une meilleure compréhension du fonctionnement des monooxygénases et la mise en évidence, pour la première fois en chimie inorganique, de la structure d'un intermédiaire Fe(III) (hydro) peroxy (Nika/1-Int'' dans la Figure 14). Ces résultats ont également montré que l'introduction de complexes inorganiques dans une protéine permet de stabiliser et piéger des intermédiaires de réaction autrement difficilement accessibles en chimie.

Le gouvernement espagnol a décidé de fermer définitivement la ligne de lumière BM16 mi-2011 à la suite de la construction du synchrotron ALBA à Barcelone, mettant ainsi un terme à mon contrat de scientifique de ligne. Pendant cette expérience postdoctorale j'ai pu, entre autres, me former à la manipulation de protéines sensibles à l'oxygène dans des conditions d'anaérobiose stricte, ainsi qu'au développement et au réglage d'une ligne de lumière de synchrotron. De plus, de par l'aspect international de l'ESRF, j'ai continué à évoluer au sein d'un environnement de travail anglophone.

2.3 Études structurales de métalloprotéines artificielles et bioinformatique

Dates : Juillet 2011 – Août 2013

Laboratoire : Groupe Métalloprotéines - Institut de biologie structurale (IBS) – Grenoble – France

Responsable du laboratoire : Juan Carlos Fontecilla-Camps

2.3.1 Mise au point de métalloenzymes artificielles : NikA

Après mon contrat de scientifique sur la ligne de lumière BM16, j'ai intégré le groupe Métalloprotéines de l'IBS, où j'ai continué à travailler, entre autres, sur les projets « métalloenzymes artificielles » avec C. Cavazza. J'ai ainsi participé à l'étude de nouveaux hybrides [protéine NikA- complexe inorganique dérivés de l'EDTA], dans l'objectif de créer des monooxygénases artificielles capables de catalyser, de façon énantiosélective, des réactions de sulfoxydation à partir de la protéine NikA. Cette dernière n'a aucune activité enzymatique intrinsèque. Comme précédemment, ce travail fut le fruit d'une collaboration entre notre laboratoire et l'équipe de S. Ménage (BioCE-LCBM – IRTSV – CEA Grenoble). J'ai alors pu résoudre les structures cristallographiques de quatre de ces hybrides (Figure 15).

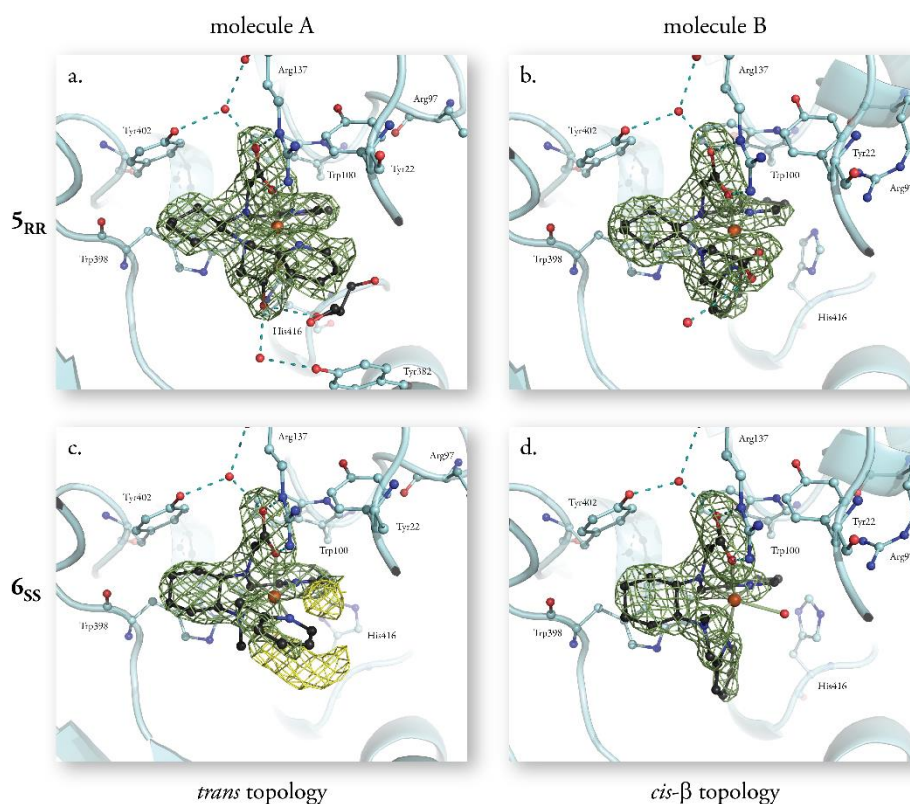


Figure 15 : Structure cristalline des complexes 5_{RR}⊂NikA et 6_{SS}⊂NikA. La densité électronique omis contourée à 3 σ est représentée en vert. La densité jaune correspond à une molécule ou un ensemble de molécules non identifiées.

Cela a permis de démontrer la capacité de NikA à pouvoir fixer avec une bonne affinité une grande variété de molécules, à partir du moment où elles conservent les deux azotes et un des carboxylates de l'EDTA trouvé dans la structure originale.

Afin de mieux comprendre comment les complexes sont fixés dans le site de NikA, nous avons réalisé au laboratoire, avec P. Amara, des calculs quantiques qui ont permis la visualisation des interactions non covalentes du complexe inorganique avec les résidus de la protéine (Figure 16). Les liaisons hydrogène du type CH- π , décrites comme faibles, se sont alors révélées jouer un rôle très important dans la fixation, l'orientation et la topologie du complexe inorganique.³² Cette étude a permis de définir les différents facteurs à considérer lors de la synthèse de métalloenzymes artificielles.

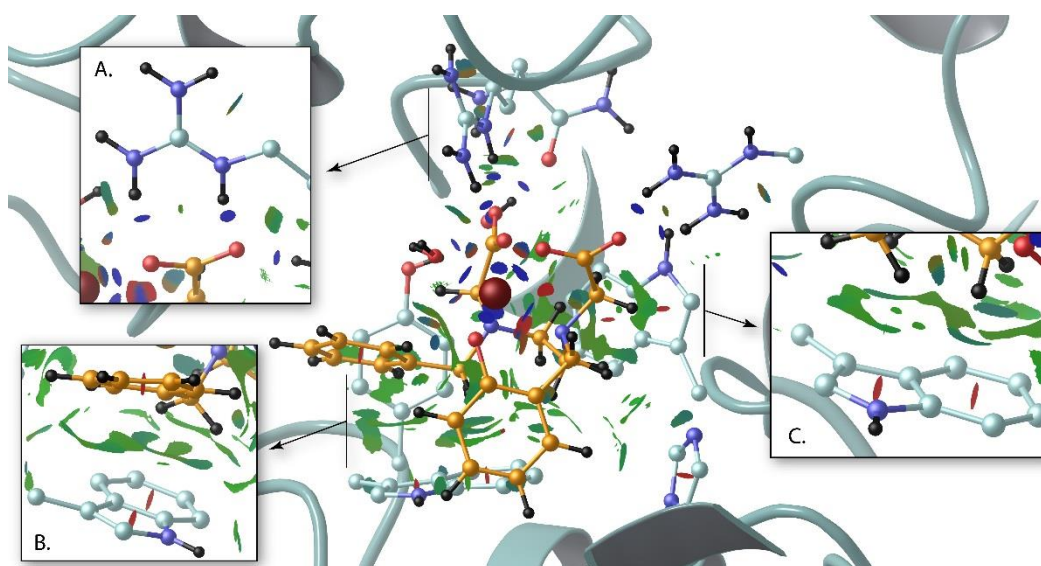


Figure 16 : Modèle utilisé pour calculer les interactions non covalentes entre différents ligands et NikA. Elles sont colorées en fonction de la force d'interaction (de -0.02 (bleu) à +0.02 (rouge) en passant par 0 (vert)). Un exemple de pont salin, de CH- π et d'interaction π - π est montré dans les inserts A, B et C respectivement.

Grâce à ces résultats, nous avons ensuite pu créer une métalloenzyme artificielle capable de catalyser une réaction de sulfoxydation sur des substrats que nous avons sélectionnés par des calculs d'accostage moléculaire *in silico*. Ces calculs ont été réalisés par P. Amara en utilisant la banque de molécules commerciales ZINC,³³ ainsi que les structures des hybrides résolues dans notre étude précédente. Une famille de molécules ayant une structure proche du principe actif de certains médicaments a alors été identifiée, comme par exemple le modafinil® (traitement de la narcolepsie). Les expériences de catalyse alors menées par nos collaborateurs chimistes ont ainsi pu montrer que les complexes inorganiques sélectionnés n'ont aucune activité en milieu aqueux, mais qu'une fois insérés dans la protéine NikA, ils permettent de catalyser la sulfoxydation des nouveaux substrats avec une forte réactivité et une excellente chimiosélectivité (production exclusive de sulfoxydes et absence de sulfones) (Figure 17). Cette

étude a clairement mis en évidence l'effet synergique des trois partenaires de la réaction que sont la protéine, le catalyseur et le substrat, pour catalyser des réactions avec une haute réactivité et spécificité. Tous trois doivent être considérés lors de la mise au point de nouvelles métalloenzymes. A terme, cette étude pourrait permettre la synthèse d'une large variété d'analogues de médicaments, en respectant les principes de la chimie verte.³⁴

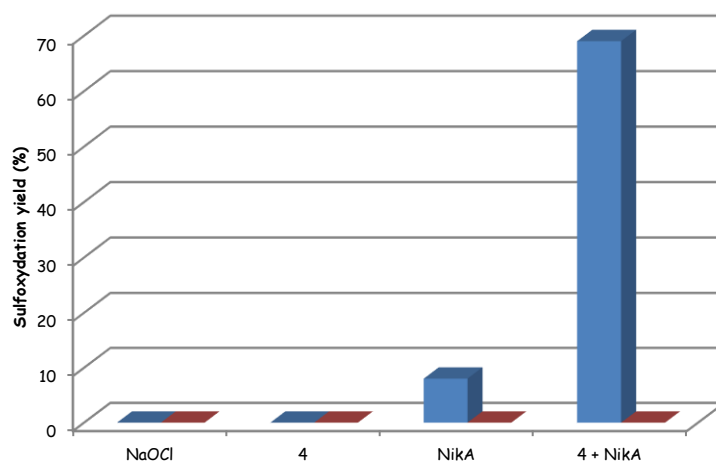


Figure 17 : Réactivité du complexe 4 avec le nouveau substrat. Les sulfoxydes et les sulfones sont représentés en bleu et rouge respectivement.

2.3.2 Mise au point de métalloenzymes artificielles : la papaine

Nous avons également réalisé une étude similaire dans le cadre d'une collaboration de J.C. Fontecilla-Camps avec l'équipe de M. Salmain, Chimie ParisTech (ENSCP). Une partie du projet a consisté en une étude d'hybrides de la papaine, dont la cystéine catalytique libre est modifiée de façon covalente par des complexes de ruthénium connus pour catalyser des réactions d'hydrogénation (Figure 18).

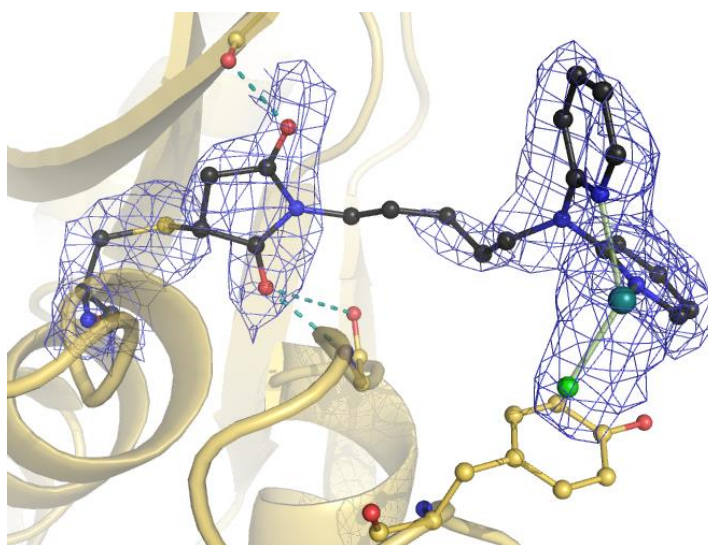


Figure 18 : Structure cristalline et carte de densité électronique 2Fo-2Fc (bleu) de cristaux de l'hybride PAP-PH2191. Le ruthénium (bleu-vert) est lié aux deux pyridines (bleu) et à un ion chlore (vert).

En utilisant conjointement la cristallographie aux rayons-X et la spectrométrie de masse, nous avons montré qu'un des hybrides catalyse une hydroxylation énantiosélective des deux résidus tyrosine proches de l'atome de ruthénium, ce qui a constitué une réaction parasite inattendue (Figure 19). Grâce à ces données et à des calculs théoriques, nous avons été en mesure de proposer un mécanisme pour chacune des deux hydroxylation.³⁵

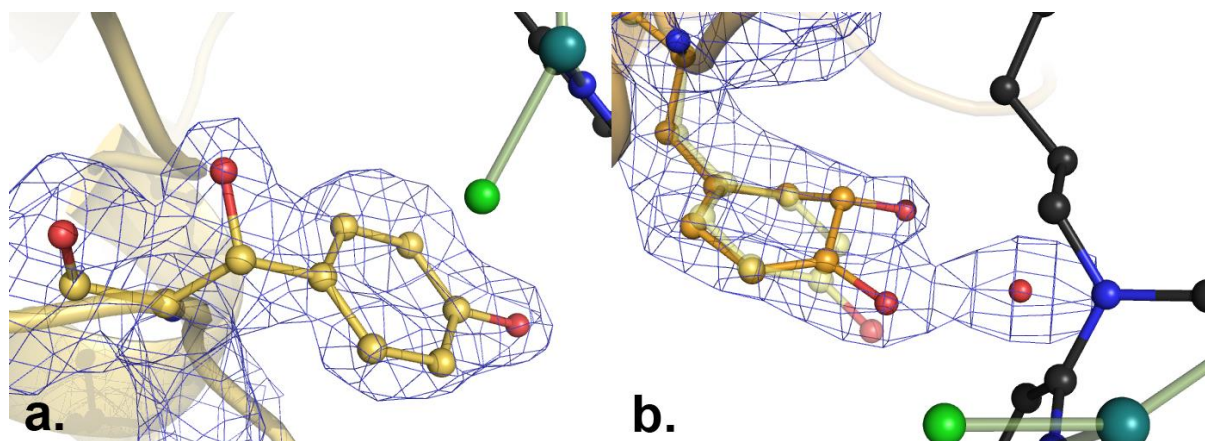


Figure 19 : Structure et carte de densité électronique (bleu) des tyrosines 61 (a.) et 67 (b.) hydroxylées en position C β et *ortho* de la fonction alcool, respectivement.

La Tyr61 (Figure 19A), la plus proche du complexe métallique, serait hydroxylée sur son C β de la façon suivante (Figure 20A) :

- L'O₂ atmosphérique se lie d'abord au Ru(II) en déplaçant son ligand chloro ;
- L'oxygène est alors réduit d'un électron produisant un superoxyde Ru(III) – OO[•] ;
- Cette espèce extrait alors un atome d'H de la Tyr61 formant ainsi Ru(III) – OOH et [•]C β ;
- Enfin le peroxyde -OOH subit un clivage homolytique de la liaison O – O, générant d'une part, un radical [•]OH qui réagit alors avec radical C β de la Tyr61 permettant ainsi son hydroxylation, dans une variation d'un « oxygen rebound mechanism » et d'autre part d'un Ru(IV)=O.

Dans un second temps, il se pourrait que le Ru(IV)=O génère une radical alkyl (R[•]) à partir de molécules du solvant, comme par exemple l'acétate. Ce radical pourrait alors migrer vers la Tyr67 et réagir avec une molécule d'H₂O pour donner un radical HO[•], qui pourrait enfin hydroxyler la Tyr67 en position *ortho* de son cycle aromatique (Figure 19B et Figure 20B).

Ce système constitue alors un modèle des dommages radiatifs subis par les protéines, provoqués par exemple par des radiations ionisantes ou des fuites de radicaux de la mitochondrie. Ce travail montre que même si les radicaux hydroxyles ont une durée de vie courte (environ 10⁻⁹ s) et sont extrêmement réactifs, ils n'hydroxylent pas aléatoirement les

résidus de la protéine mais peuvent avoir, au contraire, une réactivité très ciblée et énantiosélective.

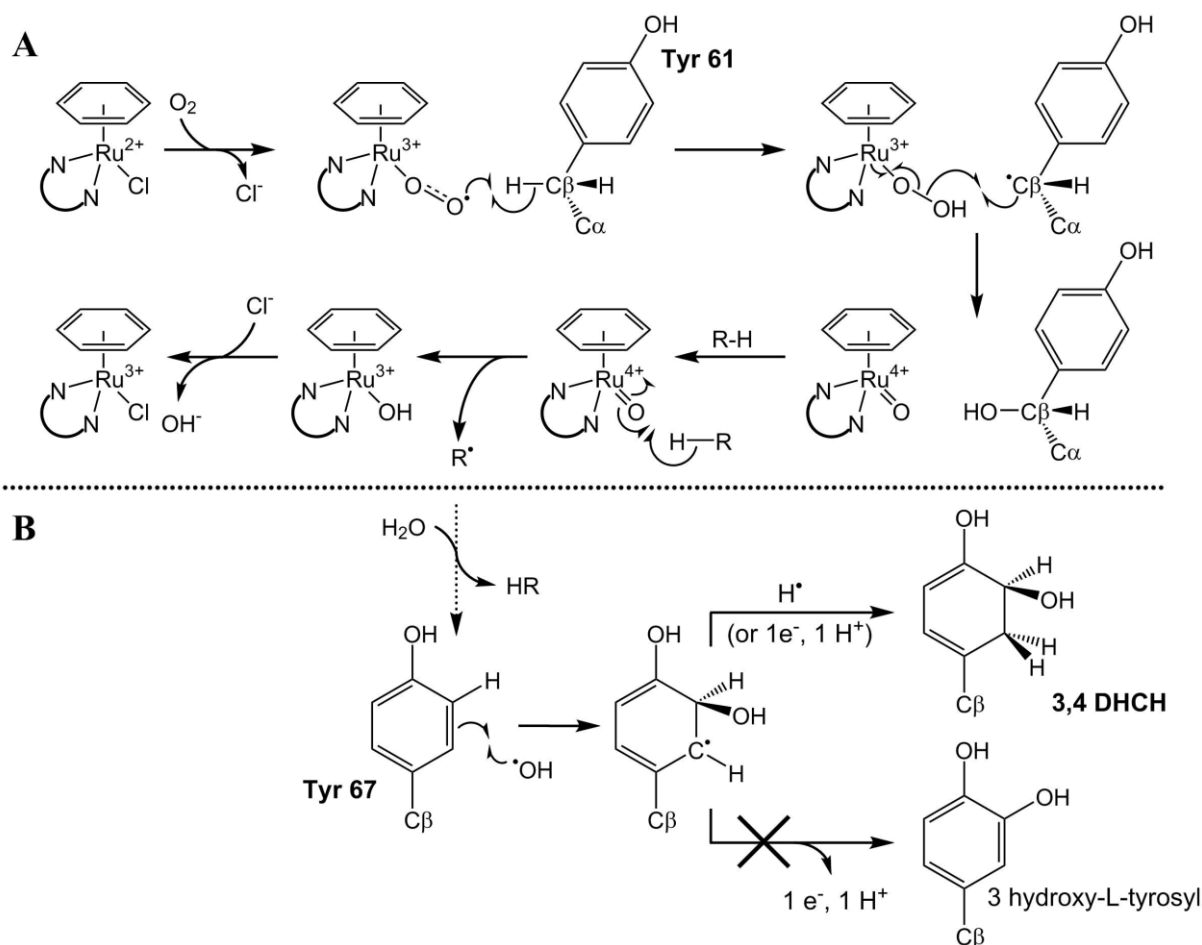


Figure 20 : Mécanisme proposé pour (A) l'hydroxylation du C_β de la Tyr61 ; (B) la position *ortho* du cycle de la Tyr67.

2.3.3 Mise au point de métalloenzymes artificielles : La β-lactoglobuline

Dans le cadre de la même collaboration, nous avons également travaillé à l'étude de la β-lactoglobuline transformée en métalloenzyme artificielle grâce à la fixation de lipides modifiés par l'ajout d'une tête composée d'un complexe de ruthénium ou de rhodium. L'objectif de ce projet était de catalyser des réactions d'hydrogénation énantiosélective. Nos collaborateurs parisiens ont synthétisé plusieurs complexes inorganiques, qui, une fois introduits dans la protéine, sont capables de catalyser des réactions d'hydrogénation.³⁶ J'ai ainsi pu résoudre la structure de treize hybrides différents, et notamment celle de l'hybride présentant l'excès énantiomérique le plus important : 26%. Dans cette structure, la tête du complexe de rhodium est désordonnée et donc que partiellement visible. Grâce à une étude de mécanique moléculaire, réalisée par P. Amara, ayant pour objectif d'identifier les conformations du complexe correspondant à un minimum énergétique, nous avons pu montrer que la tête du

complexe de rhodium n'adopte qu'un nombre limité de conformations, orientant le site labile du métal (le chlore) dans une direction similaire (Figure 21). Le fait que le complexe inorganique ne se fixe pas dans la protéine de façon aléatoire expliquerait l'excès énantiomérique mesuré.^{37,38}

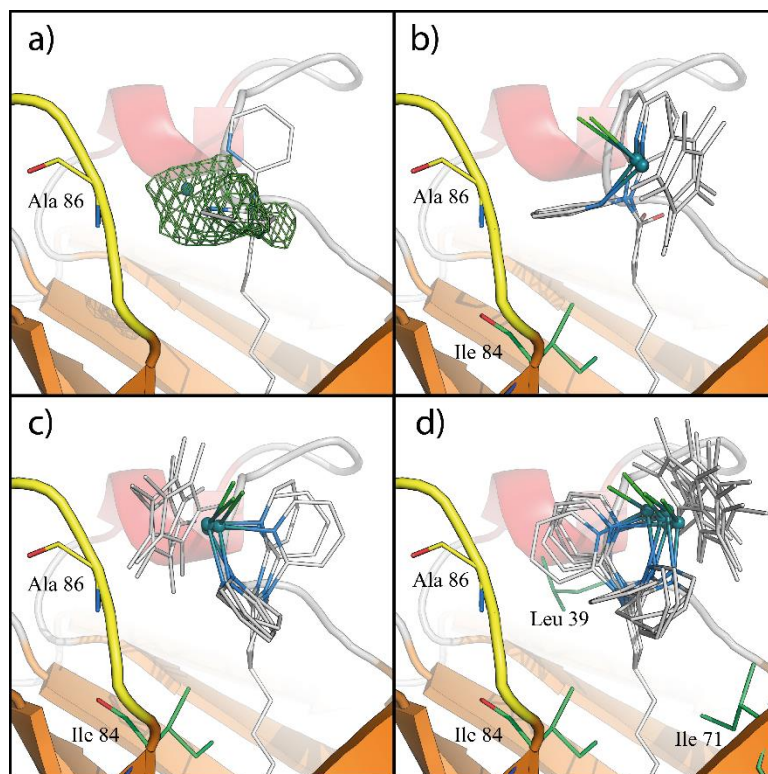


Figure 21 : A. Modèle cristallographique et densité électronique ($F_o - F_c$) « omit » contournée à 3σ (vert). B, C et D présentent les trois familles de conformations de la tête du complexe de rhodium trouvées par nos calculs. La β -lactoglobuline est représentée en rubans. Le complexe inorganique de ruthénium est représenté sous forme de bâtons, avec le métal représenté sous forme d'une sphère verte.

Ces différents projets d'études structurales de métalloprotéines artificielles m'ont permis de mieux comprendre les modes d'interaction entre la protéine et les différents catalyseurs chimiques insérés, et notamment le rôle des contacts de faible énergie, nous faisant ainsi progresser dans notre maîtrise de la création de métalloenzymes artificielles.

2.3.4 Etude bioinformatique des NADPH oxydases de la famille NOX

Les NADPH oxydases de la famille NOX sont des métalloprotéines facilitant le transfert des électrons à travers les membranes biologiques. En général, l'accepteur d'électrons est l'oxygène et le produit du transfert d'électrons est l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), précurseur des formes réactives de l'oxygène, les ROS (« *reactive oxygen species* »). En quelques années, le nombre de protéines NOX identifiées a rapidement augmenté.^{39,40} De plus en plus d'études tendent à prouver que les ROS synthétisées par les NOX jouent un rôle central dans des mécanismes aussi différents que ceux de l'immunité innée, de la prolifération cellulaire, de

l'apoptose, de la maturation des hormones thyroïdiennes, de la sénescence, de la différenciation cellulaire, de la maturation de la matrice extracellulaire ou encore la signalisation moléculaire. La délétion ou l'altération des NOX peut induire de sérieuses pathologies comme certains adénocarcinomes, l'athérosclérose, des maladies cardiovasculaires, l'infertilité, des maladies neurodégénératives ou encore la granulomatose septique chronique (CGD). Des efforts importants ont donc été faits depuis ces trente dernières années afin de mieux comprendre le fonctionnement des NOX, mais beaucoup de questions restent en suspens, surtout au niveau des mécanismes moléculaires mis en place par la NADPH oxydase pour permettre le transfert des électrons à travers la membrane cytoplasmique. Jusqu'à aujourd'hui, les NOX sont décrites comme étant strictement présentes chez les cellules eucaryotes. Mon collaborateur, J. Dupuy de l'IBS de Grenoble, a néanmoins identifié une protéine procaryote qui présente l'ensemble des caractéristiques décrites pour la famille des NOX. Nous nous sommes alors demandé si cette famille de protéine était, comme cela avait été suggéré depuis de nombreuses années, exclusivement eucaryote, ou au contraire si les NOX étaient également très répandues dans le règne procaryote. Pour répondre à cette question, il n'était pas possible d'utiliser une approche classique de recherche d'homologues par identité de séquence en acides aminés, car les protéines de cette famille présentent la particularité d'être très divergentes entre elles. J'ai alors mis au point un programme informatique qui m'a permis de rechercher, dans l'ensemble des protéines de la banque de données Uniprot (78 037 012 séquences), toutes les séquences contenant les motifs caractéristiques des protéines NOX (domaine de fixation du FAD, domaine de fixation du NADPH, domaine transmembranaire, motif ligand histidine de l'hème) (Figure 22).

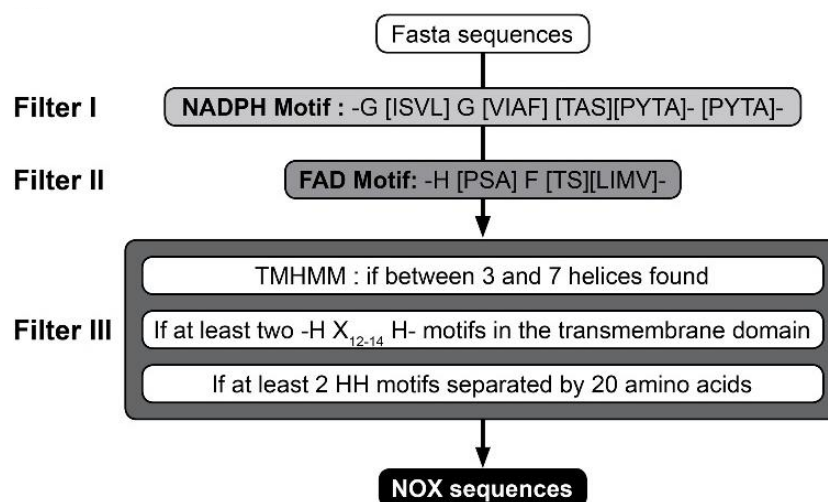


Figure 22 : Schéma de l'algorithme utilisé pour identifier des séquences de protéines appartenant à la famille des NOX à partir des séquences de la base de données UNIPROT.

Alors que jusqu'à présent seules 165 protéines NOX eucaryotes étaient connues, mon étude a permis d'identifier 4404 séquences, dont 996 proviennent d'organismes procaryotes (Figure 23). Il est à noter qu'aucune séquence de NOX n'a pu être identifiée chez les archées.

Ce résultat permet d'augmenter de façon importante les possibilités d'étude des protéines NOX. En effet, les NOX eucaryotes étant difficiles à analyser, leurs homologues procaryotes constitueront alors d'excellents modèles d'étude, plus faciles à manipuler. La structure des protéines NOX bactériennes devrait en effet être plus facilement obtenue que celle des protéines eucaryotes qui sont fortement glycosylées. Ce travail devrait ainsi permettre une avancée majeure dans la façon dont on étudie non pas seulement les NOX eucaryotes, mais aussi leurs équivalents procaryotes. Enfin, nous proposons également que les protéines de la famille des NOX jouent, chez les procaryotes, un rôle de communication intercellulaire, par exemple dans la formation et organisation des biofilms.⁴¹ Ce travail nous a également permis de déposer un brevet en France et à l'international⁴² et d'obtenir un contrat ANR coordonné par J. Dupuy.

3 Maitre de conférences UCBL

Dates : Septembre 2013 – Août 2016

Laboratoire : Biologie Structurale des Complexes Macromoléculaires Bactériens – Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) – Lyon – France

Responsable du laboratoire : Laurent Terradot

Lors de mon recrutement en tant que maître de conférences à l'Université Claude Bernard de Lyon, j'ai rejoint l'équipe de L. Terradot (CR1, CNRS) à l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP). J'ai alors réorienté mes recherches en m'intéressant principalement à l'étude structurale de deux processus bactériens fondamentaux, à savoir l'initiation de la réplication du génome et le système de sécrétion de type IV.

3.1 *Helicobacter pylori*

H. pylori est une bactérie à Gram négatif de forme spiralée, qui colonise exclusivement la muqueuse gastrique des primates. Afin de neutraliser son environnement, *H. pylori* tire profit de la capacité de son uréase à hydrolyser l'urée en ion ammonium et en dioxyde de carbone.⁴³ L'infection par *H. pylori* est vraisemblablement l'infection bactérienne la plus répandue, puisque l'on estime qu'au moins la moitié de la population mondiale en serait porteuse, avec un taux d'infection approchant les 90% dans les pays en voie de développement.⁴⁴

Eukaryotes

Bacteria

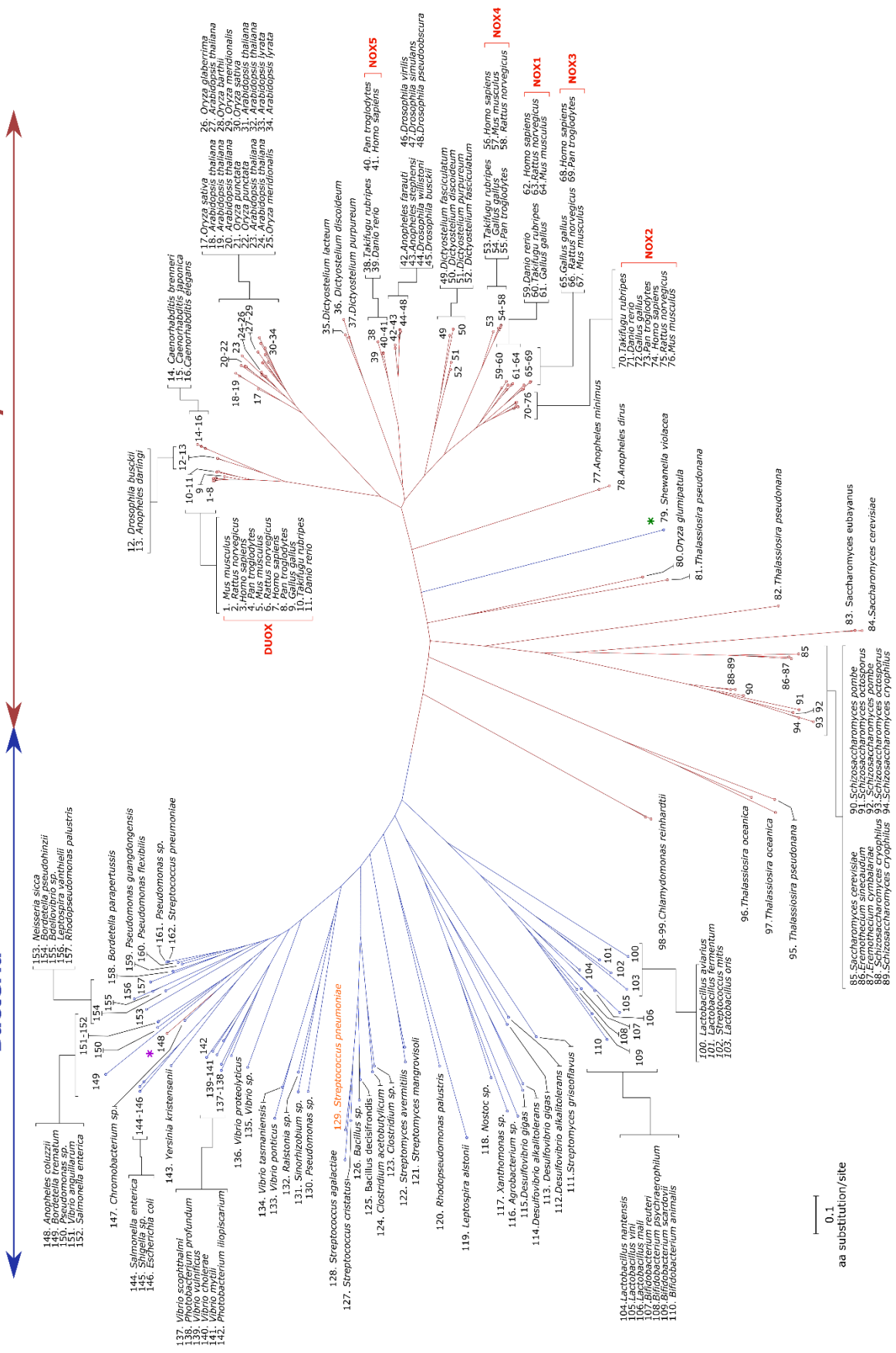


Figure 23 : Arbre phylogénétique de la famille des protéines Nox.

