



HAL
open science

L'homéostasie du cuivre chez la protéobactérie *Rubrivivax gelatinosus*

Asma Azzouzi

► **To cite this version:**

Asma Azzouzi. L'homéostasie du cuivre chez la protéobactérie *Rubrivivax gelatinosus*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112078 . tel-00939859

HAL Id: tel-00939859

<https://theses.hal.science/tel-00939859>

Submitted on 31 Jan 2014

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : *Gènes Génome Cellules*
Laboratoire du *Centre Génétique et Moléculaire*

DISCIPLINE Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 05 Juin 2013

par

Asma AZZOUZI

L'homéostasie du cuivre chez la protéobactérie *Rubrivivax gelatinosus*

Directrice de thèse :

Chantal Astier

Co-directeur de thèse :

Soufian Ouchane

Composition du jury :

Président du jury :

Annie Sainsard-Chanet

Rapporteurs :

Corinne Cassier-Chauvat

Sébastien Thomine

Examineurs :

Jean-michel Camadro

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : *Gènes Génome Cellules*
Laboratoire du *Centre Génétique et Moléculaire*

DISCIPLINE Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 05 Juin 2013

par

Asma AZZOUZI

L'homéostasie du cuivre chez la protéobactérie *Rubrivivax gelatinosus*

Directrice de thèse :

Chantal Astier

Co-directeur de thèse :

Soufian Ouchane

Composition du jury :

Président du jury :

Annie Sainsard-Chanet

Rapporteurs :

Corinne Cassier-Chauvat

Sébastien Thomine

Examineurs :

Jean-michel Camadro

*A ma mère Mounira
Qui m'a couvée et entourée de son affection indéfectible.
Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond amour.*

*A mon père Moncef
Qui n'a jamais ménagé ses efforts pour me venir en aide chaque
fois que je l'ai sollicité.
Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon profond
amour.*

*A mon frère Amine, ma sœur Lamia et ma belle-sœur Soumaya
Qui m'ont toujours soutenu et encouragée.*

*A ma tante Khédija et son mari
Qui m'ont hébergée et soutenue à mon arrivée à Paris.
Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.*

*A mon futur mari Fredj
Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour ses
encouragements, sa tendresse et son soutien.
Qu'il soit assuré de mon affection et de ma fidélité.*

*A toute ma famille
A tous mes amis*

Remerciements

Aux membres du jury

Tout d'abord à la Présidente du jury

Madame le Professeur Annie Sainsard Chanet

Vous nous avez fait un très grand honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Qu'il me soit permis ici de vous exprimer ma reconnaissance et mon profond respect.

Aux rapporteurs Madame Corinne Cassier-Chauvat et Monsieur Sébastien Thomine de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse.

Au professeur Jean-michel Camadro d'avoir accepté de juger ce travail.

A Madame Chantal ASTIER qui a proposé et accepté de me confier ce projet de recherche passionnant.

Veuillez trouver ici, le témoignage de ma vive reconnaissance et de ma gratitude.

A mon co-directeur de thèse,

Monsieur Soufian OUCHANE.

Qui m'a soutenue et contribué énormément à l'élaboration de ce travail. Je lui suis reconnaissante pour sa grande disponibilité et sa précieuse aide dans la relecture et la correction de ma thèse.

Vous m'avez impressionné par vos compétences et vos grandes qualités humaines.

Tous mes remerciements et mon profond respect.

A Toute l'Equipe du laboratoire.

- Anne Durand

- Anne-Soisig Steunou

- Sylviane Liotenberg qui a eu la lourde tâche de corriger ce manuscrit.

Pour leur présence, leur écoute et leurs précieux conseils.

Qu'elles trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de ma profonde gratitude.

- Marie-Line Bourbon

Qui m'a soutenu et aidé tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Je la remercie vivement.