La bactérie est généralement acquise durant l'enfance et reste dans son hôte pendant des décennies en l'absence de traitement antibiotique spécifique.⁴⁵ Les génomes de nombreuses souches de *H. pylori* ont été séquencés et sont maintenant disponibles.⁴⁶ Les infections à *H. pylori* sont associées à un large spectre de pathologies gastroduodénales tels des gastrites chroniques, des ulcères duodénaux, et même des adénocarcinomes (B.J. Marshall et J.R. Warren : Prix Nobel de médecine 2005).⁴⁷ C'est d'ailleurs pour cette raison que l'Agence Internationale pour la Recherche contre le Cancer (IARC) l'a classée dans le groupe 1 des carcinogènes, au même titre que l'amiante ou les rayons-X. De plus, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer de l'estomac a été à l'origine de 754 000 décès dans le monde en 2015, ce qui en fait la quatrième cause de mortalité par cancer après celui des poumons et du foie. L'infection peut être combattue par un traitement intensif composé de trois antibiotiques. Cependant, il serait irréaliste de traiter la moitié de la population mondiale contre cette bactérie, même si des pays comme la France préconisent son éradication. Il est donc nécessaire de mieux comprendre comment cette bactérie survit et d'explorer l'influence des facteurs bactériens et humains pour diagnostiquer les individus à risque et développer de nouveaux traitements plus efficaces.

3.1.1 Etude structurale de la réplication

Jusqu'à présent, même si un grand nombre d'études ont pour vocation de comprendre les mécanismes liés au caractère pathogène d'*H. pylori* (facteurs de virulence, d'adhésion aux cellules humaines), peu d'entre elles se sont intéressées aux mécanismes fondamentaux de sa biologie, telles que la réplication, la transcription ou la traduction.

Les hélicases réplcatives sont des ATPases permettant l'ouverture des deux brins de l'ADN et ainsi sont indispensables à l'initiation de la réplication du génome et par la suite à son bon déroulement. L'hélicase réplcative d'*H. pylori* (*HpDnaB*) s'est révélée ne pas être un homohexamère, comme ce qui est décrit pour celle d'*Escherichia coli*, mais forme un dodécamère, comme ce qui peut exister chez des archées et des eucaryotes. Autre singularité de l'initiation de la réplication chez *H. pylori* : l'hélicase DnaB se fixe sur les simples brins de la boucle de réplication sans l'aide de la protéine chargeur DnaC présente chez *E. coli* mais absente ici.

Nous avons alors réalisé, en collaboration avec I. Gutsche et J. Timmins de l'IBS de Grenoble, une étude structurale et fonctionnelle de *HpDnaB*,⁴⁸ qui a commencé par l'obtention de sa structure cristallographique à 6,7 Å de résolution. Le dodécamère de *HpDnaB* est en réalité un dimère d'hexamères interagissant grâce aux domaines N-terminaux de la protéine

(Figure 24). Cette organisation a également pu être confirmée par une étude de la protéine par microscopie électronique en coloration négative.

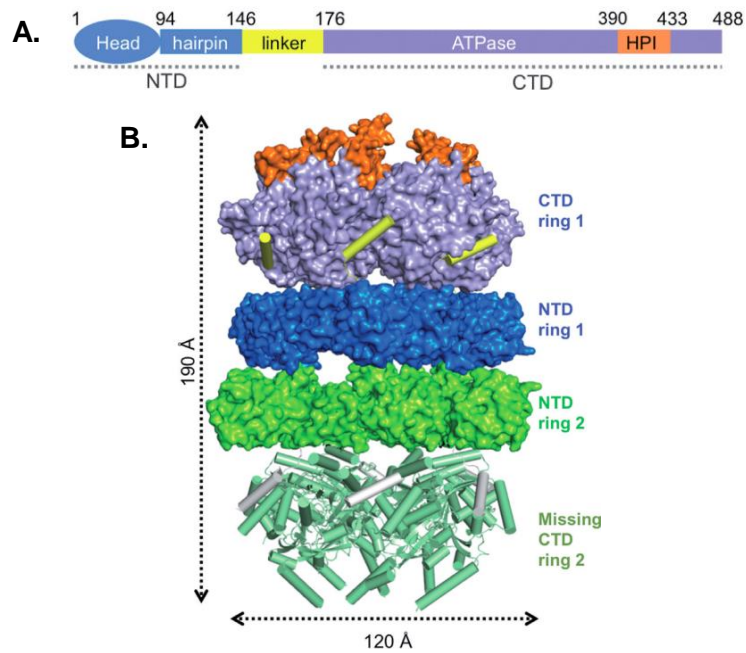


Figure 24 : (A) Représentation schématique de l'organisation des domaines de *HpDnaB* ; (B) Structure cristallographique de *HpDnaB*. Le premier hexamère est coloré comme en (A), et le second en vert. NTD : domaine N-terminal. CTD : domaine C-terminal.

Grâce à des expériences d'anisotropie de fluorescence, nous avons alors montré que le dodécamère de la protéine est bien capable d'interagir avec l'ADN simple brin, mais a une faible activité d'ouverture de l'ADN double brin. Par contre, nous avons montré par une étude SAXS, qu'en présence de la primase DnaG, responsable de la synthèse de la séquence d'ARN servant d'amorce pour l'ADN polymérase, *HpDnaB* est dissociée en hexamères. Dans cet état, la protéine est très active pour l'hydrolyse de l'ATP, et la fixation et ouverture de l'ADN. Ceci nous a alors permis de proposer un nouveau modèle de l'initiation de la réplication chez *H. pylori*, où deux dodécamères d'*HpDnaB* se fixent sur chaque ADN simple brin de la fourche de réplication, et c'est l'arrivée et la fixation de DnaG qui libère, pour chaque complexe, un des hexamères et démarre la réplication (Figure 25). Ce modèle peut aussi être transposé à d'autres organismes utilisant des hélicases répliquatives dodécamériques.

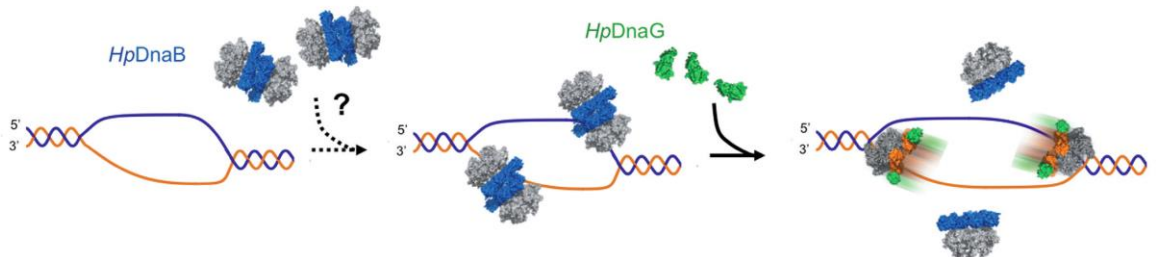


Figure 25 : Modèle d'initiation de la réplication chez *H. pylori*. La protéine DnaB est colorée en bleu pour son domaine N-terminal et en gris pour son domaine C-terminal. La protéine DnaG est colorée en vert. Les deux brins de l'ADN sont représentés en bleu et orange.

3.1.2 Le système de sécrétion de type IV

Toutes les souches d'*H. pylori* ne provoquent pas l'apparition d'un cancer de l'estomac, seules celles possédant un îlot de pathogénicité appelé *cagPAI* en sont capables. Il s'agit d'une région chromosomique composée de 28 gènes codant d'une part pour un système de sécrétion de type IV (*cagT4SS*) et d'autre part pour l'exotoxine CagA, qui est injectée dans la cellule épithéliale par ce dernier.^{49,50} A partir de ce moment-là, CagA va provoquer, dans les cellules où elle est présente, des changements de la dynamique membranaire, des réarrangements du cytosquelette, une désorganisation des jonctions cellulaires, une perte de polarité cellulaire, ainsi qu'une activation des gènes pro-inflammatoires (IL-8), anti-apoptotiques et de prolifération. L'ensemble de ces modifications en profondeur de la cellule peuvent conduire à terme à leur carcinogénèse.⁵¹ Il est donc fondamental de comprendre au mieux le mécanisme d'injection de CagA dans les cellules de l'épithélium gastrique par le système *cagT4SS* d'*Helicobacter pylori*. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés, avec nos collaborateurs des équipes de R. Haas (Max von Pettenkofer Institute, Munich) et de R. Fronzes (EICB, Bordeaux), à deux aspects :

- La composition du pilus (partie extracellulaire) du système de sécrétion. En effet, les protéines CagH, CagI, CagL et CagY sont suspectées de faire partie de *cagT4SS*,⁵² mais quasiment rien n'est connu sur les interactions entre elles et encore moins sur leurs rôles respectifs.
- Le mécanisme de détection de la cellule épithéliale cible par *H. pylori*, qui semble se faire grâce à l'interaction de certaines protéines du pilus du *cagT4SS* avec, entre autre, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.⁵³

Afin de mieux comprendre comment sont organisées et interagissent toutes ces protéines, et à plus long terme quelles sont leurs fonctions exactes, nous avons réalisé une étude d'interactions par Résonance Plasmodique de Surface (SPR) (Figure 26) entre :

- L'oncoprotéine CagA : la protéine entière ainsi que des mutants ne conservant que certains de ses domaines (domaine N-terminal et SLB).
- Les protéines suspectées comme faisant partie du pilus : CagY, CagF, CagI, CagL. Dans le cas de CagY seuls les domaines B10 et RII de la protéine ont été testés.
- L'intégrine $\alpha 5\beta 1$: l'ectodomaine ($\alpha 5\beta 1^E$) de la protéine sous forme ouverte et fermée, ainsi que la « tête » de l'intégrine ($\alpha 5\beta 1^{HP}$).

Cag protein	$\alpha 5\beta 1^E$	$\alpha 5\beta 1^E$	$\alpha 5\beta 1^{HP}$	$\alpha 5\beta 1^{HP}$
	forme fermée	forme ouverte	forme fermée	forme ouverte
CagA	126 ± 32	30 ± 4	nd	nd
CagA ^{NTD}	226 ± 109	56 ± 24	143	5 ± 2
CagA ^{SLB}	nd	153 ± 34	-	66 ± 12
CagL	183 ± 97	39 ± 20	-	-
CagI	-	15 ± 2	-	53 ± 24
CagY ^{B10}	237 ± 67	41 ± 8	-	-
CagY ^{RII}	-	-	-	-
Fibronectin	167 ± 87	39 ± 21	40	9

Immobilisé			
Injecté	CagL	CagI	CagY ^{B10}
CagA	213 ± 40	224 ± 50	47 ± 12
CagA ^{NTD}	70 ± 17	55 ± 23	76 ± 5
CagL	nd	nd	nd
CagI	nd	-	-
CagY ^{B10}	nd	-	24 ± 8

Figure 26 : Constantes de dissociation (K_D), données en nmol/L entre les différentes protéines testées dans cette étude. La fibronectine est un témoin de l'interaction avec l'intégrine. Le symbole « - » signifie que les deux protéines n'interagissent pas. « nd » signifie que l'interaction n'a pas été mesurée.

La réalisation de cet interactome nous a permis de mieux comprendre l'interaction des protéines du pilus avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et notamment que :

- Les protéines CagI, CagA, CagL et le domaine B10 de CagY (mais pas son domaine répété RRII) sont capables d'interagir avec l'ectodomaine de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec des affinités similaires à l'interaction de son ligand physiologique : la fibronectine.
- Cette interaction est plus forte lorsque l'intégrine est sous une forme activée, c'est à dire dans une conformation ouverte. Dans le cas de CagI, l'interaction n'est même possible que lorsque l'intégrine est activée.
- Les protéines CagI et CagA interagissent, au moins en partie, avec la « tête » de l'intégrine, contrairement à CagL et au domaine B10 de CagY.

Notre étude a de plus mis en évidence de nouvelles interactions entre CagA et CagL, CagA et CagYB10, et CagA et CagI. L'ensemble de ces résultats a ainsi permis de proposer un modèle de l'association des protéines du pilus avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Figure 27).⁵⁴

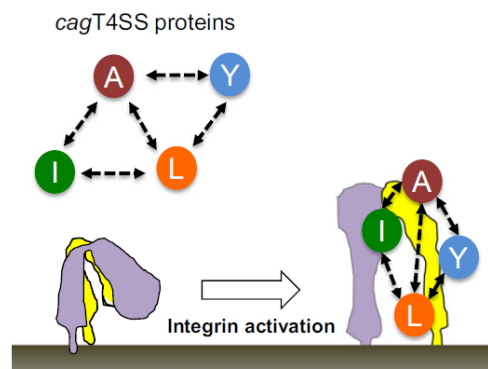


Figure 27 : Représentation schématique de l'interaction des protéines CagA, CagI, CagL et CagY entre elles et avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la surface de la cellule cible.

Il a été montré que les protéines CagH, CagI et CagL étaient capables de former un complexe ternaire.⁵⁵ Même si ces trois protéines ont des similarités de séquence faibles ou modérées, elles finissent toutes par un motif similaire de six acides aminés S/T-K-I/V-I-V-K, qui semble être important pour la capacité à injecter CagA dans la cellule cible.⁵⁵ Nos collaborateurs (W. Fischer, Max von Pettenkofer Institute, Munich) ont montré, grâce à des expériences de co-immunoprécipitation, que cet hexapeptide semble avoir un rôle dans la formation du complexe ternaire. Afin de comprendre le rôle exact de ce motif pour chacune des trois protéines et de tester leur capacité d'interaction nous avons exprimé et purifié les trois protéines sans leurs 7 derniers résidus (CagH $_{\Delta 7C}$, CagI $_{\Delta 7C}$, CagL $_{\Delta 7C}$). Au moment de mon départ de l'Université Claude Bernard de Lyon pour l'Université Grenoble Alpes, nous avons réussi à purifier les mutants CagI $_{\Delta 7C}$ et CagL $_{\Delta 7C}$. L'analyse de ces protéines est encore en cours.

3.2 Etude structurale de la régulation de la réplication de *Bacillus subtilis*

Le travail que j'ai mené sur l'initiation de la réplication chez *H. pylori* m'a mené à m'intéresser également à la bactérie à Gram positive *B. subtilis*. Chez cette bactérie, aucun des systèmes de régulation de l'initiation de la réplication, largement décrits chez *E. coli*, n'est présent. A la place, plusieurs autres systèmes ont été découverts ces quinze dernières années,⁵⁶ dont le régulateur principal : la protéine YabA.⁵⁷ Il a été montré que cette protéine inhibe l'initiation de la réplication en se fixant à la protéine DnaA, l'empêchant ainsi de polymériser sur l'ADN, et donc de provoquer l'ouverture de ce dernier au niveau de l'origine de réplication.⁵⁸ De plus, YabA interagit également avec DnaN, responsable de l'augmentation de la vitesse de la réplication.

Au laboratoire, nous avons résolu la structure cristallographique du domaine N-terminal de YabA (YabA $_{NTD}$) à 2.7 Å de résolution⁵⁹ (Figure 28) qui se révèle être constitué d'une seule longue hélice- α responsable de la tétramérisation de la protéine.

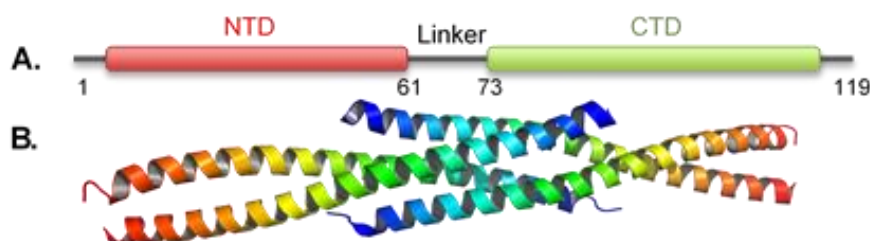


Figure 28 : (A) Représentation schématique de l'organisation des domaines de YabA (NTD : domaine N-terminal ; CTD : domaine C-terminal) ; (B) Structure cristallographique du domaine N-terminal de YabA.

Grâce à une collaboration qui a impliqué plusieurs laboratoires, notamment ceux de M.F. Noirot-Gros (AgroParisTech, Jouy-en-Josas) et A.J. Wilkinson (University of York) un

modèle par homologie du domaine C-terminal de YabA (YabA_{CTD}) a été calculé, et grâce à des données de diffusion des rayons-X aux petits angles (SAXS) la structure de la protéine entière a pu être proposée (Figure 29A). Les domaines C-terminaux, qui consistent chacun en un petit domaine de fixation du Zn²⁺, ne sont pas étroitement associés aux domaines N-terminaux mais liés par une séquence flexible, ce qui leur permet une grande liberté dans leurs positions et leurs orientations. Nous avons montré, grâce à plusieurs études biochimiques, que chaque YabA_{NTD} peut fixer soit DnaA soit DnaN, mais pas les deux simultanément car leurs sites de fixation se chevauchent. Par contre, le tétramère de YabA peut fixer simultanément DnaA et DnaN, formant ainsi un complexe ternaire (Figure 29B).

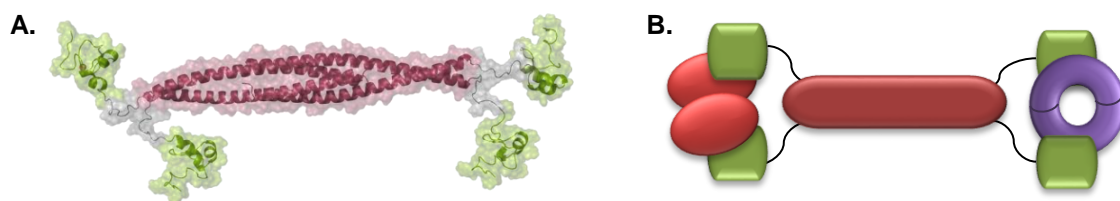


Figure 29 : (A) Modèle de la protéine YabA. Les domaines N, C-terminaux et les résidus connectant les deux sont colorés respectivement en rouge, vert, et gris ; (B) Modèle du complexe ternaire formé entre YabA (coloré comme en A), DnaA (ovale rouge) et DnaN (anneau violet).

Cette étude a ainsi permis de redéfinir YabA comme une nouvelle « plateforme structurale » sur laquelle DnaA et DnaN peuvent se fixer. Cet agencement permet de mieux comprendre la régulation de la réplication chez *B. subtilis*, mais pas seulement, car des homologues de YabA sont également présents chez d'autres bactéries à Gram positif dont certains pathogènes posant d'importants problèmes de santé publique, comme *Streptococcus pneumoniae*.⁶⁰

3.3 Étude structurale de la phospholipase D de plante

La phospholipase D (PLD) est une enzyme ubiquitaire qui hydrolyse les phospholipides en un acide phosphatidique (PA) et une fonction polaire. Le PA est un élément clef de nombreux processus physiologiques et voies de signalisation telles que, par exemple, la prolifération et la survie cellulaire, la formation des vésicules et leur transport,⁶¹ et même l'activation des NADPH oxydases.⁶² De ce fait, en tant que second messager, le PA est indirectement impliqué dans des maladies tels que le cancer, la sclérose en plaque ou la maladie d'Alzheimer. Actuellement, seule la structure de la PLD de *Streptomyces sp.*⁶³ a été résolue, et aucune structure n'a pu être obtenue pour les PLD d'eucaryotes. La situation est complexifiée par le fait qu'aujourd'hui, seules les PLD de plantes sont purifiables à homogénéité et en grande quantité.

Afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette famille de protéines, j'ai participé à l'étude structurale de la PLD de *Vigna unguiculata* (vuPLD), en collaboration avec Y. Arhab,

A. Noiriél et A. Abousalham (ICBMS, Université Lyon 1). J'ai tout d'abord participé à la mise au point de la purification de la protéine à un niveau de pureté satisfaisant et en quantité suffisante pour réaliser une étude structurale par cristallographie aux rayons-X.⁶⁴ Nous avons également montré par SEC-MALS que la protéine est monomérique en solution. Par la suite, nous avons tenté d'améliorer des cristaux obtenus précédemment qui n'avaient pas permis de résoudre la structure de cette protéine.⁶⁵ Les différents tests de cristallisation que nous avons réalisés nous ont permis d'obtenir, assez rapidement, quelques petits cristaux en forme d'aiguilles, dans des conditions de cristallisation proche de celles trouvées précédemment (Figure 30).

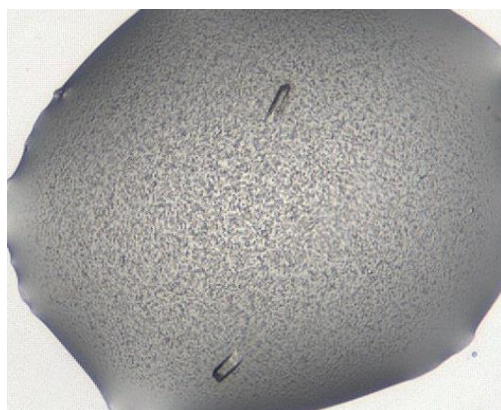


Figure 30 : Cristaux obtenus lors des tests de cristallisation de la protéine *vu*PLD.

Les cristaux présentés dans la Figure 30 ont alors été utilisés pour des collectes de données de diffraction à l'ESRF. Le meilleur jeu de données a diffracté jusqu'à 1.69 Å de résolution et appartenait au groupe d'espace orthorhombique P22₁2₁ ($a = 58.15$ Å, $b = 73.55$ Å, $c = 84.91$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$). Malheureusement, lors du traitement de ces données, je me suis aperçu que la maille est trop petite pour contenir une protéine de 91 kDa (l'unité asymétrique dans ces cristaux ne pouvant loger qu'environ 30 kDa). Ceux sont bien des cristaux de protéines, mais il s'agit, soit seulement d'un fragment de la *vu*PLD, soit d'une protéine contaminant. Malheureusement nous n'avons pas pu les reproduire et il n'a de ce fait pas été possible d'en identifier leur contenu. Je continue à essayer de résoudre la structure de la protéine qui compose ces cristaux, à partir des données de diffraction collectées, en utilisant par exemple le logiciel Arcimboldo.⁶⁶

L'étude cristallographique de la *vu*PLD est très difficile car le rendement de sa purification est faible : il était courant de devoir réaliser une dizaine de purifications pour ne pouvoir préparer que deux boîtes de cristallisation, soit 48 gouttes. Devant cette difficulté, et étant donné que nous n'avons pas pu obtenir de cristaux de la protéine entière, nous avons décidé d'utiliser la protéine qui nous restait pour réaliser une étude par SAXS. Dans un premier

temps nous avons analysé la protéine après tamisage moléculaire sur gel, et ainsi pu obtenir son rayon de giration (2.81 ± 0.05 nm), son diamètre maximum (9.89 nm) et sa masse théorique (89.1 kDa). Toutes ces données confirment bien que la protéine est monomérique en solution. Le calcul de l'enveloppe de protéine grâce au programme DAMMIN montre une forme ovoïde (Figure 31) qui ressemble à ce qui avait déjà été obtenu pour le PLD de chou.⁶⁷

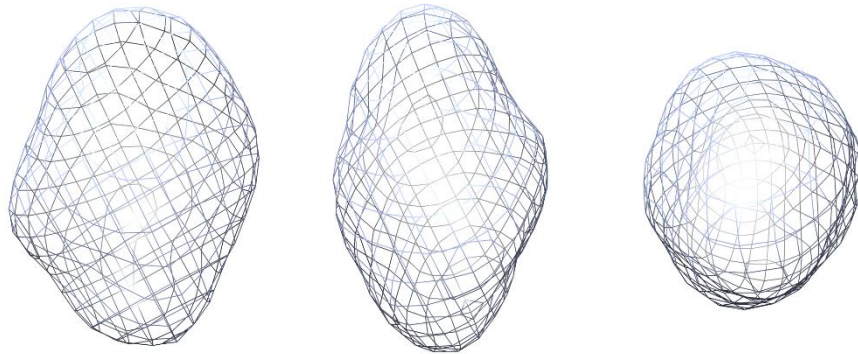


Figure 31 : Enveloppe SAXS calculée en utilisant le programme DAMMIN (20 cycles). Chaque représentation est tournée de 90°.

Les PDL végétales possèdent un domaine additionnel nommé C2 qui fixe le Ca^{2+} , cofacteur indispensable à l'activité enzymatique. En mesurant les courbes SAXS de la protéine en présence de différentes concentrations de Ca^{2+} , nous avons constaté que ce dernier provoque une dénaturation partielle de la protéine (Figure 32), correspondant peut être à un changement structural du domaine C2 provoquant l'apparition de zones hydrophobes.⁶⁸ L'implication de ces résultats est encore en cours d'analyse, et une publication est en préparation.

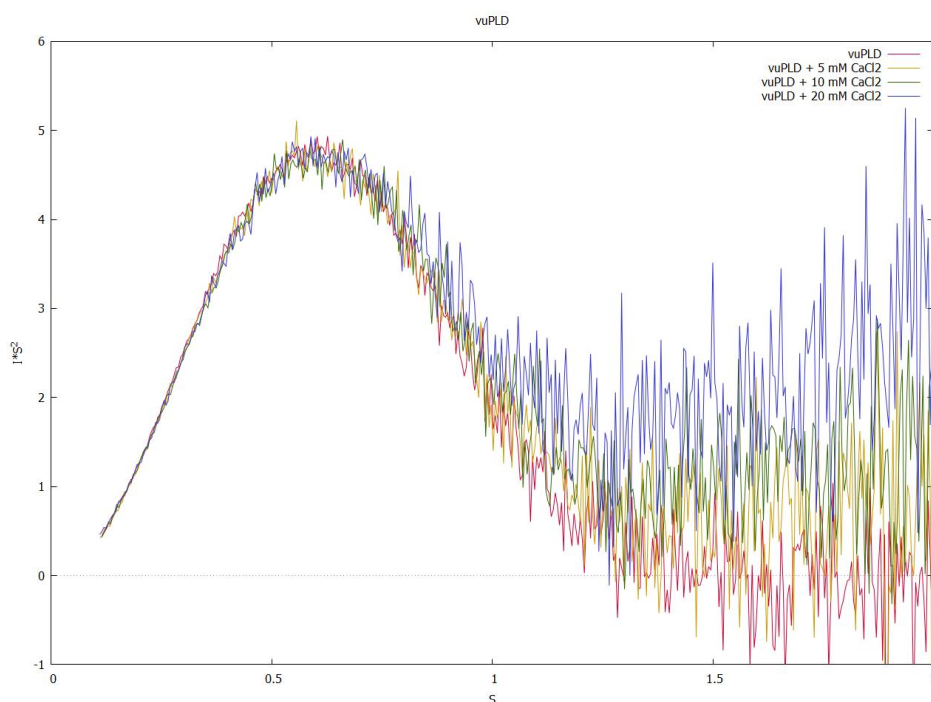


Figure 32 : Représentation de Kratky des données SAXS de la vuPLD en présence de concentrations croissantes de Ca^{2+} .

4 Maitre de conférences UGA

Dates : Septembre 2016 – présent

Laboratoire : Groupe Métalloprotéines - Institut de biologie structurale (IBS) – Grenoble – France

Responsable du laboratoire : Yvain Nicolet

Après trois années passées à l'UCBL, j'ai eu l'opportunité d'entamer une procédure de mutation afin de rejoindre l'UGA. De ce fait, à partir de Septembre 2016 j'ai intégré le groupe Métalloprotéines de l'IBS et j'ai commencé à enseigner à Grenoble.

Le premier projet dans lequel je me suis impliqué est l'étude du mécanisme de la protéine PylB. Cette dernière catalyse la conversion de la lysine en 3-méthyl-D-ornithine, qui est la première étape de la synthèse de la pyrrolysine (Figure 33).⁶⁹ Il s'agit du 22^{ème} acide aminé, directement incorporé lors de la synthèse protéique, que l'on retrouve dans certaines protéines de la voie de transformation des méthylamines en méthane chez les archées méthanogènes.

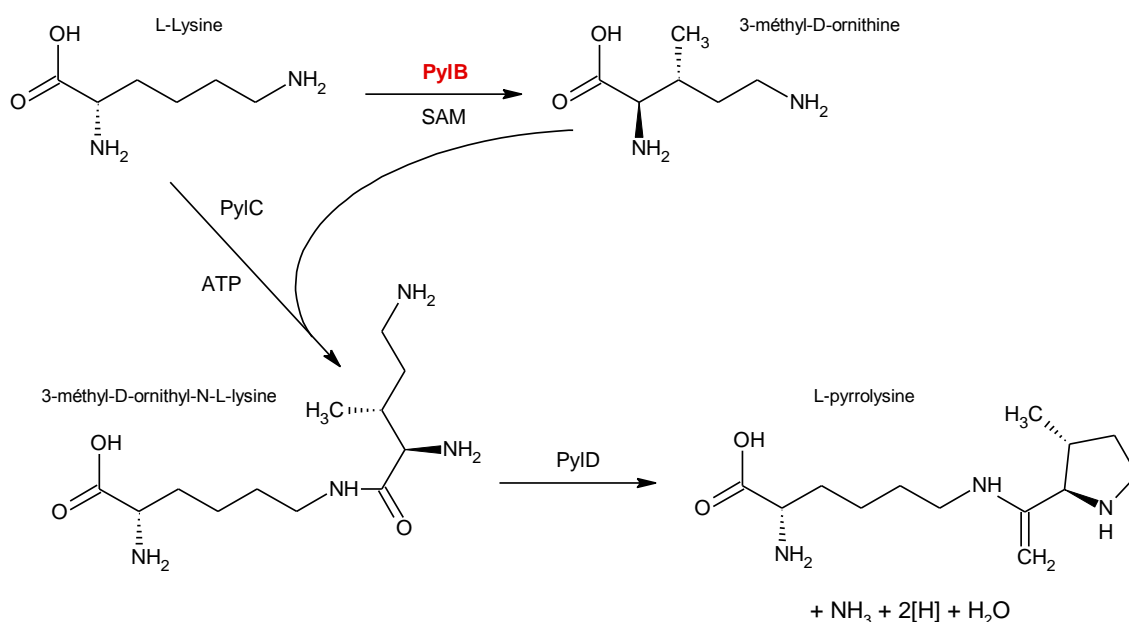


Figure 33 : Voie de biosynthèse de la pyrrolysine, à partir de deux lysines chez les archées méthanogènes.

PylB est une protéine à radical SAM, c'est-à-dire qu'elle possède un agrégat [4Fe4S] qui lui permet de catalyser des réactions radicalaires grâce au clivage homolytique de la S-Adénosine Méthionine (SAM). Même si la structure cristallographique de PylB a été résolue avec la 3-méthyl-D-ornithine (le produit de la réaction) dans son site actif,⁷⁰ peu de choses sont comprises et connues sur le mécanisme exact de la réaction catalysée. Nous avons alors souhaité

mieux comprendre cette réaction pour pouvoir confirmer, ou au contraire infirmer, le mécanisme précédemment proposé.⁷⁰ Pour cela, nous réalisons une étude fonctionnelle de la protéine en essayant d'isoler et de identifier certains intermédiaires de la réaction grâce des approches complémentaires d'analyse par HPLC couplée à de la spectrométrie de masse et par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) en collaboration avec S. Gambarelli (CEA/DRF/INAC). Cette étude est actuellement en cours, mais elle nous a déjà permis de mettre en évidence :

- Que les hydrogènes des carbones γ et δ de la lysine sont impliqués dans le mécanisme réactionnel.
- Qu'un composé radicalaire apparaît très rapidement au début de la réaction. Nous essayons actuellement de l'identifier et de le caractériser par RPE.
- L'existence d'un composé correspondant à une 5'-thioadenosine. Cette molécule ne pouvant être un des intermédiaires de la réaction, elle doit correspondre au résultat d'un « empoisonnement » de celle-ci. La 5'-thioadenosine a déjà été remarquée dans le cas d'autres protéines à radical SAM, mais son origine n'a pas encore été identifiée. Sa caractérisation précise, en particulier l'origine de l'atome de soufre, permettrait une compréhension plus fine des mécanismes des réactions catalysées par cette grande famille de protéines.

En parallèle de ce projet de recherche, je développe un autre projet visant à permettre l'étude structurale des protéines et complexes protéiques sensibles à l'oxygène par cryo-microscopie électronique, qui est développé dans la suite de ce manuscrit.

Projet de recherche

1 Microscopie électronique

1.1 Pourquoi le microscope électronique

Divers instruments ont été mis au point au cours de l'histoire pour mieux voir ou tout simplement voir ce qui n'était pas directement accessible à nos yeux. Parmi ceux-là, l'invention du microscope optique autour des années 1600, a été particulièrement importante. A partir de cette date, beaucoup d'efforts ont été réalisés pour améliorer la qualité des instruments afin de distinguer des détails de plus en plus petits, c'est-à-dire augmenter leur résolution. Mais, du fait de la nature ondulatoire de la lumière, l'image d'un objet ponctuel vue par un instrument optique, quel qu'il soit, n'est pas un point mais une tache circulaire entourée d'anneaux moins intenses, que l'on appelle tache d'Airy (Figure 34). Elle est le résultat des interférences constructives et destructives des ondes diffractées par l'objet observé.

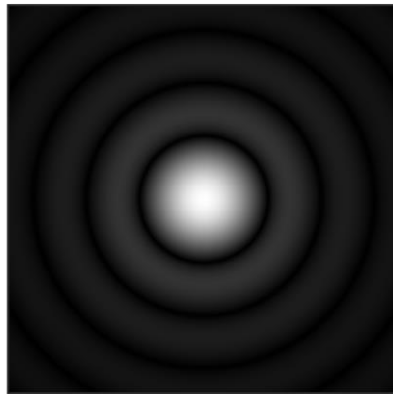


Figure 34 : Tache d'Airy d'un objet ponctuel. (https://en.wikipedia.org/wiki/Airy_disk)

La conséquence de ce phénomène est que si deux objets ponctuels sont trop proches l'un de l'autre, à partir d'une certaine distance leurs taches d'Airy se superposent et il n'est alors plus possible de les distinguer. Ernst Abbe (1840-1905) a alors défini la limite de résolution d'un microscope comme étant :

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

avec λ la longueur d'onde d'illumination ;
 n l'indice de réfraction en sortie de l'objectif ;
 α le demi-angle du cône de lumière maximum accessible.

Pour augmenter la limite de résolution, on peut donc envisager deux possibilités :

- Soit augmenter l'indice de réfraction du milieu en sortie d'objectif ;
- Soit diminuer la longueur d'onde d'illumination.

Mais comme en microscopie optique on est, par définition, limité à une longueur d'onde d'environ 400 nm, la limite de résolution est d'environ 0,2 μm .

Comment alors dépasser cette limite physique et être ainsi capable d'observer des molécules et même des atomes par microscopie ? Deux solutions pouvaient alors être imaginées :

- Soit continuer à utiliser un rayonnement électromagnétique, mais cette fois dans le domaine des rayons-X (autour de 1 \AA). Malheureusement, le manque de lentilles efficaces pour focaliser les rayons-X a fortement limité cette solution.
- Soit utiliser un faisceau d'électrons qui, grâce à la dualité onde/corpuscule, se comporte également comme une onde et peut donc remplacer le rayonnement électromagnétique dans un microscope. Contrairement au cas des rayons-X, il est possible de construire des lentilles électromagnétiques permettant de focaliser un faisceau d'électrons. On peut alors calculer que sous une tension de 100, 300 et 1000 kV, les électrons ont respectivement une longueur d'onde de 3,7, 2,0 et 0,9 pm. Ceci permet alors d'avoir une limite de résolution inférieure à la taille des liaisons atomiques.

C'est ce constat qui a motivé la fabrication du premier microscope électronique en 1931 par Max Knoll (1887-1969) et Ernst Ruska (1906-1988) (Figure 35).

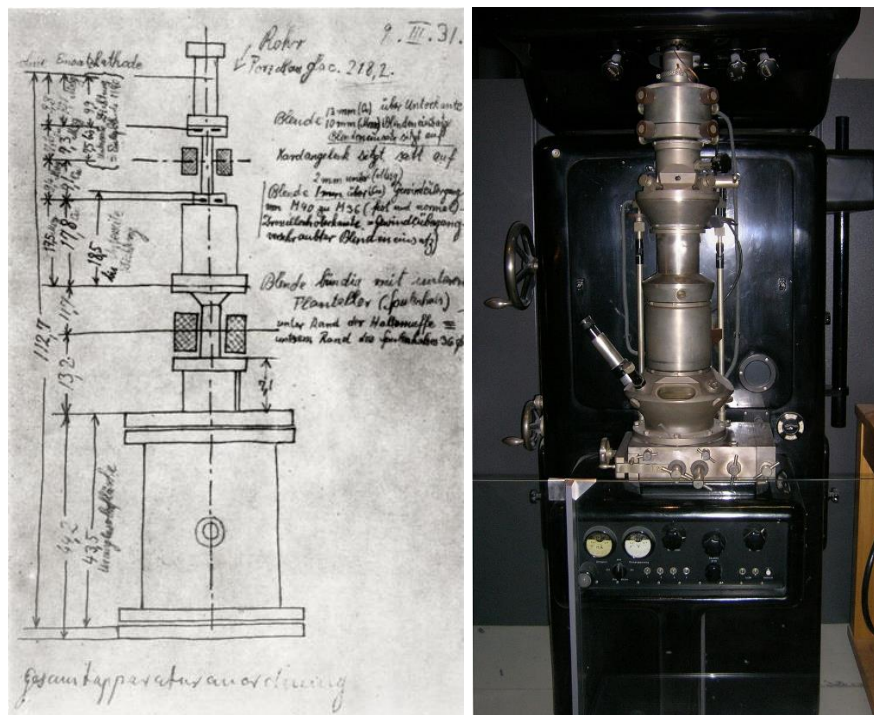


Figure 35 : Premier microscope électronique.

Gauche : Schéma du microscope ; (<https://www.stem.lps.u-psud.fr/book/export/html/209>)
 Droite : reproduction du microscope. (https://fr.wikipedia.org/wiki/Microscope_électronique)

Les microscopes optiques et électroniques à transmission sont donc construits sur des principes très similaires, la seule différence conceptuelle majeure étant que la lumière visible

est remplacée par un faisceau d'électrons afin de diminuer la limite de résolution de l'instrument (Figure 36).

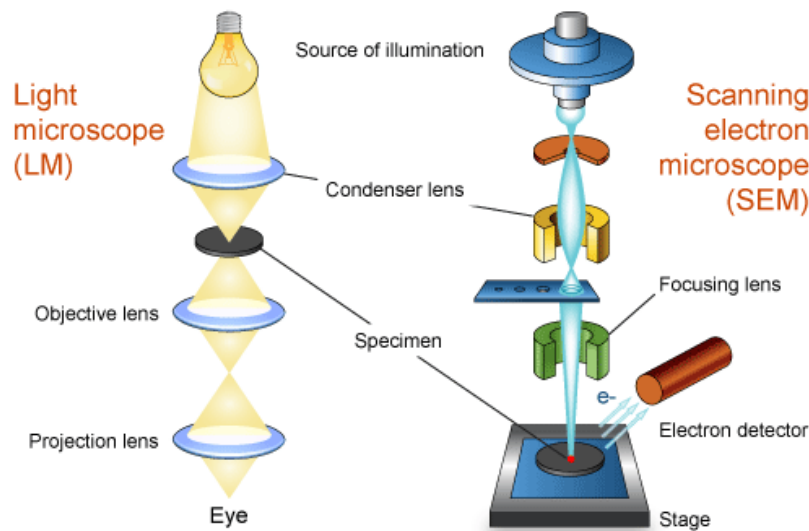


Figure 36 : Comparaison entre les principes de la microscopie optique et la microscopie électronique.
 (https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Microscopy_LM_and_SEM_cartoon.jpg#/media/File:Microscopy_LM_and_SEM_cartoon.jpg)

1.2 Microscopie électronique et biologie structurale

1.2.1 Principe de la préparation des échantillons et de la reconstruction

Lorsque l'on souhaite étudier la structure tridimensionnelle d'une macromolécule biologique (protéines, acides nucléiques...) par microscopie électronique, il faut tout d'abord la déposer sur une grille qui sera ensuite placée dans le microscope. Deux méthodes principales existent afin de réaliser cette première étape :

- La coloration négative⁷¹ où ce n'est pas la protéine qui est directement observée, mais son « empreinte » créée par un colorant constitué d'atomes lourds (par exemple l'acétate d'uranyle). Il est ainsi possible d'obtenir rapidement des informations structurales pour des macromolécules biologiques. Néanmoins, la résolution des reconstructions obtenues est fortement limitée par la taille des grains du colorant utilisé. De plus l'« empreinte » observée est souvent aplatie du fait de la déshydratation de l'échantillon dans le vide du microscope électronique.
- La cryo-microscopie électronique (cryoEM)⁷² où l'échantillon est emprisonné dans une fine épaisseur de glace vitrifiée, préservant alors autant que possible sa structure native (Figure 37). Par contre, en absence de colorant, les images obtenues présentent un faible contraste puisque les atomes qui composent les macromolécules biologiques possèdent une faible capacité à diffuser les électrons. De plus, les protéines sont très sensibles aux dommages radiatifs. Les images

doivent donc être enregistrées dans des conditions de faible exposition aux électrons.

Une fois la grille insérée dans le vide du microscope, l'échantillon peut alors être observé. Dans le cas de la cryoEM, les données seront enregistrées par un faisceau relativement faible d'électrons ($20\text{-}40\text{ e}^-/\text{\AA}^2$) afin de préserver le plus possible l'échantillon des dommages radiatifs.⁷³ Les données collectées correspondent à une projection 2D de chaque macromolécule présente sur la grille, orientée de façon aléatoire (ou « quasi » aléatoire s'il existe une interaction spécifique avec la grille). Toutes ces projections sont alors sélectionnées manuellement, ou semi automatiquement, puis comparées une-à-une afin d'en faire des classes de particules ayant la même orientation. A partir de là, il est envisageable d'obtenir une reconstruction de la structure 3D de la densité électronique de la macromolécule en déterminant l'orientation relative de chacune de ces classes puis en les réassociant.

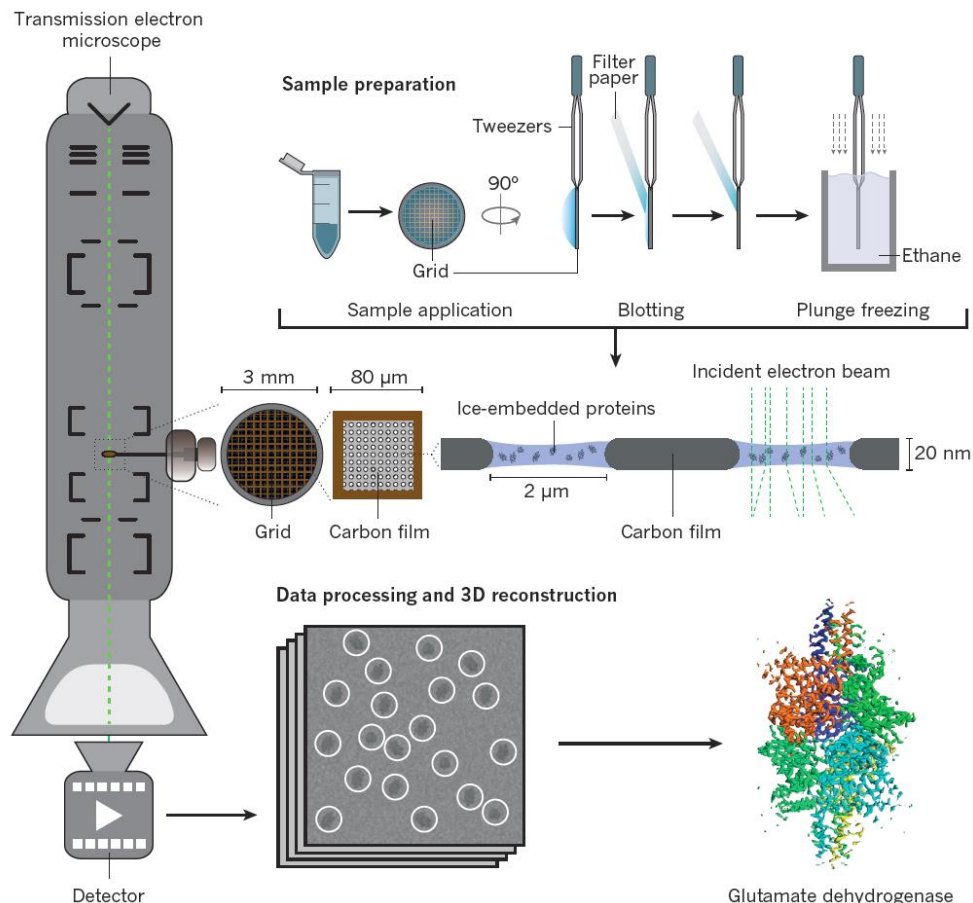


Figure 37 : Principe de la cryoEM. Quelques microlitres de l'échantillon de macromolécule biologique sont placés sur une grille. L'excès de d'échantillon est absorbé par un système de papiers filtres, puis la grille est plongée rapidement dans de l'éthane ou du propane liquide. Cela a pour effet de vitrifier l'échantillon et ainsi empêcher toute formation de cristaux de glace. La grille est alors insérée dans le vide du microscope électronique et les données collectées sont informatiquement traitées pour obtenir une reconstruction de la macromolécule. (Figure de ⁷⁴)

1.2.2 Révolution de la cryo-microscopie électronique

Très rapidement, après la mise au point des premiers microscopes électroniques, ces derniers ont été utilisés pour observer des échantillons biologiques. Grâce à cela, la microscopie

électronique à transmission est aujourd'hui l'une des trois techniques majeures de biologie structurale, avec la cristallographie aux rayons-X et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). La cristallographie aux rayons-X est historiquement la première méthode ayant permis de visualiser la structure d'une protéine.⁷⁵ On peut aussi la qualifier de la plus efficace pour résoudre les structures de macromolécules biologiques, puisque chaque année le nombre de structures cristallographiques ne cesse d'augmenter et est largement supérieur aux nombre de structures résolues par les deux autres techniques (Figure 38). En ce qui concerne l'utilisation de la RMN en solution pour la résolution de structures 3D, la technique a pris de l'importance dans les années 2000, mais elle semble maintenant en retrait. Ceci peut s'expliquer principalement par la difficulté d'étudier des protéines de grande taille.

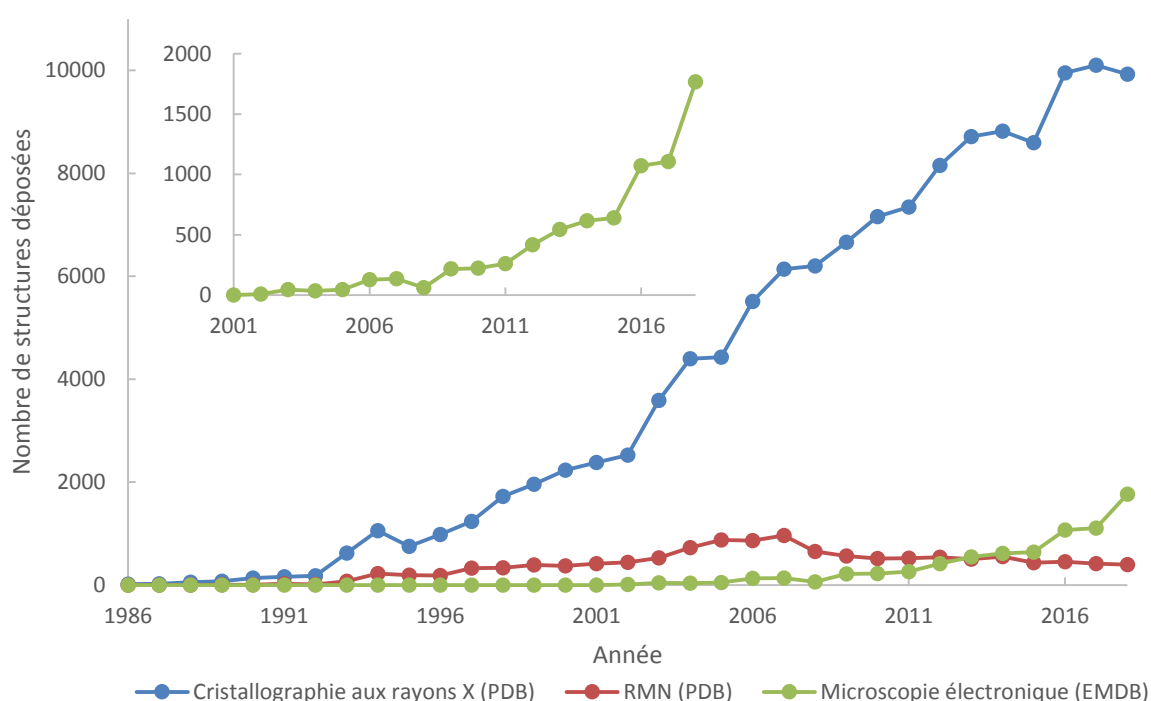


Figure 38 : Nombre de structures résolues par les trois principales techniques de biologie structurale et déposées, par année depuis 1986, dans les bases de données PDB (Protein Data Bank) ou EMDB (Electron Microscopy Data Bank). L'encart représente l'évolution du nombre de reconstructions déposées dans l'EMDB depuis 2000.

En ce qui concerne la microscopie électronique comme technique de biologie structurale, elle a longtemps été limitée à l'étude de complexes macromoléculaires de grande taille, tel que le ribosome, et très souvent à des objets présentant de hautes symétries internes, comme les virus icosaédriques. De ce fait, le nombre de structures déposées dans la « Electron Microscopy Data Bank » (EMDB), créée en 2002, a été pendant un temps très limité. Mais cette tendance a complètement changé au tournant des années 2010, et c'est à partir de là que l'on a commencé à parler de la « révolution de la microscopie électronique ».⁷⁶

1.2.2.1 Progrès techniques et technologiques

Cette révolution, qui s'illustre entre autres par une augmentation importante du nombre de structures résolues, est principalement due à quatre progrès techniques majeurs :

1- Le premier est la mise au point et la commercialisation de microscopes électroniques optimisés pour la collecte de données de cryoEM d'échantillons biologiques à haute résolution. Le plus connu et le plus performant étant, à l'heure actuelle, le microscope Titan Krios de FEI a été acquis par plusieurs institutions à travers le monde (Figure 39). Il fonctionne avec un faisceau d'électrons de 300 kV extrêmement stable. Il est conçu pour pouvoir collecter des données de façon automatique, et de ce fait il est équipé d'un chargeur d'échantillon.

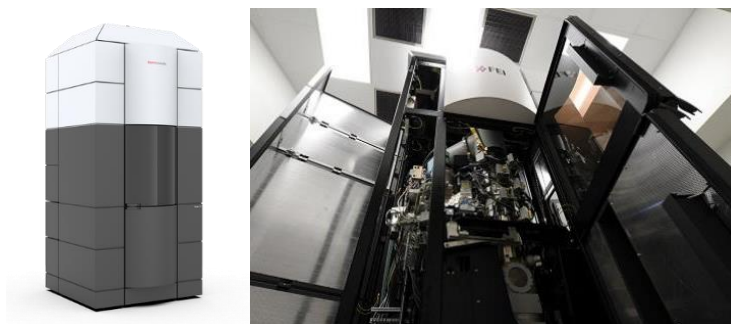


Figure 39 : Titan Krios de FEI.

(<https://www.fei.com/krios-g3i/> et <https://www.laboratoryequipment.com/news/2017/04/cryo-em-core-facility-van-andel-research-institute-grand-rapids-michigan>)

2- Pendant longtemps, les données de cryoEM ont été collectées grâce à des films photographiques. Un des problèmes principaux de cette méthode d'enregistrement était la nécessité de numériser chaque film avant de pouvoir entamer leur analyse, ce qui était très long à réaliser. Par la suite, des caméras CCD ont été mises au point pour servir de détecteurs, mais elles n'ont jamais réellement remplacé les films photographiques car ces derniers ont toujours permis d'enregistrer une zone d'échantillon plus grande et également parce qu'ils ont toujours été plus sensibles (1/3 des électrons incidents détectés pour le film photographique contre 1/5 pour les CCD). Tout a changé avec l'apparition en 2012 des caméras à détection directe.⁷⁷ Ces détecteurs présentent l'avantage de pouvoir mesurer les électrons individuellement, et non plus par accumulation comme c'était le cas précédemment. Les données ne sont ainsi plus enregistrées sous forme d'images individuelles, mais sous forme de « film », ce qui donne la possibilité de corriger a posteriori le mouvement des particules sous l'effet du faisceau d'électrons.⁷⁸ Les données obtenues sont alors plus « nettes » et contiennent des informations à plus haute résolution. Le second avantage de ces caméras est leur efficacité de détection des électrons, qui est supérieure aux dispositifs précédemment utilisés (environ 1/2 des électrons incidents détectés). Elles présentent également un bon rapport signal/bruit, qui permet de collecter des données plus contrastées et/ou moins exposées au dommages radiatifs des électrons.⁷⁹

3 - Si le microscope électronique est réglé pour enregistrer des données au point focal, les images ainsi obtenues n'ont alors qu'un très faible contraste,⁸⁰ ce qui rend très difficile, voire impossible, toute visualisation de macromolécules. La solution la plus largement utilisée est l'enregistrement des données avec un microscope réglé légèrement en dehors du point focal, afin de transformer les faibles différences de phase en variation d'intensité dans l'image grâce aux interférences entre les électrons diffusés et non diffusés. Le même phénomène peut être provoqué par des dispositifs appelés « phase plate ». Jusqu'à récemment, leur utilisation a été très limitée à cause de deux problèmes principaux (i) la difficulté de leur réglage, qui les rend inutilisables lors d'une collecte automatique ; (ii) leur vieillissement rapide. Récemment la situation a changé avec la mise au point du « Volta Phase Plate », qui consiste en un fin film de carbone chauffé à 200-240°C.⁸¹ Grâce à ce dispositif simple à mettre en œuvre, les images obtenues au point focal (ou proche du point focal) sont maintenant plus fortement contrastées (Figure 40), ce qui permet d'obtenir plus facilement et plus rapidement des reconstructions à plus haute résolution avec un nombre moins important de particules.⁸²

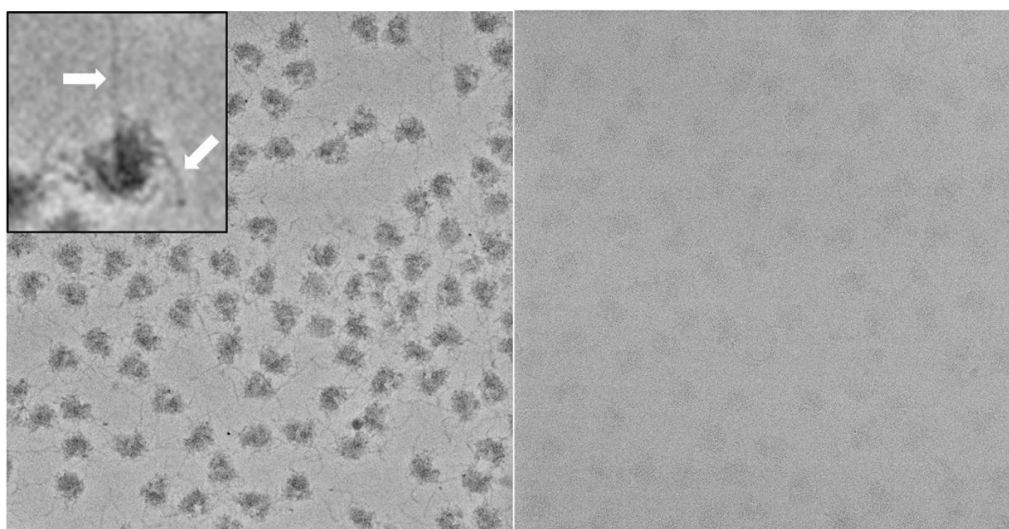


Figure 40 : Comparaison des images obtenues à partir d'une préparation de ribosomes humains en utilisant :
(A gauche) : un « défocus » de -500 nm et un Volta Phase Plate ;
(A droite) : uniquement un « défocus » de -490 nm.
L'insert présente un ribosome avec son ARN_m localisé par les flèches. (Figure adaptée de ⁸²)

4- Afin de calculer les reconstructions de microscopie électronique, différentes suites de logiciels ont été développées au cours des années : EMAN,⁸³ EMAN2,⁸⁴ SPIDER,⁸⁵ IMAGIC,⁸⁶ ou RELION.⁸⁷ Ce dernier est l'un des plus récents, disponibles depuis 2012, et présente la particularité d'utiliser une approche Bayésienne où le lissage de la densité reconstruite est réalisé grâce à un filtre gaussien dans le domaine de Fourier. Cette procédure a prouvé être efficace pour limiter le problème de sur-affinement des reconstructions, qui est une conséquence du faible rapport signal/bruit des données enregistrées. La capacité de RELION

permettant d'obtenir « relativement facilement » des reconstructions à haute résolution en fait, actuellement, le logiciel le plus utilisé par la communauté.

L'ensemble de ces différents progrès ont pour conséquence directe (i) une évolution de la résolution des reconstructions, (ii) la diminution de la taille des macromolécules étudiées.

1.2.2.2 Evolution de la résolution

Si on suit l'évolution de la plus haute résolution obtenue chaque année, on identifie trois phases (Figure 41) : (i) de 2002 (date de la création de l'EMDB) à 2007, les meilleures reconstructions avaient une résolution d'environ 7 Å ; (ii) puis en 2008, cette limite de résolution a été diminuée d'un facteur 2 environ avec la reconstruction de la protéine VP6 du rotavirus DLP (« Double-Layer Particle ») à 3,8 Å de résolution.⁸⁸ Les années qui ont suivi, les meilleures résolutions sont restées autour de 3 Å pour des particules hautement symétriques comme les virus icosaédriques ; (iii) en 2015, une nouvelle évolution de la résolution s'est faite autour de 2 Å mais maintenant cela concerne aussi des molécules moins symétriques comme la glutamate déshydrogénase à 1,8 Å (symétrie : D3). Le record de résolution actuel a été obtenu en 2018 par la résolution du complexe octaédrique de la chaîne lourde de l'apoferritine à 1,62 Å de résolution.

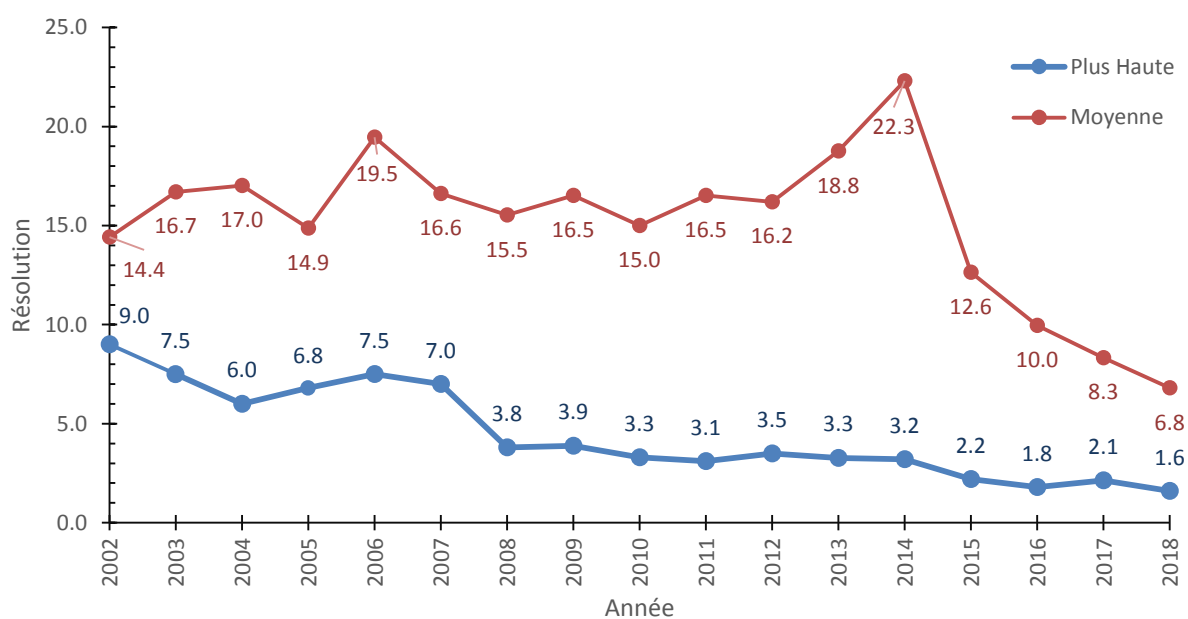


Figure 41 : Evolution de la résolution des reconstructions déposées par année dans l'EMDB.

Maintenant, si l'on ne suit plus la plus haute résolution atteinte par année, mais la moyenne de la résolution des reconstructions déposées, on constate que les progrès techniques qui ont permis l'augmentation de la résolution maximale observée en 2008 n'ont pas eu d'impact global, puisque la moyenne de la résolution est la même avant et après cette date (autour de 16-17 Å). Dit autrement, les solutions trouvées pour améliorer la résolution des reconstructions étaient efficaces, mais malheureusement applicables à seulement à un très petit

nombre d'échantillons. Par contre, la situation est complètement différente en ce qui concerne les évolutions techniques (décrites dans le chapitre précédent) qui ont permis la seconde augmentation de résolution maximale de 2015, car dans ce cas la résolution moyenne a augmenté à 12,6 Å et n'a cessé de diminuer depuis pour arriver en 2018 à 6,8 Å. Ainsi, une proportion de plus en plus importante des reconstructions atteint maintenant des résolutions se rapprochant de la résolution atomique (inférieures à 4 Å) (Figure 42).⁸⁸⁻⁹²

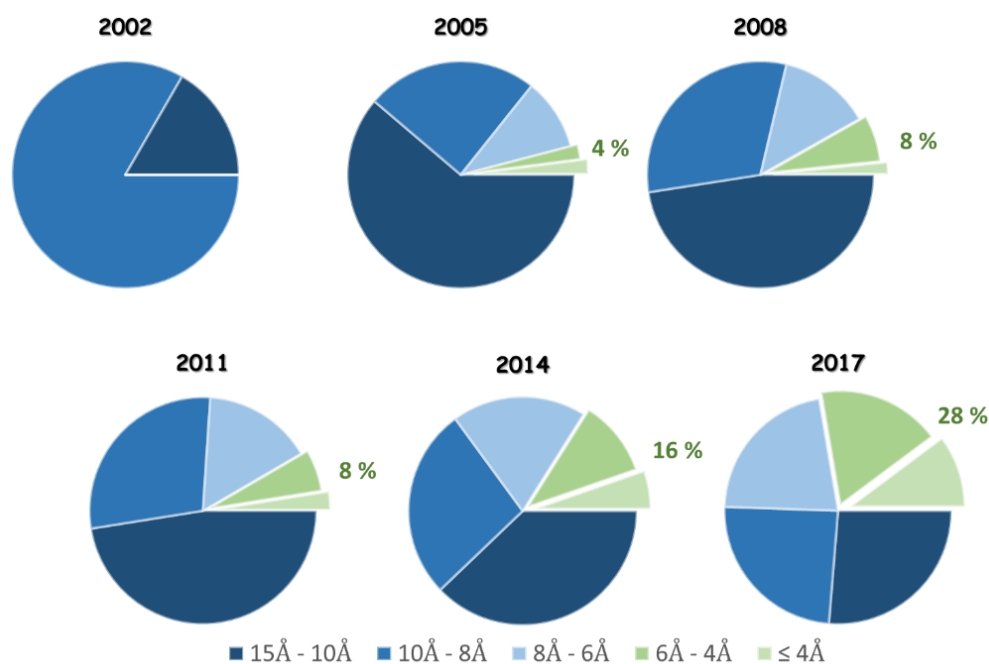


Figure 42 : Proportion de reconstructions atteignant une résolution donnée par année de dépôt dans l'EMDB.