Un grand merci nostalgique aux anciens membres de l'équipe

- Bahia Khalfaoui

- Angélique Burg et Sophie Delaplane

- Audrey Guitton

Avec lesquelles j'ai passé de bons moments. Je leur souhaite plein de bonnes choses.

Je remercie chaleureusement tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à l'élaboration de cette thèse : les informaticiens, le personnel de la laverie, du magasin, de l'atelier, du secrétariat....

Liste des abréviations	7
Liste des souches	8
Introduction	11
I- Les métaux lourds	13
I-1- Des cofacteurs métalliques essentiels chez les bactéries	15
I-1.1- Les systèmes de transport du magnésium.....	16
I-1.2- Les systèmes de transport du Fer.....	18
I-1.3- Les systèmes de transport du Cuivre	21
II-Le cuivre.....	22
II-1- Généralités	22
II-1.1- Le cuivre en biologie : un métal essentiel mais à faible concentration	22
II-1.2-Toxicité du cuivre.....	23
II-2- L'homéostasie du cuivre	24
II-2.1- Système d'homéostasie du cuivre chez <i>Escherichia coli</i> :	25
II.2.1.1- Le système <i>Cue</i>	26
II.2.1.2- Le système <i>Cus</i>	31
II-2.2- La résistance au cuivre conférée par des gènes plasmidiques.	34
II-3- Les systèmes de régulation de l'homéostasie du cuivre : CueR et CusRS	35
II-3.1- Le régulateur type MerR : CueR	36
II-3.2- Le système à double composants de transduction du signal CusRS	36
II-4- L'homéostasie du cuivre chez d'autres organismes.....	37
II-4.1 Chez la cyanobactérie : <i>Synechocystis</i> PCC6803	37
II-4.2- Chez les bactéries Gram positive : <i>Enterococcus hirae</i>	39
II-4.3- Chez les plantes supérieures : <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
II-4.4- Chez les algues vertes : <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	44
II-4.5- L'homéostasie du cuivre chez l'homme et ses dysfonctionnements.....	46
III-1-Les bactéries pourpres	48
III-1.1- Classification et caractéristique des bactéries pourpres	48
III-1.2- Les protéobactéries comme modèle d'étude :	49

III-2- Les métabolismes énergétiques :	51
III-2.1- La photosynthèse chez les protéobactéries	51
III-2.1.1- Les complexes photosynthétiques et les pigments	52
III-2.1.1.1- Les complexes membranaires	52
Les antennes	52
Le centre réactionnel	54
III-2.1.1.2- Les pigments photosynthétiques.....	55
III-2.1.1.2.1- La biosynthèse des porphyrines : Bactériochlorophylles / Hèmes.....	56
Les étapes communes de biosynthèse :	56
Les hèmes :	56
Les Bactériochlorophylles	58
III-2.1.1.2.2- Les caroténoïdes	60
III-2.1.2- Organisation des gènes photosynthétiques.....	60
III-2.1.2.1- Le cluster photosynthétique : opéron et super-opéron	60
III-2.1.2.2- L'opéron <i>puc</i>	62
III-2.2- La respiration.....	62
III-2.2.1- La respiration aérobie	63
III-2.2.1.1- Le complexe <i>bc_L</i>	64
III-2.2.1.2- Les transporteurs solubles d'électrons : cytochrome <i>c</i> , HIPIP.....	66
III-2.2.1.3- Les oxydases terminales : structures et opérons.....	66
III-2.2.2- La respiration anaérobie : la dénitrification.....	70
III-2.2.2.1- La nitrate réductase :	73
III-2.2.2.2- La nitrite réductase : Nir	77
III-2.2.2.3- L'oxyde nitrique réductase : Nor	78
III-2.2.2.4- L'oxyde nitreux réductase Nos	79
III-2.2.2.5- La chaîne de transport des électrons au cours de la dénitrification.....	80
III-3- La régulation des métabolismes énergétiques :	82
III-3.1- Le facteur FnrL	83
III-3.2- Le régulateur transcriptionnel PpsR.....	85
III-3.3- Le système RegA/RegB	87