1.2.2.3 Evolution de la taille des protéines étudiées

L'un des problèmes des échantillons biologiques est qu'ils sont constitués majoritairement d'atomes légers (hydrogène, carbone, oxygène, azote), donc ayant un pouvoir de diffusion des électrons limité. L'image de ces macromolécules biologiques obtenue par cryoEM aura donc un contraste limité, proportionnel à leur taille. De ce fait, leur masse doit être suffisamment importante pour pouvoir permettre la reconstruction de leur densité électronique en cryoEM.⁹³

Contrairement à l'évolution de la résolution, qui a plutôt tendance à évoluer par paliers, la taille des macromolécules étudiées ne cesse de diminuer de façon linéaire (Figure 43). Alors qu'en 2002 toutes les reconstructions déposées dans l'EMDB concernaient des complexes macromoléculaires d'une taille supérieure à 500 kDa, ils ne représentaient plus que 59% des reconstructions en 2018, contre 37% des structures de macromolécules d'une taille comprise entre 100 et 500 kDa (13% entre 100 et 250 kDa + 24% entre 250 et 500 kDa).

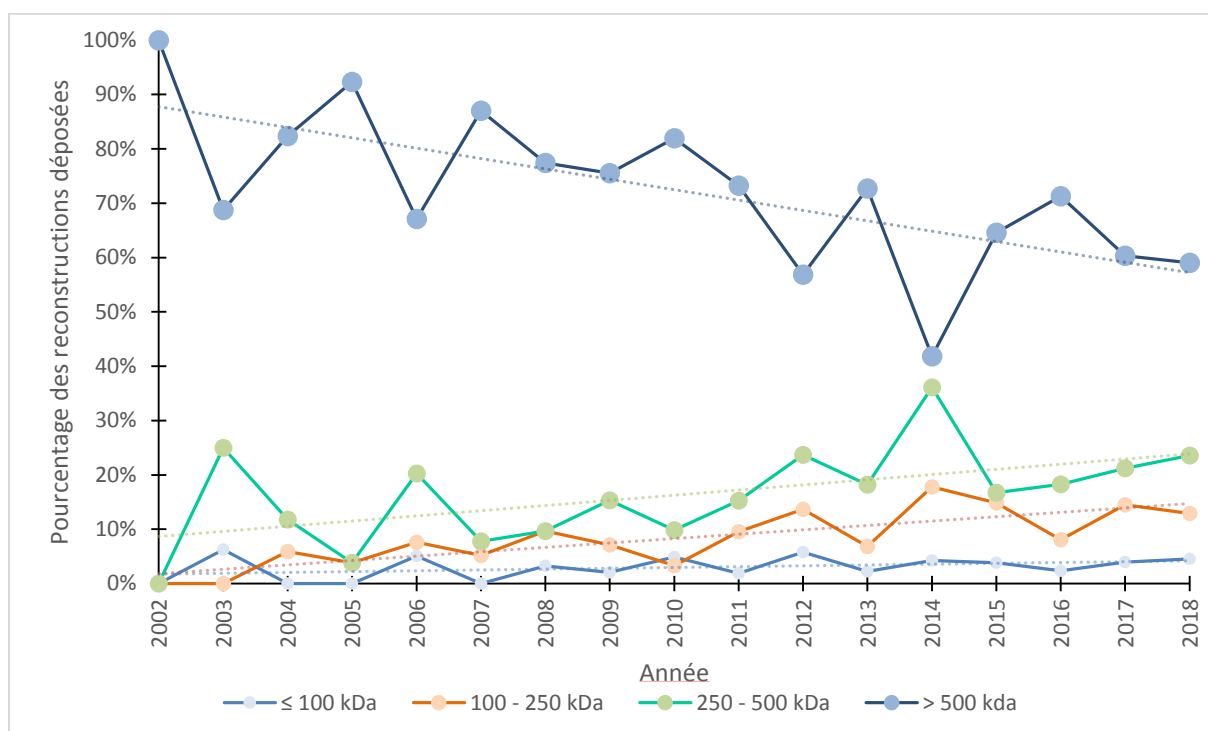


Figure 43 : Evolution de la taille des macromolécules déposées par année dans la EMDB.

Par contre, le nombre de reconstructions de macromolécules de taille inférieure à 100 kDa reste encore minoritaire et relativement stable (5% en 2018). Par exemple, en 2012, une reconstruction de cryoEM d'un complexe protéine-ADN d'une masse totale de 100 kDa, ne possédant pas de symétrie interne, a pu être obtenue, même si sa résolution est modeste (20 Å).⁹⁴ Néanmoins, parmi ces structures, comme pour les autres tailles de protéines, des structures approchant la résolution atomique existent. Un exemple remarquable est la résolution, en 2017, de la structure du tétramère de l'hémoglobine (64 kDa) à une résolution de 3.2 Å.⁹⁵

1.2.3 Avenir de la microscopie électronique et de la cristallographie aux rayons-X

La microscopie électronique s'est donc développée pour devenir aujourd'hui une technique performante permettant l'étude structurale de macromolécules biologiques^{96,97} capable d'obtenir un nombre croissant de reconstructions à une résolution de plus en plus proche de la résolution atomique, et pour des protéines de plus en plus petites. Actuellement, rien ne montre que cette tendance doive s'arrêter et on peut espérer que dans quelques années il sera courant d'obtenir des reconstructions à des résolutions proches de 2 Å pour toutes sortes de protéines, et peut-être même pour des molécules de taille inférieure à 100 kDa.⁹⁸

A partir du moment où la microscopie électronique permet d'obtenir des reconstructions « similaires » à ce que peut fournir la cristallographie aux rayons-X, il est légitime de se poser la question suivante : La cryoEM va-t-elle remplacer la cristallographie des protéines ? De mon

point de vue, mais aussi de plusieurs autres spécialistes,⁹⁹ la réponse est clairement non. A cela plusieurs raisons :

La première est le temps qu'il faut avec chaque technique pour résoudre une structure. Dans le cas de la cristallographie aux rayons-X, grâce aux différents progrès techniques et méthodologiques développés ces 50 dernières années (rayonnement synchrotron, détecteur de type Pilatus, robots de cristallisation, méthodes de phasage...) il ne reste que deux étapes réellement limitantes : la cristallisation de la molécule étudiée et le phasage des données de diffraction. Néanmoins lorsque tout fonctionne au mieux, il est tout à fait possible, et même courant, d'obtenir une structure cristallographique en quelques heures/jours. Dans le cas la microscopie électronique, la situation est très différente. Plusieurs étapes du processus permettant l'obtention d'une reconstruction sont encore très longues : collecte des données, sélection des particules, calcul des reconstructions. De ce fait, le temps nécessaire pour obtenir une reconstruction se compte plutôt en semaines/mois. La cristallographie aux rayons-X peut donc être une technique très rapide pour obtenir une structure, alors que la microscopie électronique implique toujours, pour le moment, un processus long.

La seconde raison est la résolution que l'on peut obtenir avec les deux techniques. En utilisant des cristaux de protéine, la cristallographie aux rayons-X impose aux protéines d'adopter toutes la même, ou un nombre très limité, de conformations. Dans le cas de la cryoEM, la conformation des protéines n'est pas contrainte, ce qui permet dans certains cas de visualiser plusieurs conformations à partir du même échantillon. Mais cette hétérogénéité a aussi pour conséquence de réduire la résolution des reconstructions obtenues. En définitive, la cristallographie aux rayons-X est plus performante pour obtenir des structures à haute résolution, alors que la cryoEM permettra d'étudier plus facilement les différents états conformationnels.

La dernière raison est que les reconstructions cryoEM ne sont pas exactement équivalentes aux structures cristallographiques.¹⁰⁰ En effet, les cartes de microscopie présentent des structures additionnelles et du bruit supplémentaire, par rapport aux densités électroniques cristallographiques à la même résolution. De plus, le facteur B calculé en microscopie électronique est généralement non physiologique. Ceci s'explique par le fait que dans ce cas il représente la perte de contraste dans la reconstruction, laquelle résulte de phénomènes difficilement modélisables, telles que par exemple les erreurs dans l'alignement des particules.⁹⁹ Dans le cas de la cristallographie des protéines, le facteur d'agitation est beaucoup mieux défini puisque que directement affiné contre les données expérimentales. Enfin, les rayons-X et les électrons n'interagissent pas de la même façon avec les atomes. Pour les premiers, plus la masse de la particule chargée est faible, plus l'interaction est importante. De

ce fait les rayons-X sont principalement élastiquement diffusés par les électrons, ce qui explique qu'on obtient grâce à la cristallographie des protéines des cartes de densité électronique. Dans le cas des électrons, ceux-ci sont sensibles à toutes les particules chargées de l'atome : les électrons et le noyau. La cryoEM va donc produire des cartes de potentiel électrique. Une conséquence importante est que lorsque la qualité de la reconstruction de cryoEM est suffisante (autour de 2 Å de résolution), il devrait être possible de conclure sur l'état de protonation de certains résidus.¹⁰¹

La cristallographie aux rayons-X et la cryoEM ayant chacune leurs particularités, leurs avantages et leurs inconvénients, à l'avenir, le biologiste structural pourra donc utiliser la technique qui fonctionne le mieux pour le système biologique qui l'intéresse. Ces deux techniques devraient donc pouvoir coexister mais également se compléter dans certains cas. Un exemple de ceci est l'étude de complexes protéiques, pour lesquels il peut parfois être très difficile d'obtenir des structures à une résolution proche de la résolution atomique, quelle que soit la technique utilisée. Dans ce cas, pour accéder à des informations structurales du complexe à plus haute résolution, il est alors envisageable de coupler la cristallographie et la microscopie électronique. En effet, lorsque les structures cristallographiques des différents composants d'un complexe étudié par cryoEM sont disponibles, il est possible de les placer par recalage moléculaire dans la densité électronique obtenue par microscopie électronique. On estime alors que la précision du positionnement du modèle de la structure cristallographique sera cinq fois supérieure à la résolution de la reconstruction de microscopie électronique.^{102,103}

2 Etude structurale de la biosynthèse des cofacteurs métalliques

2.1 Mécanismes de transfert des cofacteurs métalliques

La biochimie est devenue une discipline disposant d'un grand nombre de techniques performantes nous permettant d'étudier et de mieux comprendre les processus cellulaires au niveau moléculaire. De cette façon, il a été possible d'identifier les différentes étapes d'un nombre croissant de mécanismes biochimiques. Mais ce qui reste à mon sens un défi est de comprendre quelles sont les transitions entre ces différentes étapes. En effet, pour décrypter un processus biologique, il est nécessaire de caractériser l'ensemble du processus : les étapes clefs mais aussi les transitions entre chacune de ces étapes.

Prenons l'exemple de la biosynthèse des cofacteurs. Puisque beaucoup de ces molécules sont vitales pour les cellules, des efforts importants ont été faits pour pouvoir en comprendre la biosynthèse, et notamment identifier les différentes étapes de celle-ci. Mais il était certainement plus difficile et aussi moins important d'aborder le transfert du cofacteur en cours de maturation entre les différentes protéines, s'il peut diffuser librement dans le milieu. Cependant, dans le

cas des centres [Fe-S] (voir chapitre 3.1) ou des sites actifs organométalliques tel que celui de la nitrogénase (voir chapitre 3.2), les étapes de transfert sont tout aussi importantes parce que le cofacteur en cours de synthèse doit être protégé des dommages potentiels qu'il peut subir, que ce soit par oxydation, par hydrolyse ou par substitution des métaux, sans compter sur l'aspect hautement toxique des éventuels produits de dégradation de ces derniers. De plus, comme cela sera expliqué plus loin, un certain nombre d'étapes importantes dans le processus d'assemblage des centres [Fe-S] correspondent à la distribution spécifique de l'agrégat vers une protéine cible donnée. Cette spécificité ne provient pas d'une catalyse, mais d'une reconnaissance particulière favorable au transfert. Un grand nombre de maladies liées à des défauts dans ce processus affectent des protéines dites de transport qui ne pourront plus alimenter telle ou telle protéine cliente. Les processus de transfert prennent là toute leur importance.

Pourquoi ces mécanismes sont-ils relativement moins étudiés, en particulier du point de vue structural ? Plusieurs raisons peuvent être envisagées :

- La première raison est que lorsque que l'on pense à un processus biologique, encore une fois par exemple la biosynthèse des cofacteurs, les étapes de synthèse de ce dernier viennent tout de suite à l'esprit. De ce fait, il semble naturel de s'intéresser en premier lieu à la façon dont est catalysée la production des différents états intermédiaires du processus, avant de considérer leurs modes de transfert.
- Une seconde raison est que ces étapes de synthèse sont « relativement plus simples » à étudier car elles se font en général au sein d'une seule protéine, ou d'un complexe très stable : un objet moléculaire unique et homogène. Ceci permet donc d'envisager plus facilement l'étude de cette étape, notamment par cristallographie aux rayons-X.
- Les étapes de transfert sont, de leur côté, des processus plus dynamiques. En effet elles impliquent souvent :
 - une interaction directe entre les protéines (ou complexes protéiques) émettrices et réceptrices, formant ainsi un complexe qui peut être plus ou moins stable.
 - des changements de conformations protéiques.

Ceci va alors impliquer l'existence de plusieurs étapes intermédiaires, parfois transitoires, dans ces processus qui ne sont pas toujours aisément accessibles car plus difficiles à obtenir de façon homogène.

- L'étude structurale de ces étapes va souvent faire appel à la cristallographie aux rayons-X. Mais cette technique est moins performante dans la résolution des

structures de complexes protéiques que celle de protéines monomériques. Cela est encore plus marqué lorsque le complexe implique un nombre important de partenaires et/ou que l'interaction est transitoire.

Je souhaite donc m'intéresser aux mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de transfert des cofacteurs, en particulier les cofacteurs métalliques. Comment cette problématique peut-elle être abordée ?

Il convient ici de résoudre la structure tridimensionnelle d'un maximum d'états clefs du processus de transfert. La cristallographie aux rayons-X est la première technique à considérer, car elle permet de résoudre des structures à haute résolution. Mais elle est aussi limitée par le fait que pour chaque état considéré il est nécessaire d'obtenir un cristal, ce qui n'est pas toujours possible. La récente émergence de la microscopie électronique en tant que technique ayant le potentiel de résoudre des structures à une résolution proche de la résolution atomique apporte une solution à ce problème. L'un des avantages de cette technique, par rapport à la cristallographie des protéines, est qu'il n'est pas nécessaire d'obtenir des cristaux de l'objet biologique étudié. De ce fait, on s'affranchit des contraintes sur la conformation tridimensionnelle de la protéine imposées par le phénomène de cristallisation, ce qui permet d'envisager plus facilement l'étude de différents complexes, ainsi que des différentes conformations qu'ils peuvent adopter.

Un second avantage de cette technique est que chaque complexe est observé puis sélectionné individuellement. Ceci diffère de ce qui se passe en cristallographie, où les données enregistrées correspondent à une moyenne de milliards de molécules qui peuvent avoir des différences plus ou moins importantes. En cryoEM, la moyennation des données n'intervenant qu'après classification des particules en fonction de leur homologie, il est alors envisageable de séparer les différentes conformations présentes dans un même échantillon. Cette procédure est appelée classification 3D, et son développement et son utilisation sont de plus en plus importants.

L'un des problèmes majeurs de l'étude des mécanismes de transfert des cofacteurs, est qu'il s'agit souvent de phénomènes transitoires : une fois la molécule d'intérêt transférée de la protéine/complexe émettrice vers la protéine/complexe réceptrice, il est fréquent que les deux se séparent pour pouvoir passer à l'étape suivante de la biosynthèse. Il est donc important de contrôler précisément le minutage et la synchronisation du processus. Là aussi l'utilisation de la cryoEM peut dans certains cas être un avantage, puisque le temps entre la formation et la fixation de celui-ci peut être plus beaucoup plus court que dans le cas de la cristallographie. En effet, dans le cas de cette dernière, entre le moment où le complexe est formé/purifié, et celui où un cristal de celui-ci est congelé, il peut se passer jusqu'à plusieurs mois. Si le complexe

n'est pas suffisamment stable, il est courant qu'il se dissocie avant même qu'un cristal n'ait pu apparaître. Ce problème est moindre dans le cas de la cryoEM, car le temps entre la formation/purification du complexe étudié et sa congélation sur une grille peut être beaucoup plus court et mieux contrôlé. Ceci pourrait s'envisager de plusieurs façons :

- A la fin de la purification, par exemple en sortie d'une colonne de filtration sur gel, le complexe étudié est souvent assez concentré pour être utilisé directement pour préparer des grilles de cryoEM, sans avoir besoin de passer par une étape de concentration (qui en elle-même peut aussi être une source de déstabilisation d'un complexe protéique). Ceci permet de réduire à quelques minutes le temps entre la purification d'un complexe homogène et sa fixation sur la grille.
- Lorsque les phénomènes étudiés sont très courts, il est aussi envisageable de préparer les différents éléments séparément (protéines ; complexes ; cofacteurs) et de ne les mettre en présence qu'au dernier moment :
 - Soit en les mélangeant dans un tube juste avant de les déposer sur la grille.
 - Soit en ajoutant un des éléments clés au dernier moment directement sur la grille avant l'étape de « séchage » de celle-ci.
 - Soit en vaporisant un très petit volume d'un des éléments clés sur la grille avant sa congélation.

Différents éléments supplémentaires peuvent également être utilisés pour synchroniser un processus biochimique. Dans le cas des métalloprotéines, on peut tirer avantage du fait qu'elles sont souvent impliquées dans des processus redox. Pour cela on peut parfois déclencher un processus en ajoutant au système étudié un oxydant ou un réducteur afin de lui retirer ou de lui ajouter un ou plusieurs électrons.

Une autre stratégie pour obtenir un échantillon homogène d'une des étapes du transfert, est d'utiliser des mutants, de la même façon que ce qui est fait dans le cas d'un mécanisme réactionnel.

Ce travail a ainsi pour ambition de comprendre quels sont les phénomènes mis en œuvre lors du transfert des cofacteurs au cours de leur maturation puis de leur insertion dans les protéines cibles. Ces informations pourront alors permettre de proposer un ou plusieurs modèles de la façon dont se déroulent ces mécanismes dans les cellules eucaryotes et procaryotes.

2.2 Métalloprotéines et agrégats fer – soufre

Il est admis qu'un quart à un tiers de toutes les protéines, selon le règne considéré, ont une fonction liée à la présence dans leur structure d'un ion d'un métal de transition.¹⁰⁴ Ces dernières sont appelées métalloprotéines et sont capables de participer à une variété plus

importante de réactions chimiques que celles qui disposent seulement des vingt acides-aminés. Grâce à ces propriétés nouvelles, nombre de ces protéines jouent un rôle indispensable aux processus fondamentaux du vivant, telles que la photosynthèse, la respiration, ou la fixation de l'azote.

Le métal le plus fréquemment rencontré dans les métalloprotéines est le fer. Il y est présent soit sous forme cationique en interaction directe avec des résidus protéiques, soit intégré à une porphyrine, ou bien enfin sous forme d'agrégat fer – soufre ([Fe-S]). Ce dernier existe sous deux formes majoritaires : les centres $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ rhombiques et les centres $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ cubiques (Figure 44).

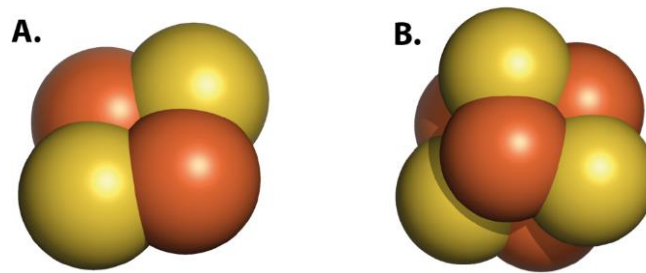


Figure 44 : Centres fer – soufre : (A) $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$; (B) $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$. Les atomes de fer et de soufre sont respectivement représentés en orange et jaune.

Ces agrégats sont probablement les cofacteurs inorganiques les plus versatiles du vivant.¹⁰⁵ Ils peuvent en effet assurer le transfert d'électrons, comme par exemple dans le cas du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale¹⁰⁶ ; la catalyse enzymatique, comme dans le cas de l'aconitase¹⁰⁷ ; ou encore ils peuvent jouer un rôle de capteur de l'environnement ou des conditions intracellulaires, comme c'est le cas du régulateur "Fumarate Nitrate reduction Regulator" (FNR) qui change d'état d'oligomérisation, et modifie par conséquent sa capacité de liaison à l'ADN, en fonction de la présence ou de l'absence d'oxygène moléculaire dans l'environnement. Les protéines possédant un centre [Fe-S] remplissent ainsi souvent des rôles clés dans les cellules. De ce fait, un nombre croissant de pathologies humaines ont été associées à un défaut d'un des composants de la biosynthèse des agrégats [Fe-S], mais aussi à un défaut des protéines à centre [Fe-S] elles-mêmes. Un exemple parmi d'autres est l'ataxie de Friedreich, une maladie génétique neurodégénérative, provoquée par une perturbation du métabolisme du fer au niveau de la mitochondrie.¹⁰⁸

L'intégrité des centres [Fe-S] des métalloprotéines est un élément essentiel qui peut induire des changements de conformation importants et/ou des états d'oligomérisation différents. Un premier exemple est la disponibilité du fer dans la cellule, et de ce fait son incorporation dans une protéine donnée. Un cas particulier est la protéine bi-fonctionnelle de mammifère IRP1 (Iron Regulatory Protein 1) cytosolique qui voit son activité régulée par

l'assemblage et désassemblage de son agrégat $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. L'holoprotéine (avec le centre $[\text{Fe-S}]$) a une fonction d'aconitase ; lorsque la cellule est carencée en fer, la protéine passe sous forme apo (sans le centre $[\text{Fe-S}]$) et acquiert la capacité de réguler la traduction de certains ARN messagers. Ce capteur de fer permet ainsi de réguler des protéines impliquées dans le transport, le stockage et l'utilisation du fer.¹⁰⁹ Un deuxième exemple concerne les changements de conformation induits par la dégradation de l'agrégat $[\text{Fe-S}]$, due à sa sensibilité particulière vis-à-vis de l'oxydation. Dans ce cas, l'apoprotéine correspond à une forme inactive de la protéine par rapport à l'holoprotéine. Ceci impose de prendre des précautions particulières quant à la manipulation de ces protéines. Leur production, leur purification et leur étude doivent ainsi se faire dans une atmosphère strictement anaérobie. A contrario, ce changement d'état redox des centres $[\text{Fe-S}]$ peut également avoir un rôle fonctionnel, comme c'est le cas pour la FNR mentionnée précédemment. En effet, sa fonction sera régulée par son état d'oligomérisation (monomère/dimère) lui-même lié à l'intégrité de son centre $[\text{Fe-S}]$ ($[2\text{Fe-2S}]^{2+} / [4\text{Fe-4S}]^{2+}$).¹¹⁰

2.3 Microscopie électronique des métalloprotéines et conditions anaérobies

Dans le groupe Métalloprotéines dirigé par Yvain Nicolet (qui a succédé en 2016 à Juan C. Fontecilla-Camps) de l'Institut de Biologie Structurale (IBS, UMR 5075) de Grenoble, nous nous intéressons à l'étude structurale des métalloprotéines et principalement aux protéines possédant des agrégats $[\text{Fe-S}]$. Jusqu'à présent, la technique la plus utilisée pour étudier ce type de protéines est encore une fois la cristallographie aux rayons-X, même si leur étude est compliquée par leur sensibilité à l'oxygène. C'est pourquoi le groupe a développé au cours des vingt cinq dernières années un ensemble, composé à ce jour de six boîtes à gants, permettant de travailler en anaérobiose stricte (Figure 45). Celles-ci permettent de réaliser en l'absence presque totale d'oxygène toutes les étapes indispensables à une étude de biologie structurale : à l'heure actuelle de la culture bactérienne, jusqu'à la cristallisation des protéines manuelle et automatique.

Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, la cristallographie des protéines se trouve limitée lorsqu'il s'agit d'étudier l'ensemble des conformations et complexes physiologiques d'une protéine, et la microscopie électronique pourrait être une solution particulièrement adaptée. Jusqu'à aujourd'hui, parmi toutes les protéines et complexes protéiques résolus par cryoEM, très peu correspondent à des métalloprotéines¹¹¹⁻¹¹⁵, et aucune n'a, à ma connaissance, de réelle sensibilité vis-à-vis de l'oxygène. Ceci s'explique par les contraintes techniques que cela implique. A l'heure actuelle, il est donc impossible d'utiliser la cryoEM pour étudier des protéines sensibles à l'oxygène car aucun système permettant de

préparer des grilles en conditions anaérobies n'existe, même si plusieurs groupes de recherche à travers le monde commencent à s'y intéresser.

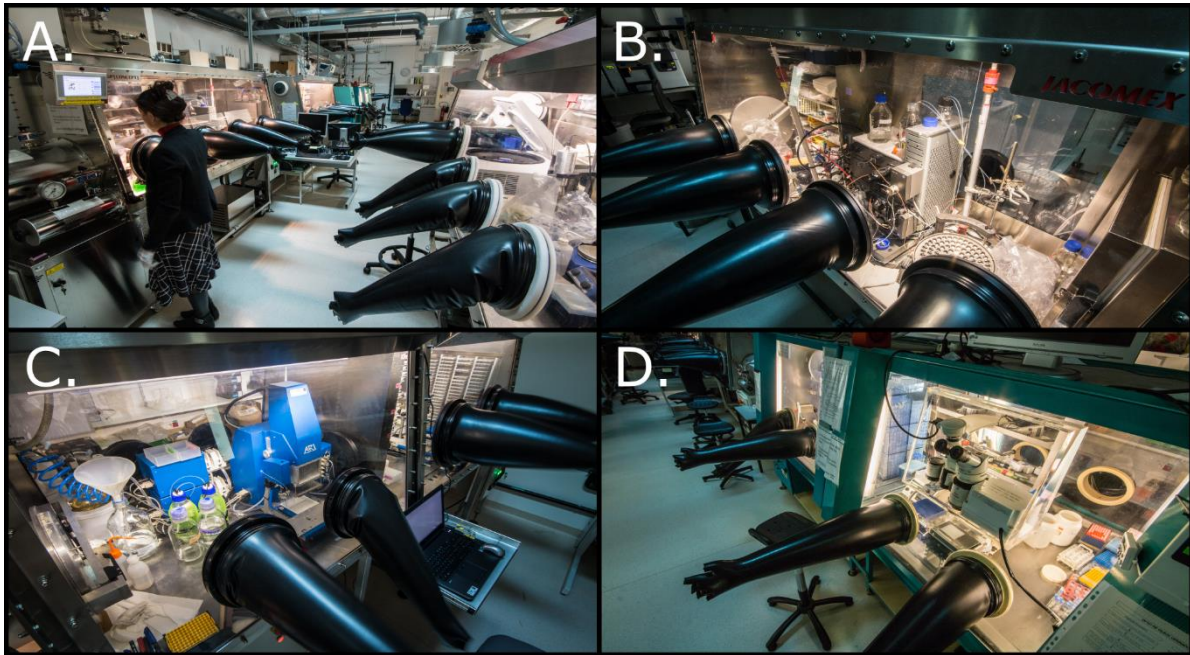


Figure 45 : (A) Vue d'ensemble de la salle où sont installées les boîtes à gants du groupe Métalloprotéines de l'IBS. A droite est visible la boîte à gants dédiée à la culture bactérienne en conditions anaérobies, contenant entre autres, un incubateur, une centrifugeuse, et un sonicateur. (B) Boîte à gants dédiée à la purification des protéines, contenant entre autres, un appareil pour FPLC, ainsi que l'équipement permettant la mesure d'activité enzymatique. Une seconde boîte à gants équipée de façon similaire est disponible (C) Boîte à gants dédiée au robot de cristallisation automatique Gryphon®, contenant également un système de visualisation automatique de boîtes de cristallisation. (D) Boîte à gants dédiée à la croissance cristalline manuelle ainsi qu'à la congélation des cristaux de protéine.

Nous prévoyons donc de développer, au sein du laboratoire, des outils pour étudier par microscopie électronique des protéines et des complexes protéiques sensibles à la dégradation par l'oxygène. Il faudra pour cela adapter les étapes de préparation des grilles de microscopie électronique aux contraintes liées au travail sous atmosphère anaérobie dans une boîte à gants.

Dans le cas de la préparation de l'échantillon par coloration négative, peu d'adaptations seront nécessaires et la procédure sera très similaire à ce qui se fait en dehors de la boîte à gants : de façon très simplifiée, il suffira d'ajouter l'agent contrastant sur la grille et de le laisser sécher. Par contre, le cas de la cryoEM demandera un peu plus d'adaptation de la procédure car elle implique de congeler rapidement la grille contenant les échantillons dans du propane ou de l'éthane liquide. Par la suite, dans les deux cas, les grilles peuvent être sorties de la boîte à gants sans risque de dommage afin d'être placées ensuite dans le microscope. Afin de mener ce projet à bien, une boîte à gants spécialement conçue pour y accueillir un système de congélation des grilles de cryoEM, de type Vitrobot™, vient d'être acquise et installée dans la salle accueillant les autres boîtes à gants du laboratoire (Figure 46).

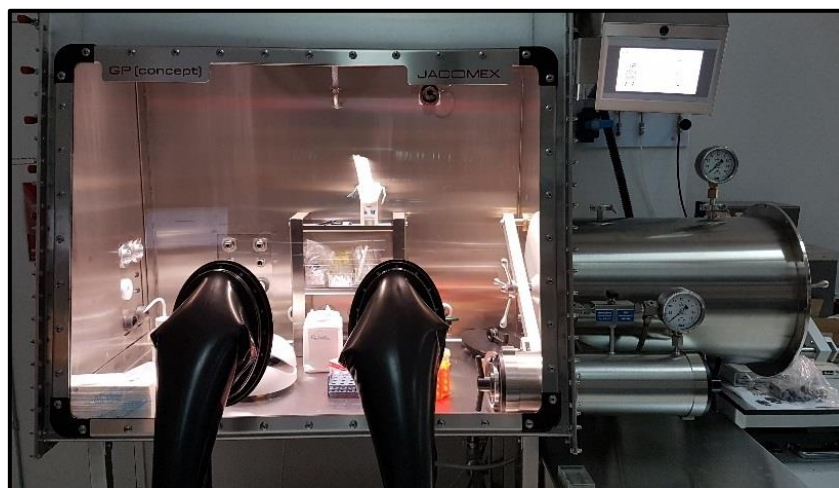


Figure 46 : Boîte à gants multifonction conçue pour accueillir, entre autres, un système automatisé de congélation des grilles de cryoEM (Vitrobot™).

Ce projet s'intègre parfaitement dans l'environnement scientifique Grenoblois. En effet, le groupe bénéficie d'une expertise internationalement reconnue pour ses études structurales de métalloprotéines sous atmosphère anaérobie (PFOR¹¹⁶ ; CODH/ACS¹¹⁷ ; IRP1¹⁰⁹ ; hydrogénase à Fe-Fe¹¹⁸ ; hydrogénase à Ni-Fe¹¹⁹ ; protéines à radical SAM¹²⁰⁻¹²²). De fait, le projet bénéficiera de l'accès aux nombreuses boîtes à gants de l'équipe. Ceci sera particulièrement important en ce qui concerne la préparation des échantillons (expression / purification / caractérisation) que nous devons réaliser en conditions d'anaérobiose stricte afin de préserver leur intégrité et leur homogénéité. Le projet se fait également en collaboration étroite avec G. Schoehn du groupe de microscopie électronique et méthodes de l'IBS et responsable de la plateforme de microscopie électronique. Cette équipe dispose de toutes les compétences et de l'expertise permettant l'étude de complexes protéiques par coloration négative et cryo-microscopie électronique.¹²³⁻¹²⁷ Le groupe dispose de trois microscopes : l'un est utilisé pour l'enregistrement d'échantillons colorés négativement, et les deux autres, dont un Glacios cryo-TEM, sont dédiés à la cryo-microscopie électronique. Enfin, l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble a récemment fait l'acquisition d'un microscope électronique Titan Krios, qui est accessible à la communauté scientifique. L'utilisation de cet appareil de dernière génération sera un réel atout pour notre projet car il permettra la collecte de données à haute résolution.

De plus, ce projet de recherche me permettra également de mettre à profit de nombreuses compétences que j'ai pu acquérir et développer au cours de mes années de recherche (Figure 47) :

- De par ma formation initiale ainsi que mon parcours scientifique, j'ai pu acquérir de solides connaissances en biologie structurale. J'ai ainsi pu résoudre la structure, par cristallographie aux rayons-X, de nombreuses protéines.^{4,5,28,31,32,34,35,37,48,59}

- En réalisant un stage postdoctoral dans le laboratoire du Professeur Michael G. Rossmann (Purdue University, Indiana, USA), j'ai acquis de solides connaissances sur l'analyse et le traitement des données obtenues par microscopie électronique.^{10,16}
- Une grande partie des projets de recherches que j'ai menés a porté sur des métalloprotéines naturelles ou artificielles.^{4,5,26,28,30-32,34,35,37,37,41,42,128} Plusieurs de ces études ont impliqué à un moment ou un autre l'utilisation de conditions anaérobies, et donc le travail en boîte à gants. Un exemple notable est l'étude de diffusion aux petits angles des rayons-X que nous avons menée sur la protéine HydG. En effet pour pouvoir la mener à bien nous avons dû mettre au point une cellule permettant de mesurer des données SAXS en gardant l'échantillon en anaérobiose pendant toute la durée de la collecte (Figure 9).²⁶ Cette expertise nous sera utile lorsque nous adapterons l'étape de préparation des grilles de microscopie électronique aux contraintes de l'anaérobiose.
- En travaillant dans le laboratoire de Laurent Terradot à (IBCP – Lyon), je me suis formé à la purification et caractérisation de complexes protéiques, mais également à leur étude structurale.^{48,54,59}

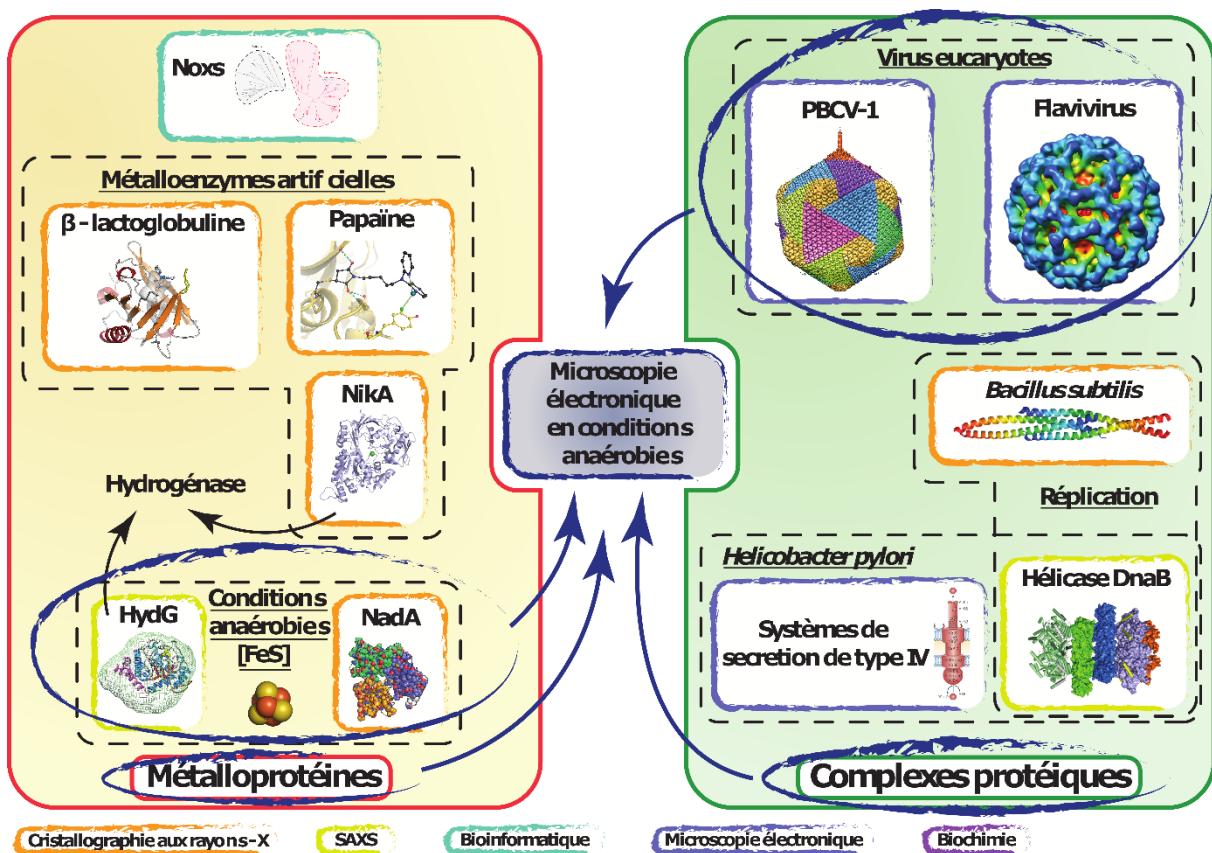


Figure 47 : Représentation schématique illustrant la position centrale du projet d'étude des métalloprotéines sensibles à l'oxygène par microscopie électronique, par rapport aux autres projets que j'ai menés à bien jusqu'à présent.

3 Machineries de métalloprotéines étudiées

Même si je ne décris ici que les aspects des études structurales par microscopie électronique, étant cristallographe et travaillant dans une équipe dont c'est la spécialité première, des études par cristallographie aux rayons-X seront également menées, les résultats obtenus par les deux techniques étant complémentaires. La proximité de l'ESRF est alors un avantage car je pourrai accéder régulièrement et facilement aux différentes lignes de lumière où pourront être collectées les données de diffraction indispensables à la résolution des structures par cristallographie aux rayons-X.

3.1 Biogenèse mitochondriale des agrégats [Fe-S] chez les mammifères

3.1.1 Synthèse *de novo* d'un centre fer – soufre

La mitochondrie est connue depuis longtemps comme jouant un rôle central en fournissant aux cellules eucaryotes leur énergie sous la forme d'ATP. Contenant une part importante des protéines à centre [Fe-S] de la cellule, il n'est pas surprenant que la fonction fondamentale de biogenèse de ces agrégats soit localisée dans cet organite. C'est la machinerie d'assemblage Iron Sulfur Cluster (ISC) des mitochondries qui réalise la biogenèse et l'insertion des centres [Fe-S] dans les protéines mitochondriales, mais celle-ci est également indispensable, via le système Cytosolic Iron-sulfur cluster Assembly (CIA), à la maturation des protéines cytoplasmiques et nucléaires contenant des centres [Fe-S].¹²⁹ Plusieurs de ces dernières ont des fonctions fondamentales, puisque l'on trouve, entre autres, des protéines impliquées dans l'assemblage et le recyclage des ribosomes,^{130,131} mais aussi des hélicases,¹³² ou une ADN polymérase.¹³³ Il n'est alors intéressant de constater que l'une des seules fonctions mitochondriales conservées par les mitosomes (organites dérivant de la mitochondrie ayant perdu la quasi-totalité de ses fonctions) est la maturation des protéines [Fe-S].¹³⁴

3.1.2 L'assemblage des agrégats [Fe-S] des protéines mitochondriales

La machinerie d'assemblage ISC est un système général que l'on retrouve chez tous les organismes vivants. Néanmoins, le système eucaryote présente de nombreuses particularités par rapport au système procaryote, même s'il a été hérité de ces derniers. Chez les mammifères, et plus particulièrement chez l'homme, il est composé de 17 protéines. En plus du fait que la fonction de chacune d'elles n'est pas totalement élucidée, on comprend encore mal comment toutes ces protéines interagissent entre elles. Néanmoins, le processus peut être décomposé en trois grandes étapes ^{135,136} (Figure 48) :

- La synthèse de l'agrégat $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ sur la protéine échafaudage ISCU.

- Le transfert du centre $[2Fe-2S]^{2+}$ de la protéine ISCU vers la glutaredoxine-5 (GLRX-5) qui peut alors distribuer l'agrégat à différents accepteurs mitochondriaux.
- L'assemblage des agrégats $[4Fe-4S]^{2+}$ sur le complexe ISCA1/2, suivi de leur insertion dans les protéines mitochondriales cibles.

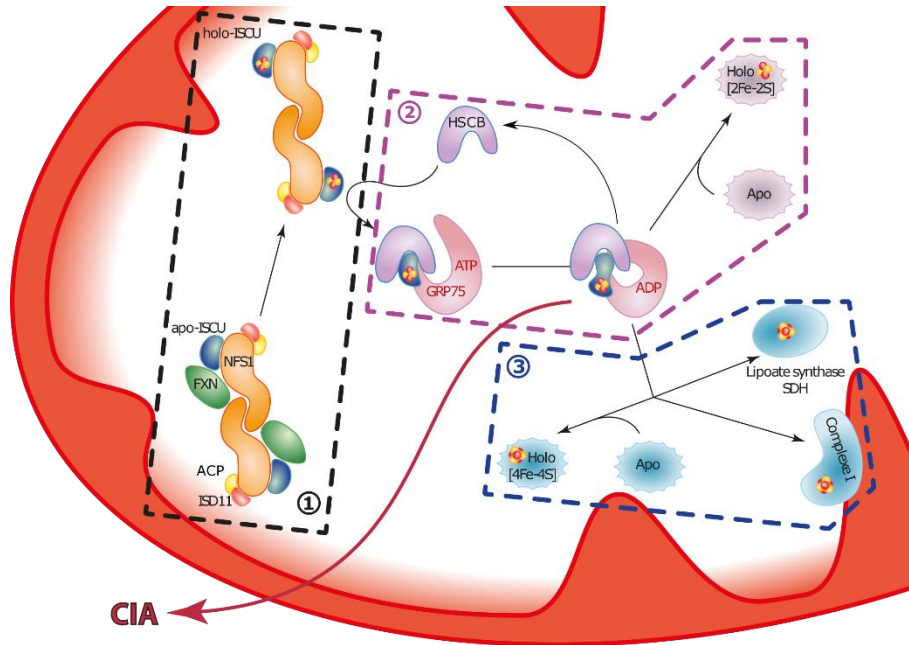


Figure 48 : Schéma de la synthèse des agrégats [Fe-S] par le système ISC dans les mitochondries des cellules de mammifères. Elle se compose de trois étapes : (1) la synthèse du centre [Fe-S] sur la protéine ISCU ; (2) le transfert et l'insertion de l'agrégat $[2Fe-2S]^{2+}$ sur les protéines cibles ; (3) enfin, la synthèse et l'insertion des agrégats $[4Fe-4S]^{2+}$ sur les protéines cibles. Le système CIA permet la maturation des protéines cytoplasmiques et nucléaires.

3.1.2.1 Assemblage de l'agrégat $[2Fe-2S]^{2+}$ sur la protéine échafaudage ISCU

La première étape de la biosynthèse *de novo* des centres [Fe-S] (Figure 49) commence avec le transfert d'un atome de soufre, produit par la désulfuration d'une cystéine libre du complexe [NFS1–ISD11] en alanine, vers une cystéine conservée du site actif de NFS1.¹³⁷ Ce soufre est ensuite transféré sous la forme de sulfane (S^0) vers le site d'assemblage de l'agrégat [Fe-S] sur la protéine échafaudage ISCU.¹³⁸ Même si NFS1 est homologue à la cystéine désulfurase bactérienne IscS, chez les eucaryotes il ne peut remplir sa fonction en l'absence de deux partenaires :

- La protéine ISD11,¹³⁹ qui n'a pas d'équivalent procaryote, permet la stabilisation du complexe protéique en empêchant l'auto-agrégation de NFS1.¹⁴⁰
- L'« Acyl Carrier Protein » (ACP), qui joue également un rôle de stabilisation du complexe.¹⁴¹ Cependant, il ne joue cette fonction qu'avec le cofacteur 4'-phosphopantetheine (4'PPT) qui lui est lié de façon covalente.¹⁴² Sa présence pourrait permettre de lier le métabolisme des acides gras à la biogénèse des centres [Fe-S].¹⁴³

Le fer pénètre dans la mitochondrie grâce aux transporteurs intermembranaires mitoferrin-1 et mitoferrin-2 (MFRN1/2). Il y est alors stocké avant d'être apporté à ISCU. Cette fonction semble être assurée par la frataxine (FXN)¹⁴⁴ même si cela n'est pas pour le moment confirmé *in vivo*. FXN pourrait également avoir un rôle de régulation du système.¹⁴⁵

L'ensemble de ce processus nécessite 4 électrons. Les 2 premiers sont apportés par les 2 ions ferreux (Fe^{2+}) qui s'oxydent en ions ferriques (Fe^{3+}) et feront partie de l'agrégat néoformé. Les 2 autres proviennent alors d'une source extérieure : le système à deux composants ferrédoxine (FDX) / ferrédoxine réductase (FDXR).¹³⁵

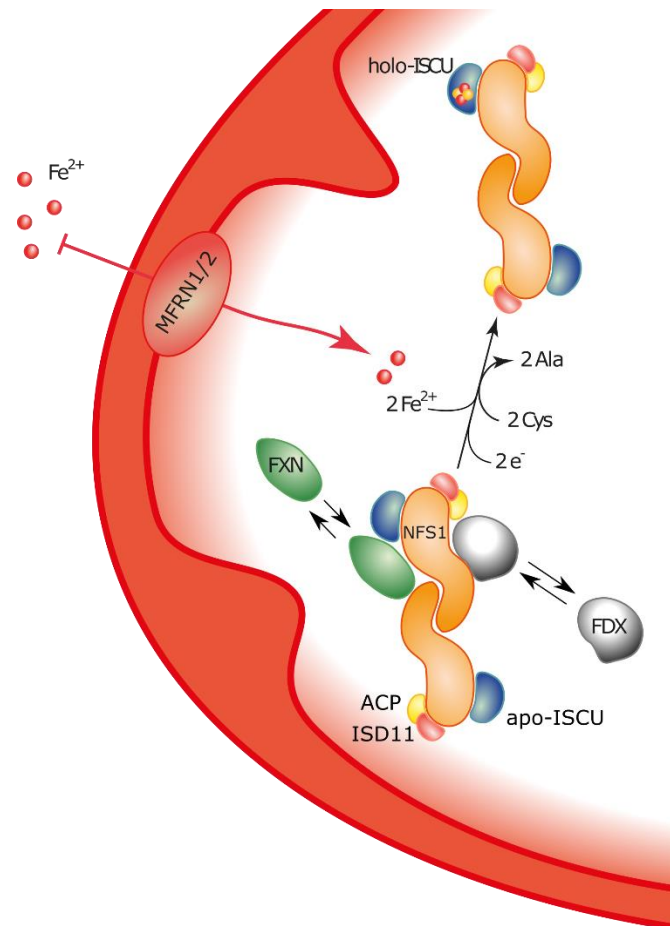


Figure 49 : Synthèse mitochondriale *de novo* du centre [Fe-S].

La biogenèse des centres [Fe-S] se fait donc grâce à un complexe quaternaire, constitué de deux protéines ISCU, deux NFS1, deux ISD11 et deux ACP, formant un dimère de tétramères. Ce complexe quaternaire va transitoirement recruter soit deux FXN, soit deux FDX, et ainsi former deux nouveaux types de complexes protéiques différents, appelés complexe quaternaire frataxine et complexe quaternaire ferrédoxine (Figure 49). Il n'est pas encore établi de façon claire si ces deux protéines se fixent de façon séquentielle, et si c'est le cas dans quel ordre, et si elles sont capables de se fixer ensemble.

3.1.2.2 Transfert et insertion du centre $[2Fe-2S]^{2+}$ dans la protéine cible

Après la formation de l'agrégat $[Fe-S]$ sur la protéine ISCU, celle-ci est détachée du complexe protéique grâce à l'action de plusieurs protéines chaperonnes. Ces dernières vont ensuite permettre le transfert de ce centre métallique vers une apoprotéine mitochondriale cliente. Comme précédemment, cette étape est encore mal connue chez les mammifères, notamment en ce qui concerne la fonction exacte des protéines chaperonnes, mais surtout comment elles interagissent.

Les différentes études menées sur les procaryotes et la levure permettent d'extrapoler que chez les mammifères la libération du centre $[Fe-S]$ de la protéine ISCU se fait grâce à l'action conjointe de la protéine chaperonne GRP75, et de sa co-chaperonne HSCB (Figure 50). Le modèle actuel propose que ce processus se déroule de la façon suivante :

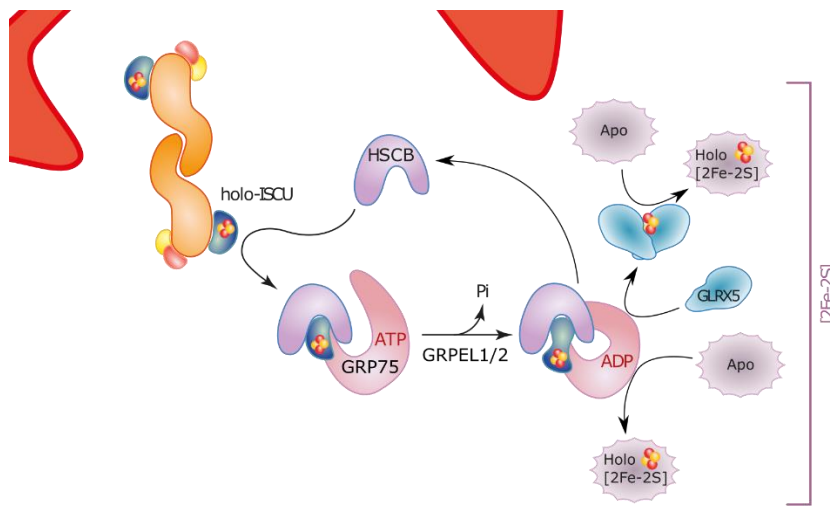


Figure 50 : Modèle du transfert et de l'insertion du centre $[2Fe-2S]^{2+}$ dans les apoprotéines mitochondriales cibles.

- L'interaction de la co-chaperonne HSCB avec l'holo-ISCU provoque un changement de conformation de cette dernière. Cela aurait pour conséquence une diminution de son affinité pour le complexe quaternaire, au profit d'une augmentation d'affinité pour HSCB.^{146,147}
- Ces deux protéines vont alors s'associer avec GRP75 liée à une molécule d'ATP. Il est proposé que l'hydrolyse de cette dernière en ADP induit alors des changements de conformation de GRP75 et de l'holo-ISCU, permettant la libération d'HSCB.¹⁴⁸
- Il est envisagé que HSCB et GRPEL1/2¹⁴⁹ établissent la liaison du centre $[Fe-S]$ à ISCU, préparant ainsi sa dissociation.¹⁵⁰
- La libération proprement dite de l'agrégat $[Fe-S]$ et de la protéine ISCU se ferait grâce au remplacement de l'ADP de GRP75 par de l'ATP.

Il a initialement été envisagé que la monothiol glutaredoxine GLRX5 soit l'élément central permettant le transfert du centre $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ de GLRX5 vers une protéine mitochondriale cible.¹⁵¹ Mais ce modèle où seule cette protéine délivre le centre $[\text{Fe-S}]$ aux apoprotéines, est remis en question puisque de plus en plus de données tendraient à montrer que certaines protéines mitochondriales peuvent interagir directement avec le complexe $[\text{HSCB-GRP75-ISCU2}]$. Ceci suggère que le complexe $[\text{HSCB-GRP75-ISCU2}]$ servirait d'aiguillage, permettant la distribution des agrégats $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$. Le fonctionnement exact de cette étape est donc encore sujet à débat, et une étude structurale des complexes impliqués permettrait de mieux comprendre les différentes étapes du processus.

3.1.2.3 Synthèse et insertion du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ dans la protéine cible

La dernière étape prise en charge par le système ISCU est l'insertion d'un agrégat $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ dans les apoprotéines mitochondriales clientes, dont plusieurs jouent des rôles fondamentaux dans le métabolisme mitochondrial. On peut citer comme exemples l'aconitase du cycle de Krebs, ou encore les complexes I et III de la chaîne respiratoire (Figure 51).

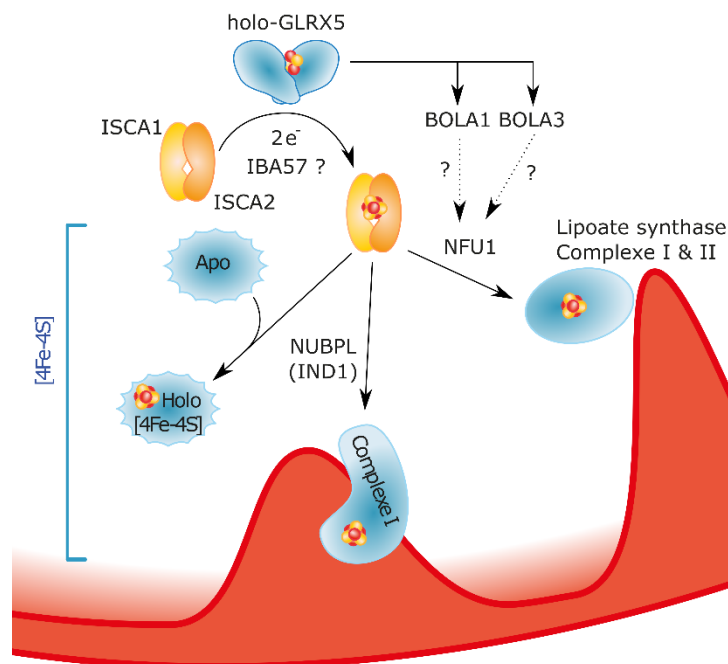


Figure 51 : Synthèse et insertion du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ dans la protéine mitochondriale cible (apo).

Des études *in vitro* suggèrent que la synthèse de l'agrégat $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ se fasse à partir de 2 clusters $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ grâce aux protéines Iron Sulfur Cluster Assembly 1 et Iron Sulfur Cluster Assembly 2 (ISCA1 et ISCA2^{152,153}). A partir de là plusieurs scénarios coexistent pour expliquer l'incorporation de l'agrégat dans les protéines cibles :

- Dans certains cas, les protéines acquièrent leur centre $[\text{Fe-S}]$ directement en interagissant avec l'hétérodimère $[\text{ISCA-ISC2}]$.

- Mais dans la majorité des situations, une protéine intermédiaire est impliquée en servant d'intermédiaire vers la protéine cible. Deux protéines principales ont donc été identifiées :
 - NFU1 qui est en particulier impliquée dans la maturation de la lipoate synthase, ou certaines des sous unités des complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale.^{154,155} Ce mécanisme pourrait également impliquer les protéines BOLA1 et BOLA2.¹⁵⁶
 - NUBPL (aussi nommée IND1) sert quant à elle exclusivement à la maturation du complexe I de la chaîne respiratoire.¹⁵⁷

Même si plusieurs protéines ont à ce jour été identifiées comme étant impliquées dans cette dernière étape de la maturation des centres [Fe-S] mitochondriaux, ces mécanismes sont encore mal compris et la nature et le rôle précis de toutes les protéines impliquées restent encore à déterminer.

3.1.3 Pathologies liées à un défaut du système de maturation des centres [Fe-S]

Un nombre croissant de maladies génétiques humaines ont été identifiées au fil des années comme étant la conséquence d'une mutation délétère dans le gène d'une des protéines impliquées dans le système de biosynthèse *de novo* des centres [Fe-S].^{158,159} Néanmoins, ces pathologies sont relativement peu nombreuses et ne concernent en général qu'un petit nombre de patients. Ceci s'explique par le fait que la biosynthèse des centres [Fe-S] est tellement importante pour le fonctionnement correct des cellules, que les mutations sont le plus souvent non viables. Cependant, lorsque qu'il est admis qu'elles induisent des maladies, les protéines mutées ne sont souvent impliquées que vers la fin du processus et/ou la mutation ne fait que diminuer l'efficacité de la machinerie, mais ne l'arrête pas. Ceci est parfaitement illustré par :

- L'anémie sidéroblastique avec déficit de GLRX5, où l'unique patient diagnostiqué à l'heure actuelle présente une diminution de la quantité d'ARNm du gène *glrx5* liée à une accumulation de fer dans les érythroblastes et les macrophages, ainsi qu'une diminution d'activité de l'aconitase dans les cellules mononuclées sanguines périphériques.¹⁵¹
- Dans le cas de la myopathie avec déficit de ISCU, une diminution de la quantité d'ARNm pour le gène *iscu* a pu être mesurée. On note également une diminution de l'accumulation du fer dans les mitochondries et un déficit de la succinate deshydrogénase et de l'aconitase dans les cellules musculaires.¹⁶⁰

Parmi toutes les pathologies décrites, seule l'ataxie de Friedreich concerne un nombre important de personnes. En effet, il s'agit de l'ataxie héréditaire la plus fréquente, qui affecte 1

personne sur 50 000 dans la population caucasienne.¹⁰⁸ Elle provoque une neurodégénérescence progressive¹⁶¹ et dans 59% des cas le décès du malade par un dysfonctionnement cardiaque.¹⁶² Au niveau moléculaire, la maladie est liée à un déficit en FXN, dont le taux d'expression diminue de plus de 70% par comparaison avec un individu sain, provoquant une accumulation de fer dans les tissus, notamment au niveau du cœur, ainsi qu'un déficit d'activité de l'aconitase et des complexes I à III de la chaîne respiratoire mitochondriale.¹⁶³

3.1.4 Etudes structurales par cryo-microscopie électronique du système de biogenèse mitochondriale des centres [Fe-S]

Depuis plusieurs années, nous travaillons sur l'étude structurale de la première étape de la biogenèse des centres [Fe-S] en collaboration avec l'équipe d'H. Puccio (IGBMC, Strasbourg) et S. Ollagnier - de Choudens (LCBM, Grenoble) qui sont toutes deux internationalement reconnues pour leurs travaux sur l'ataxie de Friedreich et la biogenèse des centres [Fe-S].

Une première étape de notre travail sera de développer et de valider notre capacité à réaliser une étude structurale par cryoEM en conditions anaérobies. Pour cela, la première étape de la biosynthèse *de novo* des centres [Fe-S] (chapitre 3.1.1 et Figure 49) est une cible intéressante pour différentes raisons :

- Tout d'abord car plusieurs questions se posent encore sur le mécanisme de cette étape. Actuellement seules les structures des complexes [NFS1-ISD11-ACP] et [NFS1-ISD11-ACP-ISCU] ont pu être obtenues par cristallographie aux rayons-X.^{143,164} Les deux études qui ont permis d'obtenir ces résultats présentent deux structures fondamentalement différentes du complexe [NFS1-ISD11-ACP], suggérant que ce complexe est dynamique et doit adopter différentes conformations. Plusieurs autres complexes avec les autres partenaires de la réaction (FXN, FDX) ont également été étudiés par SAXS. Bien qu'informatives, ces enveloppes sont, par définition, limitées en résolution et ne permettent pas d'accéder à une information précise sur l'interaction entre les différents partenaires protéiques. Il faut également noter que tous les complexes cités ici ont été étudiés en conditions aérobies, correspondant donc à une forme apo sans centre [Fe-S]. Des questions fondamentales se posent donc encore sur le fonctionnement et la dynamique de la machinerie d'assemblage ISC, telles que par exemple : dans quel ordre se produisent les différents événements (apport du fer, transfert du soufre, réduction par les électrons) ; comment se

passer le transfert du fer vers la protéine ISCU ; ou comment FXN régule-t-elle la fonction de la cystéine désulfurase NFS1-ISD11...

- La taille des complexes impliqués est compatible avec la cryoEM (autour de 200 kDa) et ceux-ci possèdent un axe de symétrie d'ordre 2.
- Un autre avantage est que plusieurs structures cristallographiques à haute résolution des protéines indépendantes, ou d'homologues, sont disponibles, ce qui permettra d'envisager leur recalage moléculaire dans les reconstructions des complexes que nous obtiendrons.^{143,164-169}
- Enfin, nos collaborateurs et nous maîtrisons la production et la purification des protéines de ce système. Cette étape sera fondamentale quelle que soit la machinerie considérée car c'est à cette étape-là que nous pourrions avoir une chance de maîtriser l'homogénéité de l'échantillon. Dans le cas du complexe [ISCU-NFS1-ISD11-ACP-FXN], nous avons déjà noté qu'il n'est homogène que pendant un temps limité puisque la protéine FXN se détache spontanément au bout de quelques heures ou après la congélation de l'échantillon.

Nous allons donc commencer par étudier les complexes [ISCU-NFS1-ISD11-ACP] en présence et en absence de leur partenaire protéique FXN et/ou FDX, en anaérobiose de façon à obtenir les différents états avant formation des centres [Fe-S]. Ceci permettra d'obtenir des informations plus précises, ce qui devrait nous aider à mieux comprendre ce processus fondamental pour la vie des cellules des mammifères, mais également nous renseigner sur les bases moléculaires du mode d'interaction de la FXN avec ses partenaires.

La biosynthèse mitochondriale des centres [Fe-S] présente également des étapes de transfert des centres métalliques que nous pourrions étudier en utilisant la même démarche expérimentale :

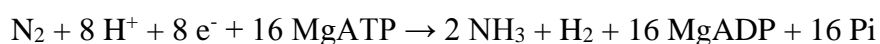
- L'étape de transfert de l'agrégat $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ nouvellement synthétisé vers les protéines mitochondriales clientes est encore incomplètement comprise, notamment au niveau du mécanisme moléculaire exact de cette étape, ainsi que la nature et la dynamique des complexes étudiés. Une des premières cibles serait l'étude du complexe d'environ 210 kDa formé entre [NFS1-ISCU-ISD11-ACP] et la protéine co-chaperonne HSCB, qui permettrait d'examiner les mécanismes moléculaires permettant de détacher puis de transférer ISCU du complexe de synthèse du centre [Fe-S] vers la chaperonne HSCB, semblant jouer un rôle central dans sa distribution.

- Pour les mêmes raisons, il serait très intéressant d'analyser les structures des complexes se formant autour du trimère [HSCB–GRP75–ISCU] avec ou sans ATP/ADP, la protéine GLRX5, ou des protéines clientes sous forme apo, afin de pouvoir proposer un ou plusieurs modèles des mécanismes d'insertion spécifique d'un même cofacteur dans une grande variété de protéines clientes. La taille de ces complexes se situe entre 100 et 200 kDa. En l'état actuel des avancées en cryoEM, les complexes protéiques d'une taille proche de 100 kDa sont étudiables, mais encore difficilement. Néanmoins, au vu de la direction que semble prendre la microscopie des particules uniques, il est très possible que dans un avenir relativement proche ce type de structures soit beaucoup plus facilement accessible.
- Un dernier exemple serait l'étude de l'étape d'export de centre [Fe–S] vers le cytoplasme grâce à un système de type ABC (ATP Binding Casette), dont tous les éléments ne sont pas encore identifiés, mais dont l'élément central est la protéine trans-membranaire ABCB7. L'étude de cette protéine et de son interaction avec ses différents partenaires pourrait notamment aider à identifier la nature exacte de l'élément transféré à travers la membrane mitochondriale vers le système CIA.

3.2 Maturation de l'agrégat FeMo-co de la nitrogénase

3.2.1 Nitrogénases

Un élément indispensable à tous les êtres vivant est l'azote (N), essentiellement impliqué dans la composition des acides aminés et des acides nucléiques. On peut ainsi estimer que le corps d'un être humain contient 3% d'azote. Alors que l'atmosphère est composée de 78% d'azote moléculaire (N₂), cette source est inaccessible à la vaste majorité des organismes, dont les eucaryotes. En effet, ces derniers ne sont capables d'assimiler que des formes réactives de l'azote, soit oxydées comme par exemple NO_x, NO₃⁻, HNO₃, soit réduites tels que NH₃, NH₄⁺, ou les amines.¹⁷⁰ Seuls certains procaryotes possèdent la capacité d'utiliser directement l'azote moléculaire, et sont ainsi appelés diazotrophes. Ces organismes jouent un rôle clef dans le cycle de l'azote en rendant bio-accessible le N₂ d'abord transformé en ammoniac (NH₃). Ce processus biologique compte pour deux tiers de tout l'azote fixé.¹⁷¹ Les organismes diazotrophes possèdent un complexe enzymatique appelé nitrogénase, capable de cliver en conditions physiologiques la liaison triple N≡N de l'azote moléculaire, l'une des molécules les plus stables dans la nature, selon la réaction suivante :^{172,173}



Toutes les nitrogénases sont des systèmes protéiques à deux composants :

- Une dinitrogénase : responsable de la coupure de la triple liaison de l'azote moléculaire et de la formation de l'ammoniac. En fonction de la composition de son site actif, trois familles de nitrogénases ont été définies, possédant une origine évolutive commune :¹⁷³
 - Les nitrogénases à molybdène, qui sont de loin les plus abondantes, que ce soit chez les bactéries ou les archées
 - Les nitrogénases à vanadium
 - Les nitrogénases à fer seul.
- Une dinitrogénase réductase. Elle présente une fonction dépendante de l'ATP et sert de donneur spécifique d'électrons à la dinitrogénase.