Objectif de la thèse	88
Résultats	91
Chapitre I : l'homéostasie du cuivre.....	92
Partie I : Identification d'une deuxième ATPase à cuivre impliquée dans la tolérance au cuivre chez <i>R. gelatinosus</i> et effet du cuivre excédentaire sur les métabolismes énergétiques, respiration et photosynthèse	94
I-1-Résumé de l'Article I : Coproporphyrin III excretion identifies the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase	94
I-1.1- Identification des gènes <i>copA/R/H/I/J</i> codant une 2ème ATPase à cuivre chez <i>R. gelatinosus</i>	94
I-1.2- Rôle de CopA dans la tolérance au cuivre.....	94
I-1.3- Régulation de l'expression de <i>copA</i> par le régulateur transcriptionnel CopR.....	95
I-1.4-Toxicité du cuivre en excès sur les métabolismes respiratoire et photosynthétique de <i>R. gelatinosus</i>	95
I-2-Résultats supplémentaires	96
I-2.1- CopA spécifique au cuivre.....	96
I.2.2- Régulation et expression du gène <i>copA</i>	97
I-2.3- Effet du cuivre sur deux protéines à cluster fer-soufre, HemN et BcheE impliquées dans la voie de biosynthèse des tétrapyrrolles	100
I-3.1- CtpA : rôle dans la biogenèse des cuproprotéines, CopA : requise pour la tolérance au cuivre.....	103
I-3.2- Effet du cuivre sur les protéines à cluster Fe-S.....	104
I-3.3- Rôles des partenaires chaperonnes des ATPases à cuivre dans la détermination de leurs fonctions physiologiques.....	105
Article I	109
Partie II : Identification d'autres gènes impliqués dans la tolérance au cuivre	110
II.1- Protéines induites en présence d'excès de cuivre.....	110
II-2- Description des protéines codées par les gènes <i>copI</i> , <i>copJ</i> et <i>copH</i>	112
II-2.1- La protéine CopI.....	112
II-2.2- La protéine CopJ	116
II-2.3- La protéine CopH.....	118
II-3- Etude du rôle de CopI dans la tolérance au cuivre.....	119

II-3.1- Induction de l'expression de <i>copI</i> /CopI en réponse au cuivre.....	119
II-3.2- Régulation de l'expression de <i>copI</i>	121
II-3.3- Rôle de CopI dans la tolérance au cuivre	122
II-3.5- Purification de CopI	128
II-4- La protéine CopJ	135
II-5- Discussion	138
II-5.1- Un système de détoxification du cuivre périplasmique chez <i>R. gelatinosus</i>	140
II-5.2- Rôles putatif de CopI dans la tolérance au cuivre.....	141
II-5.3- Rôles potentiels de CopJ et CopH dans la tolérance au cuivre chez <i>R. gelatinosus</i> ..	143
II-5.4- Modèle proposé pour l'efflux du cuivre chez <i>R. gelatinosus</i>	145
II-5.5- Modèles expliquant la sécrétion de la coproporphyrine III uniquement dans un mutant <i>copA</i> ⁻ de <i>R. gelatinosus</i>	148
II-6- Résultats supplémentaires	156
II-6.1- Les systèmes d'import du cuivre	156
II-6.1.1- Stratégie de la transposition par Tn5	156
II-6.1.2-Le suppresseur <i>copA::Ω-lolB::Tn5</i>	158
II-6.1.3-Le suppresseur <i>copA::Ω-feoB::Tn5</i>	159
II-6.1.4-Le suppresseur <i>copA::Ω-nikB::</i>	160
II-6.2-Discussion	162
Chapitre II : la dénitrification.....	164
Caractérisation de la voie de dénitrification chez <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	165
II-1-Identification des opérons codant les différentes enzymes impliquées dans la voie de dénitrification :	166
II-1.1-La nitrate réductase : Nap	166
II-1.2-Les nitrites réductases :	171
II-1.2.1-La nitrite réductase dissimilatrice: <i>cd₁</i> NIR.....	171
II-1.2.2- La nitrite réductase assimilatrice: NirB	174
II-1.3- L'oxyde nitrique réductase : Nor	176
II-1.4- L'oxyde nitreux réductase : Nos	178