Le modèle de cette famille de protéines est la nitrogénase à Mo d'*Azotobacter vinelandii* (Figure 52A). Il s'agit d'un complexe composé d'un hétérotétramère [NifD₂-NifK₂] contenant deux agrégats [8Fe-7S] (appelés « agrégats P » - Figure 52C) permettant le transfert des électrons aux sites actifs composés de deux agrégats [Mo-C-7Fe-9S-homocitrate] (également appelés FeMo-co ou encore « agrégats M » - Figure 52B). Les électrons nécessaires à la réaction sont apportés par un troisième partenaire qui correspond à deux homodimères de NifH, chacun possédant un agrégat [4Fe-4S]²⁺ à l'interface des deux sous unités.

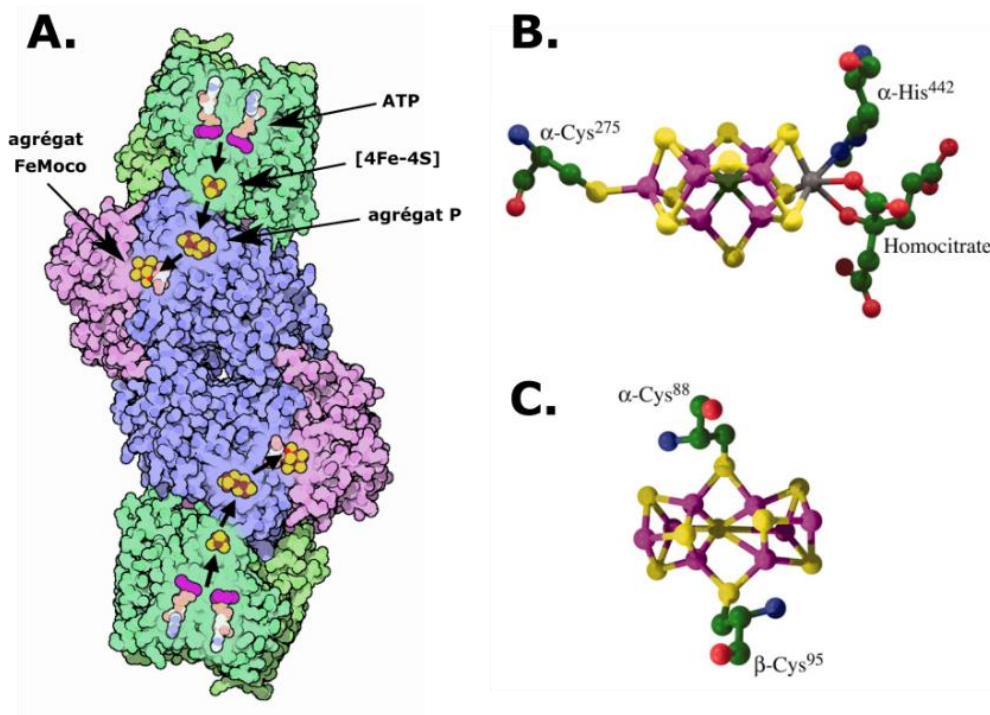


Figure 52 : (A) Structure de la nitrogénase à molybdène. Les deux homodimères de la protéine à Fer dépendante de l'ATP (NifH) sont représentés en vert. Les protéines de l'hétérotétramère [NifD₂-NifK₂] contenant les agrégats P et FeMo-co sont représentées en bleu et rose. (<http://pdb101.rcsb.org/motm/26>) Représentation des agrégats (B) FeMo-co et (C) P. Les atomes de carbone, azote, oxygène, soufre, fer et molybdène sont colorés respectivement en vert, bleu, rouge, jaune, rose et gris. (Figure de ¹⁷⁴)

Il a également été montré que les nitrogénases sont des enzymes versatiles car, en plus du N₂, elles sont également capables de catalyser la réduction de petites molécules contenant du carbone, comme le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde de carbone (CO₂) ou l'acétylène (C₂H₂) en hydrocarbures.¹⁷⁵

La biosynthèse des agrégats de la nitrogénase est un processus complexe qui se fait *in situ* dans le cas du centre P et sur une protéine échafaudage pour le FeMo-co.¹⁷⁶ A cause de la composition particulière de ses centres métalliques, basée principalement sur des centres [Fe-S], ce complexe protéique est extrêmement sensible à la dégradation par l'oxygène moléculaire et doit de ce fait être étudié en conditions anaérobies strictes.

3.2.2 Biosynthèse du FeMo-co par le système Nif

La biosynthèse de l'agrégat [Mo-C-7Fe-9S-homocitrate] se fait grâce à une machinerie encodée par l'opéron *nif* qui contient vingt gènes, et il est estimé que le système minimum est constitué de huit protéines.¹⁷⁷ La maturation du FeMo-co peut se décomposer en quatre grandes étapes en fonction de l'état d'avancement de l'assemblage du cluster (Figure 53).^{178,179}

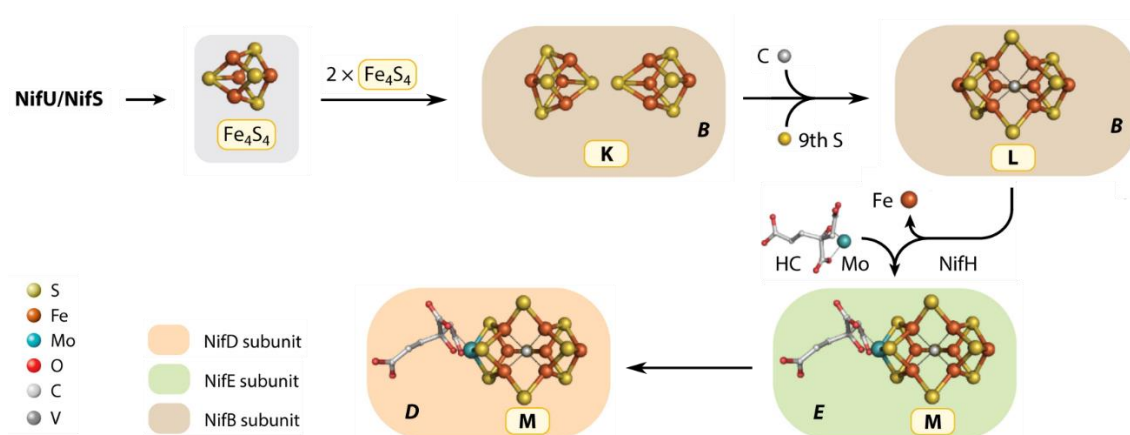


Figure 53 : Représentation schématique des différentes étapes de la biosynthèse de l'agrégat FeMo-co (ici appelé M). La figure est adaptée de Hu Y. *et al.* (2016). (Figure adaptée de ¹⁷⁶)

3.2.2.1 Synthèse d'agrégats [4Fe-4S]²⁺

La première étape implique le complexe protéique NifS/NifU, qui possède la capacité de mobiliser le Fe et S. NifS est une cystéine désulfurase dépendant du phosphate de pyridoxal, qui catalyse la formation d'un persulfure sur une de ses cystéines, avant de le transférer à NifU, la protéine échafaudage.¹⁸⁰ Ceci permet la formation séquentielle de deux centres [2Fe-2S]²⁺ qui sont ensuite modifiés en un agrégat [4Fe-4S]²⁺ par un mécanisme de couplage réductif. Son fonctionnement est similaire à celui du système IcsS-IscU de la machinerie d'assemblage des centres [FeS] (voir chapitre 3.1.2.1), même si les deux mécanismes ne sont pas entièrement interchangeables.¹⁸¹

3.2.2.2 Synthèse du centre NifB-co sur la protéine NifB

Deux agrégats $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ sont ensuite transférés sur la protéine NifB pour former le centre K (Figure 53). Leur fusion, puis l'apport d'un atome de C^{4-} et d'un neuvième atome de S, permet la formation d'un agrégat $[8\text{Fe-9S-C}]$ appelé agrégat L. Ce centre a une structure proche du FeMo-co à l'exception du fait qu'il manque encore l'atome de molybdène et la molécule d'homocitrate.

La protéine NifB a été identifiée comme faisant partie de la famille des protéines à radical S-Adénosine Méthionine (SAM), notamment parce qu'elle possède un motif caractéristique $\text{CX}_3\text{CX}_2\text{C}$ qui sert à fixer un agrégat $[4\text{Fe-4S}]$ responsable de la liaison d'une molécule de SAM. Cette molécule est utilisée dans les cellules pour (Figure 54) :

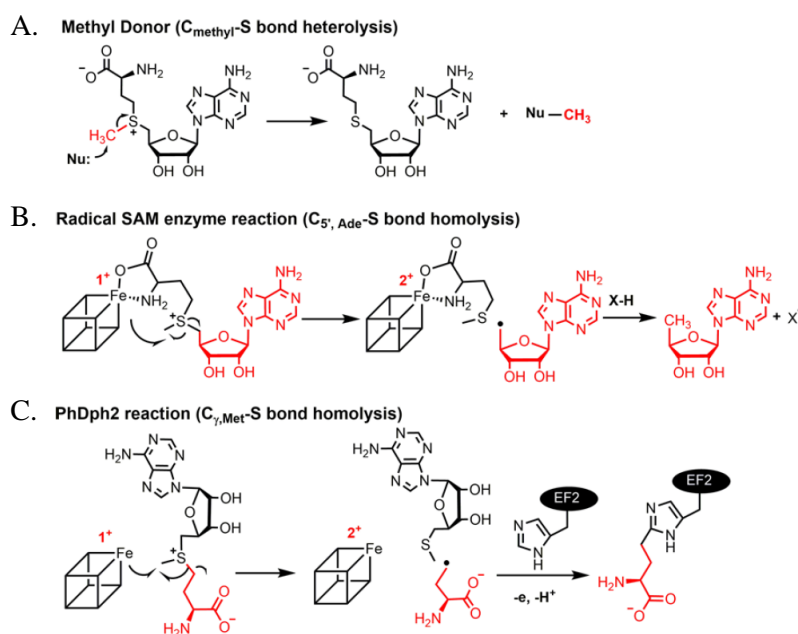


Figure 54 : Représentation des trois catégories de coupures de la liaison C-S de la SAM catalysées par les protéines à radical SAM. (Figure adaptée de ¹⁸³)

- Réaliser des réactions de méthylation (Figure 54A).
- Catalyser des réactions radicalaires. Deux types d'intermédiaires peuvent ainsi être formés :
 - Le radical $5'$ -dA $^\bullet$ est formé par la rupture homolytique de la liaison entre le carbone $5'$ du ribose et le soufre de la méthionine (Figure 54B). Il s'agit du mécanisme catalysé par la quasi totalité des protéines à radical SAM (Figure 54B).
 - Le radical 3-amino-3-carboxypropyle (ACP) formé par la coupure homolytique de la liaison entre le carbone γ et le soufre de la méthionine (Figure 54C). Ce mécanisme n'a été identifié, pour le moment, que dans le

cas de la biosynthèse de la diphthamide chez les archées et les eucaryotes (Figure 54C).¹⁸²

La famille de protéines à radical SAM contient à ce jour environ 113 000 membres qui catalysent des réactions très différentes et sont impliqués dans des mécanismes cellulaires centraux telle que par exemple la synthèse de cofacteurs et vitamines, mais aussi dans la modification d'ARN_t, ou la synthèse d'antibiotiques.

Lors de l'étude du mécanisme de la réaction catalysée par NifB, deux produits de coupure de la SAM ont pu être identifiés, ce qui suggère que deux molécules de SAM sont nécessaires pour former l'agrégat L à partir de l'agrégat K (Figure 55) :^{184,185}

- La première molécule de SAM est le donneur d'un méthyl qui donnera à la fin de la réaction le carbure central (C⁴⁻) du centre métallique. Cette réaction libère donc la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) comme produit de clivage.
- La seconde molécule de SAM est utilisée dans une réaction radicalaire qui permet d'arracher l'un des atomes d'hydrogène du méthyl précédemment inséré entre les deux centres [4Fe-4S]²⁺. Il en résulte la libération d'une molécule de 5'-désoxyadénosine (5'-dAH), mais aussi le transfert du radical sur le centre métallique.

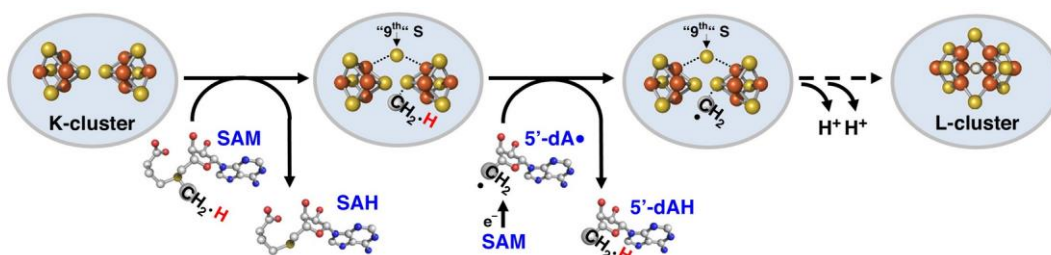


Figure 55 : Modèle de la formation de l'agrégat L par la protéine NifB à partir de l'agrégat K. (Figure adaptée de ¹⁸⁴)

La protéine NifB est donc une protéine remarquable car elle catalyse à la fois l'insertion d'un ion carbure et d'un atome de soufre entre les centres [4Fe-4S]²⁺ grâce à une réaction radicalaire dont le mécanisme est encore largement incompris. En effet au moins deux étapes clés de cette réaction restent encore à élucider :

- L'insertion du 9^{ème} atome de soufre. Ni la source de cet atome, ni son mécanisme d'insertion n'ont pu être identifiés.
- Le mécanisme permettant la déshydrogenation complète du radical CH₂• en carbure ainsi que la « fusion » des deux centres [4Fe-4S] en agrégat L.

Pour répondre à ces différentes questions, la structure de la protéine NifB serait extrêmement utile, mais malheureusement celle-ci n'a pas, jusqu'à présent pu être résolue.

3.2.2.3 Synthèse du centre FeMo-co sur NifE/N

A cette étape de sa biosynthèse, le centre métallique L est transféré sur la protéine NifE du complexe NifE/NifN. Ces deux protéines présentent chacune une similarité importante avec les protéines NifD et NifK qui constituent le complexe nitrogénase actif auquel sera apporté le FeMo-co :

- Les protéines des deux complexes présentent une identité de séquence importante.
- NifE/NifN et NifD/NifK forment toutes deux un dimère de dimères.
- NifE/NifN possède quatre des six cystéines permettant la fixation du centre P dans le complexe NifD/NifK. De ce fait, NifE/NifN possède à cette position un « simple » agrégat [4Fe-4S] au lieu du plus complexe centre [8Fe7S] de la nitrogénase (Figure 56).
- Enfin NifE/NifN possède une cavité homologe au site actif de NifD/NifK. Une des cystéines impliquées dans la fixation du FeMo-co y est conservée, les autres étant remplacées par des asparagines.

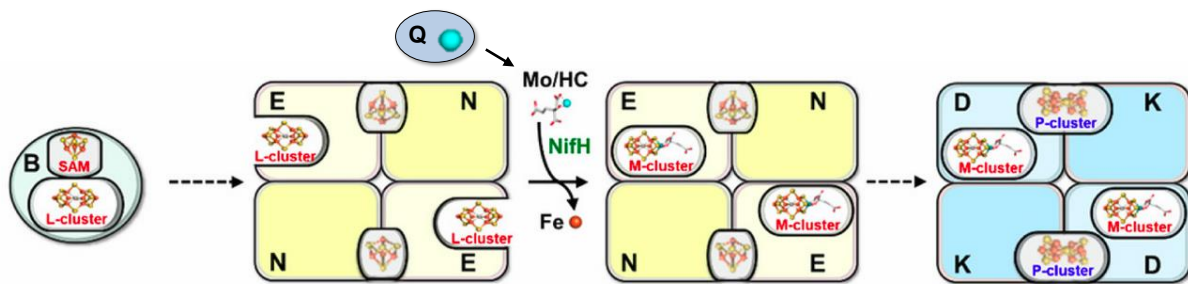


Figure 56 : Modèle de la maturation du centre L, mûri et délivré par NifB, en agrégat M (ou FeMo-co) par l'action conjointe des protéines NifE, NifN et NifH. Le centre métallique est ensuite transféré à la nitrogénase NifD/NifK.
(Figure adaptée de ¹⁸⁶)

Une fois sur le complexe NifE/NifN, le centre L va subir deux modifications :

- le remplacement d'un des atomes de fer par un atome de molybdène ;
- La fixation sur cet atome de Mo d'une petite molécule organique : un homocitrate.

Il est suggéré que ces deux événements se passent de façon concomitante, et ne peuvent se faire sans l'action de la protéine NifH et peut-être aussi de la protéine NifQ.^{171,187,188} Le rôle de chacune de ces protéines est encore sujet à débat, et l'ensemble de ce mécanisme n'est encore que très partiellement compris. En particulier le devenir de l'atome de Fe, qui est remplacé dans ce processus par un atome de Mo, est encore débattu.

3.2.2.4 Transfert du centre FeMo-co sur la nitrogénase

Enfin, la dernière étape de la maturation de l'agrégat M est son insertion dans le complexe NifD/NifK qui constitue la nitrogénase active. Il est proposé que l'interaction des complexes NifE/NifN avec NifD/NifK, permettant le transfert du FeMo-co, n'est possible que

lorque NifE/NifN contient un centre métallique complètement mûré (centre M). Ce transfert est, encore une fois, un processus complexe car le FeMo-co doit migrer du site d'assemblage à l'intérieur de NifE/NifN, vers la surface du complexe, puis est pris en charge par les résidus de NifD/NifK afin d'être transféré dans le site actif de la nitrogénase, et cela en préservant à tout moment l'intégrité du centre métallique. Il semble que ce processus implique d'autres protéines appartenant à l'opéron *nif*, notamment NifY qui copurifie avec NifE/NifN lorsqu'elle n'est pas chargée avec le FeMo-co. Cette dernière est proposée comme transporteur faisant ainsi le lien entre le site d'assemblage du FeMo-co et le site actif de la nitrogénase.

3.2.3 Utilisation des nitrogénases

La réaction catalysée par la nitrogénase est remarquable car elle permet de réaliser la coupure de la triple liaison de l'azote moléculaire dans des conditions douces, ce qui n'est actuellement pas possible par d'autres processus chimiques. En effet, la production industrielle d'ammoniac se fait à partir de H₂ et de N₂ mis en présence d'un catalyseur à base de fer (l'osmium ou l'uranium ont également été utilisés), et soumis à une haute pression (environ 200 bar) et une haute température (500 à 600°C). Ce procédé, nommé d'après ses deux inventeurs F. Haber et C. Bosch, a été mis au point entre les années 1908 et 1913, et il est depuis très largement utilisé, majoritairement pour la production d'engrais. Ceci a joué un rôle important dans la transformation de l'agriculture à partir des années 1950, qui est devenue plus productive et que l'on a par la suite appelée la révolution verte. Une des conséquences fut une augmentation du taux de croissance de la population mondiale. On estime actuellement que 80% de l'azote d'un être humain a été produit par le procédé Haber – Bosch.¹⁸⁹

Depuis les années 70, il a été envisagé de faire en sorte que les céréales que l'on cultive produisent leur propre source d'engrais (azote bio-assimilable).¹⁹⁰ Ceci aurait le double avantage d'augmenter le rendement de croissance de la plante, tout en limitant énormément la pollution des sols et des nappes phréatiques par de l'azote non assimilé. Une des solutions possibles est de modifier génétiquement la plante pour qu'elle produise constitutivement une nitrogénase active. Même si cette stratégie se heurte à plusieurs difficultés pour sa mise en œuvre, de nombreuses recherches sont menées dans cette direction et on peut espérer qu'elle aboutiront dans les années à venir.^{170,191}

La production biologique d'hydrogène est depuis longtemps identifiée comme un moyen prometteur de disposer d'une source d'énergie renouvelable et propre. Bien évidemment, même si l'hydrogénase est l'enzyme de choix pour réaliser cette synthèse, la nitrogénase en est aussi capable car en plus de l'ammoniac, elle synthétise également du H₂ comme produit secondaire de la réaction. Plusieurs stratégies sont donc testées afin de pouvoir

améliorer l'activité de la nitrogénase et donc augmenter la production d'hydrogène moléculaire. Un exemple est l'étude d'évolution dirigée, par mutagenèse aléatoire, de la protéine NifH. Cette protéine a été choisie comme cible car l'étape limitante dans la réaction catalysée par la nitrogénase est la dissociation de NifH₂ de [NifD₂-NifK₂] et la libération du phosphate inorganique de NifH.¹⁹² Un mutant, tronqué de 124 acides aminés en C terminal de la protéine, a ainsi été identifié, permettant de produire 10 fois plus d'H₂ que la protéine sauvage.¹⁹³ Cet exemple montre que dans les biosynthèses, les étapes limitantes ne sont pas toujours les étapes de catalyse que l'on considère comme clefs mais, qu'il s'agit parfois des étapes de transfert, d'association, ou de dissociation.

Une dernière application potentielle de la nitrogénase vient du fait que cette protéine est versatile, puisqu'elle possède la capacité de fixer et réduire d'autres substrats que l'azote moléculaire. En effet, elle est capable de réduire des gaz contenant 1 ou 2 atomes de carbone, tel que par exemple l'acétylène, l'éthylène ou le cyanure. Mais il a également été montré qu'en fonction des conditions expérimentales et de la nature de la nitrogénase utilisée, il était possible de catalyser la réduction de CO₂ en CO,¹⁹⁴ puis du CO en petits hydrocarbures.¹⁹⁵ Ceci pourrait ouvrir la voie à la potentielle modification d'organismes fixateurs d'azote en organismes producteurs de biocarburants.¹⁹⁶

Mais dans tous les cas il est indispensable que les différents centres métalliques du complexe nitrogénase soient correctement assemblés. Il est de ce fait important de bien comprendre comment se déroule ce processus, et notamment celui concernant le FeMo-co.

3.2.4 Etudes structurales par cryo-microscopie électronique du système de biogenèse du FeMo-co

La nitrogénase et son système de maturation sont des systèmes protéiques complexes que l'on ne comprend encore que partiellement et à propos desquels se posent encore beaucoup de questions, comme par exemple : comment est apporté l'homocitrate et sous quelle forme ; comment est apporté et inséré l'atome de molybdène et sous quelle forme ; mais surtout comment est formé le NifB-co (ou complexe L). L'étude structurale des différents complexes impliqués permettrait ainsi de mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre.

Nous collaborons depuis plusieurs années avec l'équipe de L.M. Rubio de l'« Universidad Politécnica de Madrid », spécialiste de la biochimie de la nitrogénase et de sa maturation. Cette équipe a réussi à exprimer plusieurs des protéines impliquées, dont la nitrogénase NifD/NifK, directement chez *A. vinelandii*, ce qui permet d'obtenir des protéines correctement repliées et possédant le bon contenu métallique. Mais les efforts de biologie moléculaire et de biochimie pour les différents complexes protéiques sont partagés entre nos

deux laboratoires, et nous prenons à notre charge la production et la purification de plusieurs des protéines.

Trois étapes de ce processus de maturation du FeMo-co semblent particulièrement intéressantes à étudier par microscopie électronique :

- La synthèse du centre NifB-co (centre L)
- La maturation du NifB-co en FeMo-co (agrégat M)
- Le transfert de l'agrégat M du complexe protéique échafaudage NifE/NifN vers la nitrogénase NifD/NifK.

Dans tous les cas, à cause de leur contenu métallique, tous ces complexes sont sensibles à l'oxygène et doivent donc être étudiés en conditions anaérobies strictes.

3.2.4.1 Synthèse du centre NifB-co

La première cible possible est la protéine NifB car elle est responsable de l'unique exemple protéique de l'insertion d'un ion carbure au sein d'un centre métallique et parce que cette étape est encore très mal comprise. La méthode de choix pour son étude structurale est logiquement la cristallographie aux rayons-X, mais malheureusement sa structure résiste encore aux nombreuses tentatives menées depuis plusieurs années par notre équipe et par d'autres laboratoires. De par sa taille, environ 47 kDa, il n'est, à première vue, pas encore envisageable de l'étudier par cryoEM. Mais nous avons récemment constaté que les protéines NifB de certains organismes tel que *Chlorobaculum tepidum*, s'assemblent artefactuellement en complexes contenant entre six et sept protéines en conditions anaérobies. Nous avons par la suite pu observer ces structures, en forme d'anneaux, par microscopie électronique en coloration négative. Ces formes oligomériques de NifB sont alors assez grosses (environ 280 ou 330 kDa) pour être étudiées par cryoEM à partir du moment où il est possible de préparer des grilles en conditions anaérobies. De plus, la symétrie interne du complexe devrait faciliter la reconstruction.

3.2.4.2 Maturation du centre NifB-co

Une cible de choix pour la microscopie électronique est l'étude structurale des différentes étapes de maturation du NifB-co en FeMo-co sur le complexe NifE₂/NifN₂. Elle nous permettra, d'une part, de tester et de valider notre capacité à réaliser une étude structurale de cryoEM en conditions anaérobies, mais également de nous intéresser aux mécanismes de transfert entre les différentes protéines.

La structure cristalline de ce complexe protéique liée au centre L a été résolue et présente une organisation similaire à celle de NifD₂/NifK₂.¹⁹⁷ Néanmoins, le centre L est fixé sur NifE dans un site proche de la surface, différent du site de fixation du FeMo-co sur NifD. De plus,

dans cette structure, NifE adopte une conformation plus ouverte que la forme holo de NifD, mais également plus fermée que la forme apo de NifD. Tout ceci suggère que le processus de maturation du FeMo-co implique différentes étapes nécessitant des migrations du centre métallique et des réarrangements structuraux du complexe protéique. Afin de mieux comprendre ce processus, plusieurs cibles sont envisageables :

La première cible sera le complexe NifE₂/NifN₂ seul, qui correspond à un hétérotétramère d'environ 200 kDa avec un axe de symétrie d'ordre 2. L'obtention de la structure des formes apo, holo avec le centre L et holo avec le centre M permettra de faire progresser notre compréhension du fonctionnement de cette étape de la maturation. Du point de vue pratique, notre collaborateur maîtrise la production et la purification de ces espèces en quantité importante, ce qui est un réel avantage pour le projet.

Par la suite, nous pourrions nous intéresser à l'insertion du Mo et de l'homocitrate. Cette étape est encore très mal connue puisque même la nature exacte des acteurs protéiques est encore sujette à controverse. A titre d'exemples, on ne sait pas exactement :

- Si la protéine NifQ est bien responsable de l'apport de l'atome de Mo ;
- Laquelle des protéines NifQ ou NifH est responsable de la réduction du Moⁿ⁺ ;
- Comment les différents partenaires interagissent.

Afin d'apporter des éléments de réflexion et de réponse à ces interrogations, il conviendra d'étudier les structures de :

- NifE₂/NifN₂ en complexe avec NifH. Cela permettra de s'intéresser au fonctionnement du transfert du molybdène et de l'homocitrate vers le centre L. Afin d'obtenir des informations structurales pour les différentes étapes du transfert, on pourra envisager d'utiliser des formes mutantes des différentes protéines. Il est proposé que NifQ apporte le centre Mo-homocitrate au centre L, alors présent dans un site proche de la surface de NifE/NifN, avant que le tout ne migre dans un site de fixation plus enfoui (environ 10Å) correspondant au site actif dans le cas de la nitrogénase NifD/NifK. Afin de bloquer ce transfert, on pourrait par exemple envisager de muter les résidus supposés responsables de la fixation du centre M telle que la cystéine 250.
- Le rôle de NifQ pourra également être étudié. Il est envisagé qu'il soit responsable de l'apport de l'atome de Mo. L'obtention d'une structure entre NifE₂/NifN₂ et NifQ en présence ou en absence de NifH permettra sûrement de mieux comprendre l'enchaînement des événements permettant le transfert du Mo. Est-ce que NifQ, qui est capable de fixer le Mo, l'apporte à NifH, ou le Mo est-il directement transféré à NifE/NifN ? Sous quelle forme est transféré le Mo ?

- Une autre étape de ce mécanisme reste encore peu connue : comment se fait le transfert du centre L de NifB vers le complexe NifE/NifN ? Pour répondre à cette question, la résolution d'une structure de ces trois protéines en complexe serait très informative.

3.2.4.3 *Transfert de l'agrégat FeMo-co*

La dernière étape de la maturation du FeMo-co est son transfert sur la nitrogénase NifD/NifK. Là aussi ce sont les mécanismes de transfert du centre métallique qui nous intéressent car ils sont très mal compris. Certains auteurs proposent que cette migration soit directe, grâce à l'interaction directe de NifE₂/NifN₂ et NifD₂/NifK₂. D'autres auteurs proposent que ce transfert nécessite l'action d'autres protéines, en particulier NifY. Dans tous les cas, ce processus doit impliquer plusieurs étapes, ainsi que des changements de conformations protéiques, puisque le FeMo-co doit être déplacé du cœur de la protéine NifE vers un site similaire de NikD tout en préservant son intégrité, c'est-à-dire en le préservant de la dégradation par l'oxygène. Il serait donc très instructif de réaliser une étude structurale de l'interaction entre NifE₂/NifN₂ et NifD₂/NifK₂ en présence et en l'absence de NifY. Là encore le contrôle de la maturation et de l'intégrité des différents centres métalliques des protéines sera très important.

3.3 **Perspectives de recherche à long terme**

Comme nous l'avons vu précédemment, les systèmes de biogenèse mitochondriale des centres [Fe-S] et de maturation de la nitrogénase sont des mécanismes complexes fondamentaux, qui offrent de nombreuses opportunités d'études structurales. Mais ces deux systèmes sont très loin d'être les seuls qui bénéficieraient de la mise en place de la capacité de réaliser les grilles de microscopie électronique en conditions anaérobies. Il sera ainsi possible d'étudier la structure d'un grand nombre de complexes protéiques sensibles à l'oxygène, ce qui est jusqu'à présent impossible à obtenir.

Par exemple nous pourrions nous intéresser à d'autres systèmes biologiques impliquant des métalloprotéines, tel que par exemple le complexe HydEGF, responsable de la maturation du site actif de l'hydrogénase à Fe-Fe HydA,^{198,199} qui a été intensivement étudiée au laboratoire.^{26,200,201} Mais il existe encore un grand nombre de complexes de métalloprotéines, notamment chez les méthanogènes, liés au métabolisme de l'hydrogène et du C1 (CO₂, CO, CH₄) qui restent à élucider.

Dans tous les cas présentés ici, si l'on veut comprendre les mécanismes mis en jeu, il est indispensable de préserver l'intégrité des centres métalliques impliqués et donc de travailler dans un environnement où le taux d'oxygène est minimal.

Enfin, il sera également envisageable de rendre accessible notre capacité de congélation des grilles de cryoEM en anaérobiose, ainsi que notre expertise à l'ensemble de la communauté scientifique.

Curriculum Vitae

CHERRIER Mickaël V.

Assistant Professor (Maître de conférences) – section 64

Université Grenoble Alpes (UGA)
UFR de Chimie et de Biologie

Home address

✉ 5 quarter rue du thénevet
38210 Tullins
France

☎ +33 6 24 36 74 23

Professional address

✉ Metalloproteins Unit
Institut de biologie Structurale (IBS)
EPN Campus, CS 10090
71 avenue des Martyrs
38044 Grenoble cedex 9
France

☎ +33 4 57 42 87 58
✉ mickael.cherrier@ibs.fr

EDUCATION

- 2006 **Ph.D., Protein Crystallography.** University J. Fourier, Grenoble, France.
Crystallographic studies of the NikA and NikR proteins involved in nickel transport in *Escherichia coli*. When the NikA structure hints at a possible new metallophore.
Ph.D. advisor: Juan C. Fontecilla Camps.
- 2003 **Higher European Research Course for Users of Large Experimental Systems (HERCULES).** University J. Fourier, Grenoble, France.
- 2002 **DEA (predoctoral diploma) in Biological Crystallography and NMR.** University L. Pasteur, Strasbourg, France (Ranked 1st among 18).
- 2002 **Magistère (Master of Sciences) in Chemistry and Biology.** University L. Pasteur, Strasbourg, France. University engineer diploma.
- 2001 **Maîtrise (Fourth University year) in Structural Biochemistry.** University L. Pasteur, Strasbourg, France.
- 2000 **Licence (Bachelor of Sciences) in Biochemistry.** University L. Pasteur, Strasbourg, France.