II-2- Résultats.....	179
II-3- Discussion.....	180
Discussion générale et perspective.....	184
I-Les systèmes de transport du cuivre.....	185
II- Régulation du système de tolérance du cuivre chez <i>R. gelatinosus</i>	186
II- Un système de tolérance au cuivre différent d' <i>E. coli</i>	188
IV- L'effet du cuivre excédentaire sur les cellules.....	190
V- Mécanisme d'entrée et de circulation du cuivre dans la cellule.....	191
ANNEXES.....	212
Listes des figures et des tableaux.....	218
Listes des figures :.....	220
Listes des tableaux :.....	221
RESUME.....	222

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ALA : Une alanine
ARN : Acide ribonucléique
ATP : L'adénosine triphosphate
BChls : Les bactériochlorophylles
BN-PAGE : Blue native polyacrylamide gel electrophoresis
CM : CarboxyMéthyl cellulose
COX: La cytochrome *c* oxydase
CR: Le centre réactionnel
Cu-NIR: La nitrite réductase à cuivre
DAB : 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DEAE : diéthylaminoéthyl cellulose
Fnr: Fumarate and nitrate regulator
HiPIP: High potential iron-sulfur protein
His : Une histidine
HTH: hélice-tour-hélice
kDa: Le kilodalton
LH : L'antenne collectrice (Light harvesting)
MBD: Le domaine CXXC liant le cuivre
Met : Une méthionine
MQ: La ménaquinone
NAR : La nitrate réductase membranaire
NAP : La nitrate réductase périplasmique
NAS : La nitrate réductase cytoplasmique
NO₃⁻ : Le nitrate
NO₂⁻ : Le nitrite
NO : L'oxyde nitrique
N₂O : L'oxyde nitreux
NOS : L'oxyde nitreux réductase ou la N₂O réductase
O₂ : L'oxygène
ORF : La phase ouverte de lecture (open reading frame)

pb : Paire de base
Q : Les quinones
QH₂ : les quinoles
RPE : La résonance paramagnétique électronique
SDS : Dodécylsulfate de sodium
TMBZ : 3,3',5,5'-tetraméthyl-benzidine
TMPD: tétraméthyl-p-phénylènediamine
UQ : L'ubiquinone
wt : La souche sauvage

Liste des souches

Allochromatium vinosum : *A. vinosum*
Achromobacter sp. AO22
Aeromonas veronii : *A. veronii*
Arabidopsis thaliana : *A. thaliana*
Bradyrhizobium japonicum : *B. japonicum*
Bacillus subtilis: *B. subtilis*
Chlamydomonas reinhardtii : *C. reinhardtii*
Congregibacter litoralis : *C. litoralis*
Cupriavidus metallidurans CH34 : *C. metallidurans* CH34
Enterococcus hirae : *E. hirae*
Escherichia coli : *E. coli*
Helicobacter mustelae : *H. mustelae*
Helicobacter pylori : *H. pylori*
Legionella pneumophila : *L. pneumophila*
Leptothrix cholodnii SP-6 : *L. cholodnii* SP-6
Mycobacterium tuberculosis : *M. tuberculosis*
Neisseria meningitidis : *N. meningitidis*
Paracoccus denitrificans : *P. denitrificans*
Paracoccus pantotrophus : *P. pantotrophus*
Porphyromonas gingivalis : *P. gingivalis*
Pseudomonas aeruginosa : *P. aeruginosa*

Pseudomonas stutzeri : *P. Stutzeri*
Pseudomonas syringae pathavor tomato : *P. Syringae*
Ralstonia eutropha H16 : *R. eutropha H16*
Rhodobacter capsulatus : *R. capsulatus*
Rhodobacter sphaeroides : *R. Sphaeroides*
Rhodocyclus tenuis : *R. tenuis*
Rhodopseudomonas acidophila : *R. acidophila 10050*
Rhodopseudomonas palustris : *R. palustris*
Rhodopseudomonas viridis : *R. Viridis*
Rubrivivax benzoatilyticus JA2 : *R. benzoatilyticus JA2*
Rubrivivax gelatinosus : *R. gelatinosus*
Salmonella enterica serovar typhimurium LT2 : *Salmonella*
Thiosphaera pantotropha : *T. pantotropha*
Vibrio cholerae : *V. cholerae*

INTRODUCTION

Certains métaux sont indispensables pour la survie des organismes procaryotes et eucaryotes en participant à de nombreux processus métaboliques essentiels dans les cellules vivantes. En effet, les métaux alcalins comme le sodium, le potassium ou encore le calcium jouent un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire et assurent le maintien d'une force ionique optimale. D'autres métaux lourds comme le fer ou le cuivre sont des cofacteurs associés à plusieurs enzymes impliquées dans des processus cellulaires essentiels tels que la photosynthèse, la respiration aérobie et anaérobie, ou la détoxification des espèces activées d'oxygène (Kim, Nevitt et al. 2008).

Par ailleurs, certains métaux lourds comme le cadmium, l'or ou encore l'argent n'ont aucune fonction physiologique connue et sont considérés comme des métaux toxiques pour la cellule. Les métaux nécessaires comme le Cu, le Fe ont également des effets toxiques sur les cellules vivantes lorsqu'ils sont en excès. Les métaux en excès affectent divers aspects du fonctionnement cellulaire. Ils sont capables de rentrer en compétition avec les métaux essentiels au niveau de leur site de liaison ou de se lier de manière non spécifique à différentes protéines, entraînant ainsi des changements conformationnels voire l'inactivation de la protéine (Chillappagari, Seubert et al. 2010). De plus, ils peuvent être à l'origine d'un stress oxydatif en catalysant la formation de radicaux libres et autres espèces activées de l'oxygène (ROS) par leur capacité à s'engager dans des réactions redox *via* la réaction de Fenton provoquant ainsi de nombreuses lésions cellulaires (Imlay and Imlay 1996 ; Storz and Imlay 1999).

Les différentes études menées chez les bactéries montrent l'importance de plusieurs métaux notamment le molybdène, le magnésium, le fer et le cuivre. En particulier chez les bactéries photosynthétiques, ces métaux sont essentiels pour la mise en place des métabolismes énergétiques (photosynthèse et respiration).

A titre d'exemple, le cuivre participe directement à divers métabolismes vitaux comme la respiration aérobie *via* les quinols ou les cytochromes oxydases. Chez les cyanobactéries, le cuivre intervient également dans la photosynthèse *via* la plastocyanine. Paradoxalement, cet ion métallique essentiel peut aussi provoquer des dommages au sein de la cellule. De ce fait, l'apport du cuivre qui est vital pour ces bactéries doit être aussi rigoureusement contrôlé. L'homéostasie du cuivre découle de la coordination et de la régulation stricte des systèmes d'import, de stockage et d'efflux. Dans ce cadre, certaines bactéries peuvent tolérer des

concentrations importantes du cuivre grâce à l'acquisition de systèmes d'efflux ou de stockage. C'est le cas par exemple de *Cupriavidus metallidurans* CH34 ou encore de *Pseudomonas (P.) syringae* pathavor tomato (Silver and Phung 1996 ; Monchy, S et al 2007).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'homéostasie du cuivre chez la bactérie pourpre photosynthétique *Rubrivivax (R.) gelatinosus* et à l'effet de l'excès de cuivre sur les métabolismes énergétiques de cette bactérie. Avant de présenter les résultats obtenus et les perspectives de mon étude, je ferai une courte introduction sur les métaux lourds et les cofacteurs métalliques essentiels (Mg, Fe et Cu) ainsi que sur leurs systèmes de transport chez les bactéries photosynthétiques. A la suite, je décrirai les mécanismes d'homéostasie du cuivre ainsi que la régulation des systèmes de transport chez différents organismes : protéobactéries, cyanobactéries, algues vertes et plantes.