PROFESSIONAL EXPERIENCES - RESEARCH

- 01/09/16 – Present **Assistant Professor** – University Grenoble Alpes
Metalloprotein Unit, Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-
CNRS-UGA, Grenoble, France.
Project: Structural studies of metalloenzymes.
Group leader: Yvain Nicolet.

- 01/09/13 – 31/08/16 **Assistant Professor** – University Claude Bernard Lyon
Structural Biology of Bacterial Macromolecular Complexes (SBBMC)
Institut de Biologie et de Chimie des Proteines (IBCP)
Project: Structural studies of bacterial replication initiation.
Group leader: Laurent Terradot.
- 01/03/12 – 29/08/13 **Post-Doc, Protein Crystallography.**
Metalloprotein Unit, Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-
CNRS-UJF, Grenoble, France.
Project: Structural studies of artificial metalloenzymes and of the
quinolinate synthase.
Research advisor: Juan C. Fontecilla Camps.
- 01/07/11 – 29/02/12 **Post-Doc, Protein Crystallography.**
Metalloprotein Unit, Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-
CNRS-UJF, Grenoble, France.
Project: Changing the periplasmic nickel transport protein NikA into
an artificial monooxygenase.
Research advisor: Christine Cavazza.
- 01/09/09 – 30/06/11 **Post-Doc, Beamline scientist, Protein Crystallography.**
European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), BM16.
- 01/02/07 – 30/06/09 **Post-Doc, cryo-Electron Microscopy and Protein Crystallography.**
Rossmann Laboratory, Purdue University, West Lafayette, USA.
Project: Crystallographic and cryo-electron microscopy studies of
West Nile Virus in complex with “fusion loop” antibodies.
Crystallographic and cryo-electron microscopy studies of
PBCV like viruses.
Research advisor: Michael G. Rossmann.
- 01/09/06 – 30/11/06 **Protein Crystallography.**
Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines
(LCCP), Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-CNRS-UJF,
Grenoble, France.
Project: Crystallographic studies of the NikA and NikR proteins
involved in nickel transport in *Escherichia coli*. When the NikA
structure hints at a possible new metallophore.
Research advisor: Juan C. Fontecilla Camps.
- 01/10/05 – 31/08/06 **ATER (teaching assistant)**
Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines
(LCCP), Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-CNRS-UJF,
Grenoble, France.
Project: Crystallographic studies of the NikA proteins involved in
nickel transport in *Escherichia coli*.
Research advisor: Juan C. Fontecilla Camps.
- 01/10/02 – 30/09/05 **Monitorat d'Initiation à l'Enseignement Supérieur (teaching)** in
general Chemistry, Organic Chemistry and Physical Chemistry.

University J. Fourier, Grenoble, France.

- 01/10/02 – 30/09/05 **Ph.D., Protein Crystallography** – Contrat de Formation par la Recherche (CEA)
Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines (LCCP), Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-CNRS-UJF, Grenoble, France.
Project: Crystallographic studies of the NikA and NikR proteins involved in nickel transport in *Escherichia coli*. When the NikA structure hints at a possible new metallophore.
Ph.D. supervisor: Juan C. Fontecilla Camps.
- 01/02/02 – 31/07/02 **Advanced Training in Protein Crystallography.**
Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines (LCCP), Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-CNRS-UJF, Grenoble, France.
Project: Crystallographic studies of the NikA and NikR proteins involved in nickel transport in *Escherichia coli*.
Research advisor: Juan C. Fontecilla Camps.
- 01/03/01 – 31/07/01 **Training in Protein Crystallography.**
Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines (LCCP), Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-CNRS-UJF, Grenoble, France.
Project: Crystallographic studies of the NikA and NikR proteins of *Escherichia coli* and of the Pyruvate Ferredoxine OxydoRéductase (PFOR) of *Desulfovibrio africanus*.
Research advisor: Juan C. Fontecilla Camps.
- 01/07/00 – 31/07/00 **Training in RNA Crystallography.**
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), CNRS-ULP, Strasbourg, France.
Project: Crystallographic studies of the Dimerization Initiation Site (DIS) of HIV.
Research advisor: Philippe Dumas.
- 01/06/00 – 30/06/00 **Training in Organic Chemistry.**
Institut de Botanique, ULP, Strasbourg, France.
Project: Synthesis of cholesta-4,7diène 3 β sulfate and cholesta-7éne 4 α sulfate-3 β ol.
Research advisor: Alain Rahier

PROFESSIONAL EXPERIENCES – SUPERVISORY ACTIVITY

- 02/18 – 08/18 **A. Lopes-Rodrigues** (100%), M2, Molecular Biology / Biochemistry / Electron Microscopy, Metalloprotein Unit, IBS, Grenoble, France.
- 01/18 – 02/18 **M. Viennois** (100%), L3, Molecular Biology / Biochemistry/ Chemistry, Metalloprotein Unit, IBS, Grenoble, France.

- 01/16 – 06/16 **M. Guillerminet** (100%), M2-recherche, Molecular Biology / Biochemistry / Structural biology, SBBMC, IBCP, Lyon, France.
- 11/14 – 04/15 **S. Thomas** (100%), M2-recherche, Molecular Biology / Biochemistry, SBBMC, IBCP, Lyon, France.
- 09/13 – 08/15 **A. Bazin** (50%), PhD student, Structural biochemistry, SBBMC, IBCP, Lyon, France.
Publication:
 - **Bazin A., Cherrier M.V., Gutsche I., Timmins J., Terradot L. *Nucleic Acid Res.* 2015.**
 - **Felicori L., Jameson K.H., Fogg M.J., Roblin P., Garcia T., Ventroux M., Cherrier M.V., Bazin A., Noirot P., Wilkinson A.J., Molina F., Terradot L., Noirot-Gros M.F. *Nucleic Acid Res.* 2015.**
- 09/12 – 08/13 **A. Chan** (25%), PhD student, X-ray crystallography, iRTSV-LCBM, Grenoble, France.
Publication:
 - **Cherrier M.V., Chan A., Darnault C., Reichmann D., Amara P., Ollagnier - de Choudens S., Fontecilla-Camps J.C. *JACS.* 2014.**
- 06/12 – 07/12 **S. Engilberge** (100%), L3, Molecular Biology / Biochemistry / Protein Crystallography, Metalloprotein Unit, IBS, Grenoble, France.
Publication:
 - **Cherrier M.V., Engilberge S., Amara P., Chevalley A., Salmain M., Fontecilla-Camps J.C. *EJIC.* 2013.**
- 09/09 – 08/11 **H. Lebrette** (25%), PhD student, X-ray crystallography, IBS, Grenoble, France.
Publication:
 - **Cavazza C., Martin L., Laffly E., Lebrette H., Cherrier M.V., Zeppieri L., Richaud P., Carrière M., Fontecilla-Camps J.C. *FEBS lett.* 2011.**
- 10/08 – 06/09 **L. Thurman** (100%), Undergraduate student, cryo-electron microscopy, Rossmann Lab, Purdue University, Indiana, USA.
- 07/08 – 06/09 **K. Mitra** (100%), Visitor Scientist, cryo-electron microscopy, Rossmann Lab, Purdue University, Indiana, USA.

PROFESSIONAL EXPERIENCES – PHD COMMITY

- 2018 **Yani Arhab**, ICBMS Lyon (UCBL).
- 2014 **Christine Hajjar**, IBS Grenoble (UGA).

PROFESSIONAL EXPERIENCES – TEACHING

- 09/16 – Present **Assistant Professor** – University Grenoble Alpes.

Biochemistry : 192h / year

- *Macromolécules biologiques, L1, UGA, TD, TP;*
- *Protéines, L1, UGA, Course;*
- *Biochimie - Enzymologie, L2, UGA, TP;*
- *Méthodes expérimentales en biologie, L3, UGA, TP;*
- *Macromolecular Engineering, L3, UGA, Cours, TD;*

09/13 – 08/16 **Assistant Professor** – University Claude Bernard Lyon.

Biochemistry : 192h / year

- *Lipides et Glucides, L1, UCBL, TD, TP;*
- *Protéines et Acides nucléiques, L1, UCBL, TD, TP;*
- *Acides nucléiques, L1, UCBL, Course;*
- *Biochimie expérimentale, L2, UCBL, TP;*
- *Projets tutoré (présentation), L2, UCBL, TD;*
- *Biochimie structurale et fonctionnelle, L3, UCBL, TD, Course.*

03/12 – 08/13 **Post-Doc, Protein Crystallography.**

- *12/12 : Biologie moléculaire et biochimie à haut débit, M2, UJF, Course+jury, 20h.*

09/09 – 06/11 **Post-Doc, Beamline scientist, Protein Crystallography.**

- *2009 – 2010 : Use of synchrotron radiation for structural biology, M2, Universitat Autònoma de Barcelona, course, 4h;*
- *2010 – 2011 : Use of synchrotron radiation for structural biology, M2, Universitat Autònoma de Barcelona, course, 4h.*

10/05 – 08/06 **ATER (teaching assistant)** in Physical Chemistry, Organic Chemistry, and Electro-Chemistry.

University J. Fourier, Grenoble, France (96 hours/year).

- *Chimie organique, L1, UJF, TP, 36h;*
- *Thermodynamique et cinétique, L2, UJF, TP, 36h;*
- *Physico-chimie des solutions aqueuses, L2, UJF, TP, 24h.*

10/02 – 09/05 **Monitorat d'Initiation à l'Enseignement Supérieur (teaching)** in general Chemistry, Organic Chemistry and Physic Chemistry.

University J. Fourier, Grenoble, France (64 hours/year).

- *Méthodologie, DEUG 1ère année, UJF, TP, 32h;*
- *Chimie, DEUG 1ère année, UJF, TP 32h;*
- *Structure de la matière, L1, UJF, TD et course-TD, 72h;*
- *Structure de la matière, L1, UJF, TP, 15h;*
- *Chimie organique, L1, UJF, TD, 3h;*
- *Chimie organique, L1, UJF, TP, 38h;*

PUBLICATIONS

20. **CHERRIER M.V., AMARA P., TALBI B., SALMAIN M., FONTECILLA-CAMPS J.C.** “Crystallographic evidence for unexpected selective tyrosine hydroxylations in an aerated achiral Ru–papain conjugate” **Metallomics** 2018 ; 10:1452-1459.

19. ARHAB Y., RAHIER R., NOIRIEL A., **CHERRIER M.V.**, ABOUSALHAM A. “Expression and purification of recombinant *Vigna unguiculata* phospholipase D in *Pichia pastoris* for structural studies” **Methods Mol Biol** 2018; 1835:191-201.
18. KOELBLEN T., BERGÉ C., **CHERRIER M.V.**, BRILLET K., JIMENEZ-SOTO L., BALLUT L., TAKAGI J., MONTSERRET R., ROUSSELLE P., FISCHER W., HAAS R., FRONZES R., TERRADOT L. “Molecular dissection of protein-protein interactions between integrin $\alpha 5\beta 1$ and *Helicobacter pylori* Cag Type IV secretion system proteins” **FEBS Lett.** 2017; 284(23):4143-4157.
17. HAJJAR C., **CHERRIER M.V.**, DIAS MIRANDELA G., PETIT-HARTLEIN I., STASIA M.J., FONTECILLA-CAMPS J.C., FIESCHI F., DUPUY J. “The NOX family of proteins is also present in bacteria” **mBio.** 2017; 8(6):1487-17.
16. **CHERRIER M.V.**, OLLAGNIER DE CHOUDENS S., FONTECILLA-CAMPS J.C. “Fe₄S₄-Quinolate Synthase (NadA)” **EIBC.** 2016 ; (*Book chapter*).
15. FELICORI L., JAMESON K.H., FOGG M.J., ROBLIN P., GARCIA T., VENTROUX M., **CHERRIER M.V.**, BAZIN A., NOIROT P., WILKINSON A.J., MOLINA F., TERRADOT L., NOIROT-GROS M.F. “Tetramerization and interdomain flexibility of the replication initiation controller YabA enables simultaneous binding to multiple partners” **Nucleic Acid Res.** 2015; 44(1):449-463.
14. BAZIN A., **CHERRIER M.V.**, GUTSCHE I., TIMMINS J., TERRADOT L. “Structure and primase-mediated activation of a bacterial dodecameric replicative helicase” **Nucleic Acid Res.** 2015; 43(17):8564-8576.
13. GENNARI M., BRAZZOLOTTO D., PÉCAUT J., **CHERRIER M.V.**, POLLOCK C.J., DEBEER S., RETEGAN M., PANTAZIS D.A., NEESE F., ROUZIÈRES M., CLÉRAC R., DUBOC C. “Dioxygen Activation and Catalytic Reduction to Hydrogen Peroxide by a Thiolate-Bridged Dimanganese(II) Complex with a Pendant Thiol” **JACS.** 2015;137(26):8644-8653.
12. **CHERRIER M.V.**, CHAN A., DARNAULT C., REICHMANN D., AMARA P., OLLAGNIER DE CHOUDENS S., FONTECILLA-CAMPS J.C. “The crystal structure of Fe₄S₄ quinolate synthase unravels a novel enzymatic dehydration mechanism that uses tyrosine and a hydro-lase-type triad. ” **JACS.** 2014;136 (14):5253–5256.
11. CHEVALLEY A., **CHERRIER M.V.**, FONTECILLA-CAMPS J.C., GHASEMI M., SALMAIN M. “Artificial metalloenzymes derived from bovine β -lactoglobulin for the asymmetric transfer hydrogenation of an aryl ketone – Synthesis, characterization and catalytic activity.” **Dalton trans.** 2014; 43:5482-5489.
10. **CHERRIER M.V.**, ENGILBERGE S., AMARA P., CHEVALLEY A., SALMAIN M., FONTECILLA CAMPS J.C. “Structural basis for enantioselectivity in the transfer hydrogenation of a ketone catalyzed by an artificial metalloenzyme.” **EJIC.** 2013; 21:3596-3600.
9. ESMIEU C., **CHERRIER M.V.**, AMARA P., GIRGENTI E., MARCHI-DELAPIERRE C., ODDON F., IANNELLO M., JORGE-ROBIN A., CAVAZZA C., MÉNAGE S. “An artificial

oxygenase built from scratch: the substrate-binding site revealed by a docking approach.” **Angewandte Chemie**. 2013; 52(14):3922-3925.

8. **CHERRIER M.V.**, GIRGENTIE., AMARA P., IANNELLO M., MARCHI-DELAPIERRE C., FONTECILLA-CAMPS J.C., MÉNAGE S., CAVAZZA C. “The structure of the periplasmic nickel-binding protein NikA provides insights for artificial metalloenzyme design.” **JBIC**. 2012; 17:817-829.

7. TRON C., **CHERRIER M.V.**, AMARA P., MARTIN L., FAUTH F., FRAGA E., CORREARD M., FONTECAVE M., NICOLET Y., FONTECILLA-CAMPS J.C. Further “Characterization of the [FeFe]-Hydrogenase Maturase HydG.” **EJIC**. 2011; 7:1121-1127.

5. CAVAZZA C., MARTIN L., LAFFLY E., LEBRETTE H., **CHERRIER M.V.**, ZEPPIERI L., RICHAUD P., CARRIÈRE M., FONTECILLA-CAMPS J.C. “Histidine 416 of the periplasmic binding protein NikA is essential for nickel uptake in *Escherichia coli*.” **FEBS lett**. 2011; 585(4):711-15.

5. CAVAZZA C., BOCHOT C., ROUSSELOT-PAILLEY P., CARPENTIER P., **CHERRIER M.V.**, MARTIN L., MARCHI-DELAPIERRE C., FONTECILLA-CAMPS J.C., MÉNAGE S. “Crystallographic snapshots of the reaction of aromatic C-H with O(2) catalysed by a protein-bound iron complex.” **Nat Chem**. 2010; 2(12):1069-76.

4. **CHERRIER, M.V.**, KAUFMANN, B., LOK, S., KOSTYUCHENKO, V., HOLDAWAY, H.A., CHIPMAN, P.R., KUHN, R.J., DIAMOND, M.S., FREMONT, D.H., ROSSMANN, M.G. “Structural basis for the preferential recognition of immature flaviviruses by a fusion-loop antibody.” **EMBO J**. 2009; 28:3269-3276.

3. **CHERRIER M.V.**, KOSTYUCHENKO V.A., XIAO C., BOWMAN V.D., BATTISTI A.J., YAN X., CHIPMAN P.R., BAKER T.S., VAN ETTEN J.L., ROSSMANN M.G. “An icosahedral algal virus has a complex unique vertex decorated by a spike.” **PNAS**. 2009; 106(27):11085-11089.

2. **CHERRIER, M.V.**, CAVAZZA, C., BOCHOT, C., LEMAIRE, D., FONTECILLA-CAMPS, J.C. “Structural characterization of a putative endogenous metal chelator in the periplasmic nickel transporter NikA.” **Biochemistry**. 2008; 47:9937-9943.

1. **CHERRIER, M.V.**, MARTIN, L., CAVAZZA, C., JACQUAMET, L., LEMAIRE, D., GAILLARD, J., FONTECILLA-CAMPS, J.C. “Crystallographic and spectroscopic evidence for high affinity binding of FeEDTA(H₂O)⁻ to the periplasmic nickel transporter NikA.” **JACS**. 2005; 127(28):10075-82.

PATENT

DUPUY, J., **CHERRIER, M.V.**, HAJJAR, C., FIESCHI, F. “Protéines NADPH Oxydases.” French patent n° PCT/FR2015/051101; International patent n° WO/2015/162383

CONGRESS, MEETINGS AND SEMINARS

(8 oral communications / 1 invited; 14 posters)

- 11/15 **10th *Helicobacter pylori* workshop**, Herrsching / Ammersee, Germany.
- Structural insights into CagA interactions with host-cell targets.
- 10/14 **GTBio 2014**, Grenoble, France.
Poster: Structure and activation mechanism of *Helicobacter pylori* primosome.
Poster: Functional and structural insights into the NADPH oxidase family: new kids on the block.
- 01/14 **GEFH**, Lille, France.
- 11/12 **SFBBM – SFB 2012**, Grenoble, France.
Poster: How to design an artificial metalloenzyme.
- 09/11 **ARTZYMES 2011**, Marseilles, France.
Poster: Design of artificial oxygenases for drug synthesis.
- 08/11 **International Conference on Biological Inorganic Chemistry 15 (ICBIC)**, Vancouver, Canada.
Poster: Changing the periplasmic nickel transport protein NikA into an artificial monooxygenase.
- 06/11 **IBS meeting**, Grenoble, France.
Oral presentation: Changing the periplasmic nickel transport protein NikA into an artificial monooxygenase.
- 06/09 **6th Research Network Meeting Pediatric Dengue Vaccine Initiative (PDVI) 2009**, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, USA.
Oral presentation: Fab-virus complex structure establishes biological role of partially immature flavivirions.
- 10/07 **Forum Jeunes Chercheurs 2007**, Ile des Embiez, France.
Oral presentation (invited lecturer) : Crystallographic studies of the protein NikA. When the structure hints at a possible nickelophore.
- 09/06 **2nd International IMBG Meeting**, Autrans, France.
Poster: Periplasmic nickel transport study in *Escherichia coli*: when the NikA protein structure hints at a possible metallophore.
Poster: Design of new hybrid bio-inorganic catalysts for asymmetric oxidation.
- 07/06 **AFC 2006**, Toulouse, France.
Oral presentation: Crystallographic studies of the protein NikA. When the structure hints at a possible metallophore.
Poster: Periplasmic nickel transport study in *Escherichia coli*: when the NikA protein structure hints at a possible metallophore.
- 07/06 **Eurobic 8**, Aveiro, Portugal.
Poster: Periplasmic nickel transport study in *Escherichia coli*: when the NikA protein structure hints at a possible metallophore.

- 06/06 **Gordon conference**, Environmental Bioinorganic chemistry, Andover (NH), United States.
Poster: Periplasmic nickel transport study in *Escherichia coli*: when the NikA protein structure hints at a possible metallophore.
- 04/06 **IMBG meeting**, Autrans, France.
Oral presentation: Crystallographic studies of the protein NikA. When the structure hints at a possible metallophore.
- 12/05 **ToxNuc-E meeting**, Paris, France.
Poster: Periplasmic nickel transport study in *Escherichia coli*: when the NikA protein structure hints at a possible metallophore.
- 11/05 **IBS meeting**, Grenoble, France.
Poster: Periplasmic nickel transport study in *Escherichia coli*: when the NikA protein structure hints at a possible metallophore.
- 06/05 **ToxNuc-E meeting**, Lyon, France.
Oral presentation: Crystallographic studies of nickel binding in NikA: to identification of a new metallophore.
- 05/05 **Seminar at the Institut de Biologie Structurale**, Grenoble, France.
Oral presentation: Crystallographic studies of nickel binding in NikA: to identification of a new metallophore.
- 11/04 **ToxNuc-E meeting**, Grenoble, France.
Oral presentation: Nickel transport and regulation in *Escherichia coli*. Crystallographic studies of NikA and NikR proteins.
- 06/04 **GTBIO 2004**, Lyon, France.
Poster: Crystallographic studies of MiaA and MiaB proteins, involved in the modification of RNA at adenine 37.
- 10/02 **GTBIO 2002**, Marseille, France.
Poster: Crystallographic studies of NikA protein involved in nickel transport in *Escherichia coli*.

FUNDINGS

- 2018 – 2021 **ANR BANDIT (researcher)**
D'une NOX bactérienne à la conception d'outil de criblage (487.289 euros)
- 2016 – 2017 **La Ligue Contre le Cancer (scientific partner)**
« Criblage de nouveaux inhibiteurs des phospholipases D comme cibles thérapeutiques des cancers » (30.000 euros).
- 2011 – 2014 **ANR ARTZYMES (post-doctoral fellow)**
Design of artificial metalloenzymes by functional mutation of proteins: access to new enantioselective catalysts (400.000 euros).
- 2014 **BQR accueil (coordinator)**

Université Claude Bernard Lyon (9.000 euros).

AWARDS

- 2007 **Dina-Surdin Ph.D. award 2007.**
Award from SFBBM (Biochemistry and Molecular Biology French Society) for high quality Ph.D. Forum des Jeunes Chercheurs 2007, Ile des Embiez, France.
- 2006 **Award for outstanding quality poster.**
Association Française de Cristallographie (AFC) 2006, Toulouse, France.
- 2006 **Award for outstanding quality poster.**
Eurobic 8, Aveiro, Portugal.
- 2004 **1st prize « company creation ».**
Doctoriales, Mèze, France.
- 2002 – 2005 **Contrat de Formation par la Recherche.**
C.E.A. fellowship, Grenoble, France.
- 2002 – 2005 **Monitorat d’initiation à l’enseignement supérieur.**
University J. Fourier fellowship, Grenoble, France.
- 2001 – 2002 **DEA fellowship.**
University L. Pasteur, Strasbourg, France.

MANIFESTATION

- 2004 Organization and management of Science festival (fête de la science) 2004 at Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-CNRS-UJF, Grenoble, France.

RESPONSABILITIES & ASSOCIATION

- Since 2018** In charge of the L1 UE: “Bio101 - Les constituants biomoléculaires de la cellule”. 21h CM; 27h TD; 9,5h TP / ≈ 650 students (UGA).
- Since 2018** In charge of the L1 UE: “Bio131 - The biomolecular constituents of the cell”. 21h CM; 27h TD; 9,5h TP / ≈ 60 students (UGA).
- Since 2017** Editor of the collection “Science of transition metals”, Edition UGA.
- Since 2017** In charge of the M2 UE: “HighThroughput Biology”. 36h CM / ≈ 20 students (UGA).
- Since 2007** Member of the SFBBM (Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire / French Society of Biochemistry and Molecular Biology).

2016 – 2019 Administration comity Member SFBBM.

ABILITIES

Biochemistry	Proteins and metalloproteins purification and characterization. RNA purification and characterization. MultiAngle Light Scattering (MALS) Surface Plasmon Resonance (SPR)
Microbiology	<i>Escherichia coli</i> culture in liquid, solid, rich and minimum media. Aerobic and anaerobic (glove box) bacteria culture. Seleno-methionine substituted protein expression.
Molecular Biology	Gene cloning / PCR.
Crystallography	Crystallogenesis / cryo-crystallography. Data collection on laboratory source and synchrotron. Data processing (Mosflm, XDS...) Structure determination and refinement (Phenix, CCP4 / CCP4i, CNS, AMoRe, Phaser...) Structure analysis (coot, pymol, Chimera...).
Electron Microscopy	Negative stained grids preparation and data collection. Data processing and structure determination (Robem, PFT, Eman, Spider...) Structure analysis (Chimera...) Fitting of crystallographic structures in electron microscopy reconstruction (EMFit...).
XANES / EXAFS	Sample preparation. Data collection on synchrotron. Data processing (Feff, SEDEM).
SAXS	Sample preparation. Data collection on synchrotron. Data processing.
Chemistry	Knowledge in Organic Synthesis and purification.
Computer	Web Master and Web designer of the Rossmann Lab web site (2007-2009). Linux administration (Cemaphore-Adhara Informatique course - 2004). Software: Word, Exel, Power-Point, Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, Flash Macromedia, Endnote... Programming language: Python, Perl
Language	French (mother language). English. Spanish (basic knowledge).

Références

1. Eitinger, T. & Mandrand-Berthelot, M. A. Nickel transport systems in microorganisms. *Arch. Microbiol.* **173**, 1–9 (2000).
2. Heddle, J., Scott, D. J., Unzai, S., Park, S.-Y. & Tame, J. R. H. Crystal structures of the liganded and unliganded nickel-binding protein NikA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 50322–50329 (2003).
3. Schreiter, E. R., Sintchak, M. D., Guo, Y., Chivers, P. T., Sauer, R. T. & Drennan, C. L. Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 794–799 (2003).
4. Cherrier, M. V., Martin, L., Cavazza, C., Jacquamet, L., Lemaire, D., Gaillard, J. & Fontecilla-Camps, J. C. Crystallographic and spectroscopic evidence for high affinity binding of FeEDTA(H₂O)(-)⁻ to the periplasmic nickel transporter NikA. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10075–10082 (2005).
5. Cherrier, M. V., Cavazza, C., Bochet, C., Lemaire, D. & Fontecilla-Camps, J. C. Structural characterization of a putative endogenous metal chelator in the periplasmic nickel transporter NikA. *Biochemistry* **47**, 9937–9943 (2008).
6. Schalk, I. J., Hannauer, M. & Braud, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**, 2844–2854 (2011).
7. Stoof, J., Kuipers, E. J., Klaver, G. & van Vliet, A. H. M. An ABC transporter and a TonB ortholog contribute to *Helicobacter mustelae* nickel and cobalt acquisition. *Infect. Immun.* **78**, 4261–4267 (2010).
8. Schauer, K., Rodionov, D. A. & de Reuse, H. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the ‘tip of the iceberg’? *Trends Biochem. Sci.* **33**, 330–338 (2008).
9. Xiao, C., Kuznetsov, Y. G., Sun, S., Hafenstein, S. L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Suzan-Monti, M., Raoult, D., McPherson, A. & Rossmann, M. G. Structural studies of the giant mimivirus. *PLoS Biol.* **7**, e92 (2009).
10. Cherrier, M. V., Kostyuchenko, V. A., Xiao, C., Bowman, V. D., Battisti, A. J., Yan, X., Chipman, P. R., Baker, T. S., Van Etten, J. L. & Rossmann, M. G. An icosahedral algal virus has a complex unique vertex decorated by a spike. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11085–11089 (2009).
11. Johnson, J. E. & Chiu, W. DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 237–243 (2007).
12. Leiman, P. G., Chipman, P. R., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V. & Rossmann, M. G. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell* **118**, 419–429 (2004).
13. Zhang, X., Xiang, Y., Dunigan, D. D., Klose, T., Chipman, P. R., Van Etten, J. L. & Rossmann, M. G. Three-dimensional structure and function of the *Paramecium bursaria chlorella virus* capsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14837–14842 (2011).
14. Wulfmeyer, T., Polzer, C., Hiepler, G., Hamacher, K., Shoeman, R., Dunigan, D. D., Van Etten, J. L., Lolicato, M., Moroni, A., Thiel, G. & Meckel, T. Structural organization of DNA in chlorella viruses. *PLoS One* **7**, e30133 (2012).
15. Plevka, P., Battisti, A. J., Junjhon, J., Winkler, D. C., Holdaway, H. A., Keelapang, P., Sittisombut, N., Kuhn, R. J., Steven, A. C. & Rossmann, M. G. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO Rep.* **12**, 602–606 (2011).
16. Cherrier, M. V., Kaufmann, B., Nybakken, G. E., Lok, S.-M., Warren, J. T., Chen, B. R., Nelson, C. A., Kostyuchenko, V. A., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Diamond, M. S., Rossmann, M. G. & Fremont, D. H. Structural basis for the preferential recognition of immature flaviviruses by a fusion-loop antibody. *Embo J.* **28**, 3269–3276 (2009).
17. de Alwis, R., Beltramello, M., Messer, W. B., Sukupolvi-Petty, S., Wahala, W. M. P. B., Kraus, A., Olivarez, N. P., Pham, Q., Brien, J. D., Brian, J., Tsai, W.-Y., Wang, W.-K., Halstead, S., Kliks, S., Diamond, M. S., Baric, R., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. & de Silva, A. M. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e1188 (2011).
18. Rothman, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 532–543 (2011).
19. Vogt, M. R., Dowd, K. A., Engle, M., Tesh, R. B., Johnson, S., Pierson, T. C. & Diamond, M. S. Poorly neutralizing cross-reactive antibodies against the fusion loop of West Nile virus envelope protein protect in vivo via Fcγ receptor and complement-dependent effector mechanisms. *J. Virol.* **85**, 11567–11580 (2011).
20. Mukherjee, S., Lin, T.-Y., Dowd, K. A., Manhart, C. J. & Pierson, T. C. The infectivity of prM-containing partially mature West Nile virus does not require the activity of cellular furin-like proteases. *J. Virol.* **85**, 12067–12072 (2011).
21. Hughes, H. R., Crill, W. D. & Chang, G.-J. J. Manipulation of immunodominant dengue virus E protein epitopes reduces potential antibody-dependent enhancement. *Virol. J.* **9**, 115 (2012).
22. Heinz, F. X. & Stiasny, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* **30**, 4301–4306 (2012).

23. Posewitz, M. C., King, P. W., Smolinski, S. L., Zhang, L., Seibert, M. & Ghirardi, M. L. Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* **279**, 25711–25720 (2004).
24. Driesener, R. C., Challand, M. R., McGlynn, S. E., Shepard, E. M., Boyd, E. S., Broderick, J. B., Peters, J. W. & Roach, P. L. [FeFe]-hydrogenase cyanide ligands derived from S-adenosylmethionine-dependent cleavage of tyrosine. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **49**, 1687–1690 (2010).
25. Shepard, E. M., Duffus, B. R., George, S. J., McGlynn, S. E., Challand, M. R., Swanson, K. D., Roach, P. L., Cramer, S. P., Peters, J. W. & Broderick, J. B. [FeFe]-hydrogenase maturation: HydG-catalyzed synthesis of carbon monoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9247–9249 (2010).
26. Tron, C., Cherrier, M. V., Amara, P., Martin, L., Fauth, F., Fraga, E., Correard, M., Fontecave, M., Nicolet, Y. & Fontecilla-Camps, J. C. Further Characterization of the [FeFe]-Hydrogenase Maturase HydG. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1121–1127 (2011).
27. Sakuraba, H., Tsuge, H., Yoneda, K., Katunuma, N. & Ohshima, T. Crystal structure of the NAD biosynthetic enzyme quinolinate synthase. *J. Biol. Chem.* **280**, 26645–26648 (2005).
28. Cherrier, M. V., Chan, A., Darnault, C., Reichmann, D., Amara, P., de Choudens, S. O. & Fontecilla-Camps, J. C. The Crystal Structure of Fe₄S₄ Quinolate Synthase Unravels an Enzymatic Dehydration Mechanism That Uses Tyrosine and a Hydrolase-Type Triad. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5253–5256 (2014).
29. Volbeda, A., Darnault, C., Renoux, O., Reichmann, D., Amara, P., Ollagnier De Choudens, S. & Fontecilla-Camps, J.-C. Crystal Structures of Quinolate Synthase in Complex with a Substrate Analogue, the Condensation Intermediate, and Substrate-Derived Product. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 11802–11809 (2016).
30. Cherrier, M. V., Ollagnier De Choudens, S. & Fontecilla-Camps, J.-C. Fe₄S₄-Quinolate Synthase (NadA). in *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.* (2016).
31. Cavazza, C., Bochet, C., Rousselot-Pailley, P., Carpentier, P., Cherrier, M. V., Martin, L., Marchi-Delapierre, C., Fontecilla-Camps, J. C. & Menage, S. Crystallographic snapshots of the reaction of aromatic C-H with O₂ catalysed by a protein-bound iron complex. *Nat. Chem.* **2**, 1069–1076 (2010).
32. Cherrier, M. V., Girgenti, E., Amara, P., Iannello, M., Marchi-Delapierre, C., Fontecilla-Camps, J. C., Menage, S. & Cavazza, C. The structure of the periplasmic nickel-binding protein NikA provides insights for artificial metalloenzyme design. *J. Biol. Inorg. Chem.* **17**, 817–829 (2012).
33. Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S. & Coleman, R. G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 1757–1768 (2012).
34. Esmieu, C., Cherrier, M. V., Amara, P., Girgenti, E., Marchi-Delapierre, C., Oddon, F., Iannello, M., Jorge-Robin, A., Cavazza, C. & Menage, S. An Artificial Oxygenase Built from Scratch: Substrate Binding Site Identified Using a Docking Approach. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **52**, 3922–3925 (2013).
35. Cherrier, M. V., Amara, P., Talbi, B., Salmain, M. & Fontecilla-Camps, J. C. Crystallographic evidence for unexpected selective tyrosine hydroxylations in an aerated achiral Ru-papain conjugate. *Met. Integr. Biometal Sci.* **10**, 1452–1459 (2018).
36. Chevalley, A. & Salmain, M. Enantioselective transfer hydrogenation of ketone catalysed by artificial metalloenzymes derived from bovine β -lactoglobulin. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **48**, 11984–11986 (2012).
37. Cherrier, M. V., Engilberge, S., Amara, P., Chevalley, A., Salmain, M. & Fontecilla-Camps, J. C. Structural Basis for Enantioselectivity in the Transfer Hydrogenation of a Ketone Catalyzed by an Artificial Metalloenzyme. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 3596–3600 (2013).
38. Chevalley, A., Cherrier, M. V., Fontecilla-Camps, J. C., Ghasemi, M. & Salmain, M. Artificial metalloenzymes derived from bovine β -lactoglobulin for the asymmetric transfer hydrogenation of an aryl ketone – synthesis, characterization and catalytic activity. *Dalton Trans.* **43**, 5482–5489 (2014).
39. Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. & Lambeth, J. D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**, 79–82 (1999).
40. Vignais, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **59**, 1428–1459 (2002).
41. Hajjar, C., Cherrier, M. V., Mirandela, G. D., Petit-Hartlein, I., Stasia, M. J., Fontecilla-Camps, J. C., Fieschi, F. & Dupuy, J. The NOX Family of Proteins Is Also Present in Bacteria. *mBio* **8**, e01487-17 (2017).
42. Dupuy, J., Hajjar, C., Cherrier, M. V. & Fieschi, F. NADPH OXIDASE PROTEINS. (2015). French patent n° PCT/FR2015/051101; International patent n° WO/2015/162383.
43. Mobley, H. L. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10 Suppl 1**, 57–64 (1996).
44. Cover, T. L. & Blaser, M. J. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv. Intern. Med.* **41**, 85–117 (1996).
45. Suerbaum, S. & Michetti, P. *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1175–1186 (2002).
46. Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson,

- S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M. & Venter, J. C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539–547 (1997).
47. Atherton, J. C. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 63–96 (2006).
 48. Bazin, A., Cherrier, M. V., Gutsche, I., Timmins, J. & Terradot, L. Structure and primase-mediated activation of a bacterial dodecameric replicative helicase. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8564–8576 (2015).
 49. Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. & Covacci, A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14648–14653 (1996).
 50. Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A. & Berg, D. E. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **28**, 37–53 (1998).
 51. Hatakeyama, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 688–694 (2004).
 52. Kutter, S., Buhrdorf, R., Haas, J., Schneider-Brachert, W., Haas, R. & Fischer, W. Protein Subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System Revealed by Localization and Interaction Studies. *J. Bacteriol.* **190**, 2161–2171 (2008).
 53. Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., König, W. & Backert, S. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**, 862–866 (2007).
 54. Koelblen, T., Bergé, C., Cherrier, M. V., Brillet, K., Jimenez-Soto, L., Ballut, L., Takagi, J., Montserret, R., Rousselle, P., Fischer, W., Haas, R., Fronzes, R. & Terradot, L. Molecular dissection of protein–protein interactions between integrin $\alpha 5\beta 1$ and the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system. *FEBS J.* **284**, 4143–4157 (2017).
 55. Shaffer, C. L., Gaddy, J. A., Loh, J. T., Johnson, E. M., Hill, S., Hennig, E. E., McClain, M. S., McDonald, W. H. & Cover, T. L. *Helicobacter pylori* Exploits a Unique Repertoire of Type IV Secretion System Components for Pilus Assembly at the Bacteria-Host Cell Interface. *PLOS Pathog.* **7**, e1002237 (2011).
 56. Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K. & Fujimitsu, K. Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 163–170 (2010).
 57. Noirot-Gros, M.-F., Dervyn, E., Wu, L. J., Mervelet, P., Errington, J., Ehrlich, S. D. & Noirot, P. An expanded view of bacterial DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 8342–8347 (2002).
 58. Noirot-Gros, M.-F., Velten, M., Yoshimura, M., McGovern, S., Morimoto, T., Ehrlich, S. D., Ogasawara, N., Polard, P. & Noirot, P. Functional dissection of YabA, a negative regulator of DNA replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2368–2373 (2006).
 59. Felicori, L., Jameson, K. H., Roblin, P., Fogg, M. J., Garcia-Garcia, T., Ventroux, M., Cherrier, M. V., Bazin, A., Noirot, P., Wilkinson, A. J., Molina, F., Terradot, L. & Noirot-Gros, M.-F. Tetramerization and interdomain flexibility of the replication initiation controller YabA enables simultaneous binding to multiple partners. *Nucleic Acids Res.* **44**, 449–463 (2016).
 60. Hayashi, M., Ogura, Y., Harry, E. J., Ogasawara, N. & Moriya, S. *Bacillus subtilis* YabA is involved in determining the timing and synchrony of replication initiation. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 73–79 (2005).
 61. Jenkins, G. M. & Frohman, M. A. Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **62**, 2305–2316 (2005).
 62. Selvy, P. E., Lavieri, R. R., Lindsley, C. W. & Brown, H. A. Phospholipase D: Enzymology, Functionality, and Chemical Modulation. *Chem. Rev.* **111**, 6064–6119 (2011).
 63. Leiros, I., Secundo, F., Zambonelli, C., Servi, S. & Hough, E. The first crystal structure of a phospholipase D. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **8**, 655–667 (2000).
 64. Arhab, Y., Rahier, R., Noiriél, A., Cherrier, M. V. & Abousalham, A. Expression and Purification of Recombinant *Vigna unguiculata* Phospholipase D in *Pichia pastoris* for Structural Studies. in *Lipases Phospholipases Methods Protoc.* (ed. Sandoval, G.) 191–201 (Springer New York, 2018).
 65. Abergel, C., Abousalham, A., Chenivesse, S., Rivière, M., Moustacas-Gardies, A. M. & Verger, R. Crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 320–322 (2001).
 66. Rodríguez, D. D., Grosse, C., Himmel, S., González, C., de Ilarduya, I. M., Becker, S., Sheldrick, G. M. & Usón, I. Crystallographic *ab initio* protein structure solution below atomic resolution. *Nat. Methods* **6**, 651–653 (2009).
 67. Stumpe, S., König, S. & Ulbrich-Hofmann, R. Insights into the structure of plant α -type phospholipase D. *FEBS J.* **274**, 2630–2640 (2007).

68. Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M. & Wang, X. Distinct Ca²⁺ Binding Properties of Novel C2 Domains of Plant Phospholipase Da and β . *J. Biol. Chem.* **275**, 19700–19706 (2000).
69. Gaston, M. A., Zhang, L., Green-Church, K. B. & Krzycki, J. A. The complete biosynthesis of the genetically encoded amino acid pyrrolysine from lysine. *Nature* **471**, 647–650 (2011).
70. Qwitterer, F., List, A., Eisenreich, W., Bacher, A. & Groll, M. Crystal Structure of Methylornithine Synthase (PylB): Insights into the Pyrrolysine Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 1339–1342 (2012).
71. Brenner, S. & Horne, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 103–110 (1959).
72. Adrian, M., Dubochet, J., Fuller, S. D. & Harris, J. R. Cryo-negative staining. *Micron Oxf. Engl.* **1993** **29**, 145–160 (1998).
73. Nogales, E. The development of cryo-EM into a mainstream structural biology technique. *Nat. Methods* **13**, 24–27 (2015).
74. Fernandez-Leiro, R. & Scheres, S. H. W. Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature* **537**, 339–346 (2016).
75. Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G. & North, A. C. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* **185**, 416–422 (1960).
76. Callaway, E. The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology. *Nat. News* **525**, 172 (2015).
77. Christopher Booth & Paul Mooner. Applications of electron-counting direct-detection cameras in high-resolution cryo-electron microscopy. *Microsc. Anal.* **27**, 13–21 (2013).
78. Li, X., Mooney, P., Zheng, S., Booth, C. R., Braunfeld, M. B., Gubbens, S., Agard, D. A. & Cheng, Y. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat. Methods* **10**, 584–590 (2013).
79. McMullan, G., Faruqi, A. R., Clare, D. & Henderson, R. Comparison of optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. *Ultramicroscopy* **147**, 156–163 (2014).
80. Zernike, F. How I Discovered Phase Contrast. *Science* **121**, 345–349 (1955).
81. Danev, R. & Baumeister, W. Expanding the boundaries of cryo-EM with phase plates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **46**, 87–94 (2017).
82. von Loeffelholz, O., Papai, G., Danev, R., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K., Hazemann, I., Ménétret, J.-F. & Klaholz, B. P. Volta phase plate data collection facilitates image processing and cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* **202**, 191–199 (2018).
83. Ludtke, S. J., Baldwin, P. R. & Chiu, W. EMAN: Semiautomated Software for High-Resolution Single-Particle Reconstructions. *J. Struct. Biol.* **128**, 82–97 (1999).
84. Bell, J. M., Chen, M., Baldwin, P. R. & Ludtke, S. J. High resolution single particle refinement in EMAN2.1. *Methods San Diego Calif* **100**, 25–34 (2016).
85. Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. & Leith, A. SPIDER and WEB: Processing and Visualization of Images in 3D Electron Microscopy and Related Fields. *J. Struct. Biol.* **116**, 190–199 (1996).
86. van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E. V., Schmidt, R. & Schatz, M. A New Generation of the IMAGIC Image Processing System. *J. Struct. Biol.* **116**, 17–24 (1996).
87. Scheres, S. H. W. A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination. *J. Mol. Biol.* **415**, 406–418 (2012).
88. Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., Dormitzer, P. R., Bellamy, R., Harrison, S. C. & Grigorieff, N. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1867–1872 (2008).
89. Jiang, W., Baker, M. L., Jakana, J., Weigele, P. R., King, J. & Chiu, W. Backbone structure of the infectious *epsilon15* virus capsid revealed by electron cryomicroscopy. *Nature* **451**, 1130–1134 (2008).
90. Zhang, X., Jin, L., Fang, Q., Hui, W. H. & Zhou, Z. H. 3.3 Å cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry. *Cell* **141**, 472–482 (2010).
91. Lu, P., Bai, X., Ma, D., Xie, T., Yan, C., Sun, L., Yang, G., Zhao, Y., Zhou, R., Scheres, S. H. W. & Shi, Y. Three-dimensional structure of human γ -secretase. *Nature* **512**, 166–170 (2014).
92. Yan, Z., Bai, X., Yan, C., Wu, J., Li, Z., Xie, T., Peng, W., Yin, C., Li, X., Scheres, S. H. W., Shi, Y. & Yan, N. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature* **517**, 50–55 (2015).
93. Henderson, R. The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Q. Rev. Biophys.* **28**, 171–193 (1995).
94. Orlov, I., Rochel, N., Moras, D. & Klaholz, B. P. Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *EMBO J.* **31**, 291–300 (2012).

95. Khoshouei, M., Radjainia, M., Baumeister, W. & Danev, R. Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate. *Nat. Commun.* **8**, ncomms16099 (2017).
96. Wang, L. & Sigworth, F. J. Cryo-EM and single particles. *Physiol. Bethesda Md* **21**, 13–18 (2006).
97. Binshtein, E. & Ohi, M. D. Cryo-Electron Microscopy and the Amazing Race to Atomic Resolution. *Biochemistry* **54**, 3133–3141 (2015).
98. Glaeser, R. M. How good can cryo-EM become? *Nat. Methods* **13**, 28–32 (2015).
99. Shoemaker, S. C. & Ando, N. X-rays in the Cryo-Electron Microscopy Era: Structural Biology’s Dynamic Future. *Biochemistry* **57**, 277–285 (2018).
100. Wlodawer, A., Li, M. & Dauter, Z. High-Resolution Cryo-EM Maps and Models: A Crystallographer’s Perspective. *Structure* **25**, 1589–1597.e1 (2017).
101. Wang, J. & Moore, P. B. On the interpretation of electron microscopic maps of biological macromolecules. *Protein Sci.* **26**, 122–129 (2017).
102. Rossmann, M. G., Morais, M. C., Leiman, P. G. & Zhang, W. Combining x-ray crystallography and electron microscopy. *Structure* **13**, 355–362 (2005).
103. Rossmann, M. G. Fitting atomic models into electron-microscopy maps. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**, 1341–1349 (2000).
104. Dupont, C. L., Yang, S., Palenik, B. & Bourne, P. E. Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17822–17827 (2006).
105. Beinert, H., Holm, R. H. & Münck, E. Iron-sulfur clusters: nature’s modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653–659 (1997).
106. Waldron, K. J. & Robinson, N. J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 25–35 (2009).
107. Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H. & Stout, C. D. Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound. *J. Mol. Biol.* **237**, 437–451 (1994).
108. Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., DeMichele, G., Filla, A., DeFrutos, R., Palau, F., Patel, P. I., DiDonato, S., Mandel, J. L., Coccozza, S., Koenig, M. & Pandolfo, M. Friedreich’s ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423–1427 (1996).
109. Walden, W. E., Selezneva, A. I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., Theil, E. C. & Volz, K. Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* **314**, 1903–1908 (2006).
110. Moore, L. J., Mettert, E. L. & Kiley, P. J. Regulation of FNR dimerization by subunit charge repulsion. *J. Biol. Chem.* **281**, 33268–33275 (2006).
111. Akiba, T., Toyoshima, C., Matsunaga, T., Kawamoto, M., Kubota, T., Fukuyama, K., Namba, K. & Matsubara, H. Three-dimensional structure of bovine cytochrome bc₁ complex by electron cryomicroscopy and helical image reconstruction. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 553–561 (1996).
112. De Feo, C. J., Aller, S. G., Siluvai, G. S., Blackburn, N. J. & Unger, V. M. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4237–4242 (2009).
113. Letts, J. A., Fiedorczuk, K. & Sazanov, L. A. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* **537**, 644–648 (2016).
114. Wei, X., Su, X., Cao, P., Liu, X., Chang, W., Li, M., Zhang, X. & Liu, Z. Structure of spinach photosystem II–LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature* **534**, 69–74 (2016).
115. Allegretti, M., Mills, D. J., McMullan, G., Kühlbrandt, W. & Vonck, J. Atomic model of the F420-reducing [NiFe] hydrogenase by electron cryo-microscopy using a direct electron detector. *eLife* **3**, e01963 (2014).
116. Chabrière, E., Vernède, X., Guigliarelli, B., Charon, M. H., Hatchikian, E. C. & Fontecilla-Camps, J. C. Crystal structure of the free radical intermediate of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Science* **294**, 2559–2563 (2001).
117. Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernède, X., Lindahl, P. A. & Fontecilla-Camps, J. C. Ni-Zn-[Fe₄-S₄] and Ni-Ni-[Fe₄-S₄] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 271–279 (2003).
118. Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E. & Fontecilla-Camps, J. C. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **7**, 13–23 (1999).
119. Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580–587 (1995).
120. Rohac, R., Amara, P., Benjdia, A., Martin, L., Ruffié, P., Favier, A., Berteau, O., Mouesca, J.-M., Fontecilla-Camps, J. C. & Nicolet, Y. Carbon-sulfur bond-forming reaction catalysed by the radical SAM enzyme HydE. *Nat. Chem.* **8**, 491–500 (2016).

121. Sicoli, G., Mouesca, J.-M., Zeppieri, L., Amara, P., Martin, L., Barra, A.-L., Fontecilla-Camps, J. C., Gambarelli, S. & Nicolet, Y. Fine-tuning of a radical-based reaction by radical S-adenosyl-L-methionine tryptophan lyase. *Science* **351**, 1320–1323 (2016).
122. Pagnier, A., Martin, L., Zeppieri, L., Nicolet, Y. & Fontecilla-Camps, J. C. CO and CN- syntheses by [FeFe]-hydrogenase maturase HydG are catalytically differentiated events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 104–109 (2016).
123. Knoop, K., Schoehn, G. & Schaffitzel, C. Cryo-electron microscopy of ribosomal complexes in cotranslational folding, targeting, and translocation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**, 429–441 (2012).
124. El Bakkouri, M., Gutsche, I., Kanjee, U., Zhao, B., Yu, M., Goret, G., Schoehn, G., Burmeister, W. P. & Houry, W. A. Structure of RavA MoxR AAA plus protein reveals the design principles of a molecular cage modulating the inducible lysine decarboxylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22499–22504 (2010).
125. Moriscot, C., Gribaldo, S., Jault, J.-M., Krupovic, M., Arnaud, J., Jamin, M., Schoehn, G., Forterre, P., Weissenhorn, W. & Renesto, P. Crenarchaeal CdvA forms double-helical filaments containing DNA and interacts with ESCRT-III-like CdvB. *PLoS One* **6**, e21921 (2011).
126. Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H. G. & Weissenhorn, W. Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* **321**, 1354–1357 (2008).
127. Schoehn, G., El Bakkouri, M., Fabry, C. M. S., Billet, O., Estrozi, L. F., Le, L., Curiel, D. T., Kajava, A. V., Ruigrok, R. W. H. & Kremer, E. J. Three-dimensional structure of canine adenovirus serotype 2 capsid. *J. Virol.* **82**, 3192–3203 (2008).
128. Chevalley, A., Cherrier, M. V., Fontecilla-Camps, J. C., Ghasemia, M. & Salmain, M. Artificial metalloenzymes derived from bovine beta-lactoglobulin for the asymmetric transfer hydrogenation of an aryl ketone - synthesis, characterization and catalytic activity. *Dalton Trans.* **43**, 5482–5489 (2014).
129. Sharma, A. K., Pallesen, L. J., Spang, R. J. & Walden, W. E. Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *J. Biol. Chem.* **285**, 26745–26751 (2010).
130. Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janáky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Rotte, C. & Lill, R. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J.* **24**, 589–598 (2005).
131. Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C. J., Anger, A. M., Armache, J.-P., Sieber, H., Ungewickell, C., Berninghausen, O., Daberkow, I., Karcher, A., Thomm, M., Hopfner, K.-P., Green, R. & Beckmann, R. Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* **482**, 501–506 (2012).
132. Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W. J., Stark, M. J. R. & White, M. F. The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol. Cell* **23**, 801–808 (2006).
133. Netz, D. J. A., Stith, C. M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Genau, H. M., Stodola, J. L., Lill, R., Burgers, P. M. J. & Pierik, A. J. Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 125–132 (2011).
134. Goldberg, A. V., Molik, S., Tsaousis, A. D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C. P., Hirt, R. P., Lill, R. & Embley, T. M. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* **452**, 624–628 (2008).
135. Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Webert, H., Wilbrecht, C. & Muehlenhoff, U. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1823**, 1491–1508 (2012).
136. Ciofi-Baffoni, S., Nasta, V. & Banci, L. Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins. *Metallomics* **10**, 49–72 (2018).
137. Kaiser, J. T., Clausen, T., Bourenkow, G. P., Bartunik, H. D., Steinbacher, S. & Huber, R. Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **297**, 451–464 (2000).
138. Marinoni, E. N., de Oliveira, J. S., Nicolet, Y., Raulfs, E. C., Amara, P., Dean, D. R. & Fontecilla-Camps, J. C. (IscS-IscU)₂ complex structures provide insights into Fe₂S₂ biogenesis and transfer. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **51**, 5439–5442 (2012).
139. Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Müller, H., Lohaus, C., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Meisinger, C., Mühlenhoff, U., Lill, R. & Pfanner, N. Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J.* **25**, 184–195 (2006).
140. Saha, P. P., Srivastava, S., Kumar S K, P., Sinha, D. & D’Silva, P. Mapping Key Residues of ISD11 Critical for NFS1-ISD11 Subcomplex Stability: Implications in the Development of Mitochondrial Disorder, COXPD19. *J. Biol. Chem.* **290**, 25876–25890 (2015).

141. Friemel, M., Marelja, Z., Li, K. & Leimkühler, S. The N-Terminus of Iron-Sulfur Cluster Assembly Factor ISD11 Is Crucial for Subcellular Targeting and Interaction with L-Cysteine Desulfurase NFS1. *Biochemistry* **56**, 1797–1808 (2017).
142. Van Vranken, J. G., Jeong, M.-Y., Wei, P., Chen, Y.-C., Gygi, S. P., Winge, D. R. & Rutter, J. The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *eLife* **5**, (2016).
143. Cory, S. A., Van Vranken, J. G., Brignole, E. J., Patra, S., Winge, D. R., Drennan, C. L., Rutter, J. & Barondeau, D. P. Structure of human Fe–S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP–ISD11 interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E5325–E5334 (2017).
144. Stemmler, T. L., Lesuisse, E., Pain, D. & Dancis, A. Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *J. Biol. Chem.* **285**, 26737–26743 (2010).
145. Pastore, A. & Puccio, H. Frataxin: a protein in search of a function. *J. Neurochem.* **126**, 43–52 (2013).
146. Uhrigshardt, H., Singh, A., Kovtunovych, G., Ghosh, M. & Rouault, T. A. Characterization of the human HSC20, an unusual DnaJ type III protein, involved in iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3816–3834 (2010).
147. Cai, K., Frederick, R. O., Kim, J. H., Reinen, N. M., Tonelli, M. & Markley, J. L. Human mitochondrial chaperone (mtHSP70) and cysteine desulfurase (NFS1) bind preferentially to the disordered conformation, whereas co-chaperone (HSC20) binds to the structured conformation of the iron-sulfur cluster scaffold protein (ISCU). *J. Biol. Chem.* **288**, 28755–28770 (2013).
148. Schilke, B., Williams, B., Knieszner, H., Pukszta, S., D’Silva, P., Craig, E. A. & Marszalek, J. Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. *Curr. Biol. CB* **16**, 1660–1665 (2006).
149. Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U. & Bukau, B. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* **12**, 4137–4144 (1993).
150. Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D. & Vickery, L. E. Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones. *Biochemistry* **47**, 12795–12801 (2008).
151. Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S. & Iolascon, A. The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* **110**, 1353–1358 (2007).
152. Brancaccio, D., Gallo, A., Mikolajczyk, M., Zovo, K., Palumaa, P., Novellino, E., Piccioli, M., Ciofi-Baffoni, S. & Banci, L. Formation of [4Fe-4S] clusters in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 16240–16250 (2014).
153. Brancaccio, D., Gallo, A., Piccioli, M., Novellino, E., Ciofi-Baffoni, S. & Banci, L. [4Fe-4S] Cluster Assembly in Mitochondria and Its Impairment by Copper. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 719–730 (2017).
154. Cameron, J. M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T. A., Tong, W.-H., Ogilvie, I., Shoubridge, E. A. & Robinson, B. H. Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 486–495 (2011).
155. Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M. A., Arranz, J. A., Del Toro, M., Labayru, M. T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Ugarte, M., Gutierrez-Solana, L. G., Campistol, J., Garcia-Cazorla, A., Vaquerizo, J., Riudor, E., Briones, P., Elpeleg, O., Ribes, A. & Lill, R. A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 656–667 (2011).
156. Uzarska, M. A., Nasta, V., Weiler, B. D., Spantgar, F., Ciofi-Baffoni, S., Saviello, M. R., Gonnelli, L., Mühlhoff, U., Banci, L. & Lill, R. Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. *eLife* **5**, (2016).
157. Sheftel, A. D., Stehling, O., Pierik, A. J., Netz, D. J. A., Kerscher, S., Elsässer, H.-P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U. & Lill, R. Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 6059–6073 (2009).
158. Beilschmidt, L. K. & Puccio, H. Mammalian Fe–S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie* **100**, 48–60 (2014).
159. Stehling, O., Wilbrecht, C. & Lill, R. Mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* **100**, 61–77 (2014).
160. Mochel, F., Knight, M. A., Tong, W.-H., Hernandez, D., Ayyad, K., Taivassalo, T., Andersen, P. M., Singleton, A., Rouault, T. A., Fischbeck, K. H. & Haller, R. G. Splice Mutation in the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein ISCU Causes Myopathy with Exercise Intolerance. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 652–660 (2008).
161. Puccio, H. & Koenig, M. Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 272–277 (2002).
162. Tsou, A. Y., Paulsen, E. K., Lagedrost, S. J., Perlman, S. L., Mathews, K. D., Wilmot, G. R., Ravina, B., Koeppe, A. H. & Lynch, D. R. Mortality in Friedreich Ataxia. *J. Neurol. Sci.* **307**, 46–49 (2011).

163. Sanchez-Casis, G., Cote, M. & Barbeau, A. Pathology of the heart in Friedreich's ataxia: review of the literature and report of one case. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* **3**, 349–354 (1976).
164. Boniecki, M. T., Freibert, S. A., Mühlhoff, U., Lill, R. & Cygler, M. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat. Commun.* **8**, 1287 (2017).
165. Cho, S. J., Lee, M. G., Yang, J. K., Lee, J. Y., Song, H. K. & Suh, S. W. Crystal structure of *Escherichia coli* CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8932–8937 (2000).
166. Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y. I., Ristow, M. & Shoelson, S. E. Crystal structure of human frataxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 30753–30756 (2000).
167. Musco, G., Stier, G., Kolmerer, B., Adinolfi, S., Martin, S., Frenkiel, T., Gibson, T. & Pastore, A. Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin. *Struct. Lond. Engl.* **1993**, 695–707 (2000).
168. Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.-F., Matte, A., Armengod, M. E. & Cygler, M. Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* **8**, e1000354 (2010).
169. Prischi, F., Konarev, P. V., Iannuzzi, C., Pastore, C., Adinolfi, S., Martin, S. R., Svergun, D. I. & Pastore, A. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat. Commun.* **1**, 95 (2010).
170. Burén, S. & Rubio, L. M. State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, (2018).
171. Hernandez, J. A., Curatti, L., Aznar, C. P., Perova, Z., Britt, R. D. & Rubio, L. M. Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11679–11684 (2008).
172. Burgess, B. K. & Lowe, D. J. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chem. Rev.* **96**, 2983–3012 (1996).
173. Eady, R. R. Structure–Function Relationships of Alternative Nitrogenases. *Chem. Rev.* **96**, 3013–3030 (1996).
174. Rubio, L. M. & Ludden, P. W. Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* **187**, 405–414 (2005).
175. Hu, Y., Lee, C. C. & Ribbe, M. W. Extending the Carbon Chain: Hydrocarbon Formation Catalyzed by Vanadium/Molybdenum Nitrogenases. *Science* **333**, 753–755 (2011).
176. Hu, Y. & Ribbe, M. W. Biosynthesis of the Metalloclusters of Nitrogenases. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 455–483 (2016).
177. Ribbe, M. W., Hu, Y., Hodgson, K. O. & Hedman, B. Biosynthesis of Nitrogenase Metalloclusters. *Chem. Rev.* **114**, 4063–4080 (2014).
178. Hu, Y. & Ribbe, M. W. Nitrogenases—A Tale of Carbon Atom(s). *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **55**, 8216–8226 (2016).
179. Sickerman, N. S., Rettberg, L. A., Lee, C. C., Hu, Y. & Ribbe, M. W. Cluster assembly in nitrogenase. *Essays Biochem.* **61**, 271–279 (2017).
180. Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. & Dean, D. R. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2754–2758 (1993).
181. Dos Santos, P. C., Johnson, D. C., Ragle, B. E., Unciuleac, M.-C. & Dean, D. R. Controlled expression of nif and isc iron-sulfur protein maturation components reveals target specificity and limited functional replacement between the two systems. *J. Bacteriol.* **189**, 2854–2862 (2007).
182. Su, X., Lin, Z. & Lin, H. The biosynthesis and biological function of diphthamide. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 515–521 (2013).
183. Dong, M., Horitani, M., Dzikovski, B., Freed, J. H., Ealick, S. E., Hoffman, B. M. & Lin, H. Substrate-Dependent Cleavage Site Selection by Unconventional Radical S-Adenosylmethionine Enzymes in Diphthamide Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 5680–5683 (2017).
184. Hu, Y. & Ribbe, M. W. Maturation of nitrogenase cofactor—the role of a class E radical SAM methyltransferase NifB. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **31**, 188–194 (2016).
185. Rettberg, L. A., Wilcoxon, J., Lee, C. C., Stiebritz, M. T., Tanifuji, K., Britt, R. D. & Hu, Y. Probing the coordination and function of Fe₄S₄ modules in nitrogenase assembly protein NifB. *Nat. Commun.* **9**, 2824 (2018).
186. Sickerman, N. S., Ribbe, M. W. & Hu, Y. Nitrogenase Cofactor Assembly: An Elemental Inventory. *Acc. Chem. Res.* **50**, 2834–2841 (2017).
187. Hu, Y., Corbett, M. C., Fay, A. W., Webber, J. A., Hodgson, K. O., Hedman, B. & Ribbe, M. W. Nitrogenase Fe protein: A molybdate/homocitrate insertase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 17125–17130 (2006).
188. George, S. J., Hernandez, J. A., Jimenez-Vicente, E., Echavarrri-Erasun, C. & Rubio, L. M. EXAFS reveals two Mo environments in the nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthetic protein NifQ. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **52**, 11811–11814 (2016).

189. Howarth, R. W. Coastal nitrogen pollution: A review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae* **8**, 14–20 (2008).
190. Hardy, R. W. F. & Havelka, U. D. Nitrogen Fixation Research: A Key to World Food? *Science* **188**, 633–643 (1975).
191. Burén, S., López-Torrejón, G. & Rubio, L. M. Extreme bioengineering to meet the nitrogen challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 8849–8851 (2018).
192. Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D. R. & Seefeldt, L. C. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. *Chem. Rev.* **114**, 4041–4062 (2014).
193. Barahona, E., Jiménez-Vicente, E. & Rubio, L. M. Hydrogen overproducing nitrogenases obtained by random mutagenesis and high-throughput screening. *Sci. Rep.* **6**, 38291 (2016).
194. Rebelein, J. G., Stiebritz, M. T., Lee, C. C. & Hu, Y. Activation and reduction of carbon dioxide by nitrogenase iron proteins. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 147–149 (2017).
195. Lee, C. C., Hu, Y. & Ribbe, M. W. Vanadium Nitrogenase Reduces CO. *Science* **329**, 642–642 (2010).
196. Dobbek, H. Nitrogenase: A fuel-producing microbe. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 134–135 (2017).
197. Kaiser, J. T., Hu, Y., Wiig, J. A., Rees, D. C. & Ribbe, M. W. Structure of precursor-bound NifEN: a nitrogenase FeMo cofactor maturase/insertase. *Science* **331**, 91–94 (2011).
198. Mulder, D. W., Shepard, E. M., Meuser, J. E., Joshi, N., King, P. W., Posewitz, M. C., Broderick, J. B. & Peters, J. W. Insights into [FeFe]-hydrogenase structure, mechanism, and maturation. *Struct. Lond. Engl. 1993* **19**, 1038–1052 (2011).
199. Nicolet, Y. & Fontecilla-Camps, J. C. Structure-function relationships in [FeFe]-hydrogenase active site maturation. *J. Biol. Chem.* **287**, 13532–13540 (2012).
200. Nicolet, Y., Rubach, J. K., Posewitz, M. C., Amara, P., Mathevon, C., Atta, M., Fontecave, M. & Fontecilla-Camps, J. C. X-ray structure of the [FeFe]-hydrogenase maturase HydE from *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* **283**, 18861–18872 (2008).
201. Pilet, E., Nicolet, Y., Mathevon, C., Douki, T., Fontecilla-Camps, J. C. & Fontecave, M. The role of the maturase HydG in [FeFe]-hydrogenase active site synthesis and assembly. *FEBS Lett.* **583**, 506–511 (2009).