Dans la deuxième partie de cette introduction, je présenterai les bactéries pourpres et les différents complexes impliqués dans la photosynthèse et la respiration, ce qui permet de se rendre compte de la place et de l'importance de ces métaux dans ces métabolismes.

I- Les métaux lourds

Ces éléments traces métalliques, appelés abusivement métaux lourds, incluent aussi bien les métaux présents dans l'environnement à l'état de trace (cadmium, cuivre, mercure, plomb, nickel, zinc, etc.), que des éléments non-métalliques comme l'arsenic ou le fluor. Comme tous les minerais, ces éléments métalliques sont présents dans les roches mais ils sont également présents dans l'eau et dans le sol. Des phénomènes naturels comme l'érosion et les éruptions volcaniques touchant ces réserves naturelles entraînent la diffusion de ces métaux dans l'environnement. L'activité humaine contribue également largement à la propagation de ces métaux dans l'environnement *via* l'exploitation minière de ces gisements et *via* les industries de fabrication des métaux et des alliages qui rejettent leurs effluents dans l'environnement (eaux et sols). L'eau constitue un élément fondamental en matière de pollution de la chaîne alimentaire (algues, poissons, mammifères) par ces éléments métalliques. Ces métaux lourds peuvent ainsi s'accumuler dans les organismes vivants et avoir des effets toxiques à court et long terme. Certains de ces métaux comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et l'argent (Ag) souvent utilisés en industrie ne sont pas nécessaires à la vie et sont préjudiciables à faible et forte concentrations.

Cependant, plusieurs de ces éléments métalliques sont des oligo-éléments indispensables à la vie à très faible dose (la concentration du cuivre libre dans la cellule est inférieure à de 10^{-18} M) (Rae, Schmidt et al. 1999). Ils interviennent comme des cofacteurs dans diverses réactions biochimiques cruciales. C'est le cas du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du nickel (Ni), du cobalt (Co), du sélénium (Se), du molybdène (Mo), du manganèse (Mn) et du magnésium (Mg). Le nickel, par exemple, est le cofacteur des uréases et des hydrogénases, le cobalt est le cofacteur de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine B12, le molybdène est le cofacteur de la DMSO réductase ou encore de la nitrate réductase (Nap/Nar), le manganèse est le cofacteur du photosystème de type II. L'homoéostasie des ions métalliques est maintenue par un processus finement réglé mettant en jeu des systèmes d'imports, de stockage et de l'efflux. Le maintien du bon équilibre des concentrations en ions métalliques dans la cellule est orchestré par des transporteurs de métaux de faible et de forte affinité. Ces transporteurs peuvent être groupés en deux classes à savoir ceux qui transportent le métal en utilisant l'énergie chimique générée par l'hydrolyse de l'ATP et ceux qui transportent l'ion en utilisant le gradient électrochimique des protons. Un dysfonctionnement dans le système d'homéostasie (import / efflux) de ces métaux peut causer des désordres physiologiques chez les procaryotes et les eucaryotes.

Chez les procaryotes, la toxicité intracellulaire des ions métalliques lourds liée à un dysfonctionnement de leurs systèmes d'homéostasie relève de divers mécanismes. En particulier, la fixation non spécifique des cations métalliques en excès sur certains résidus (cystéine, acide glutamique ou aspartique) qui constituent le site actif des enzymes conduit à l'inhibition de leurs activités enzymatiques. Un excès en cuivre ou encore en cobalt diminue l'activité des protéines à cluster Fe-S chez *Escherichia coli* ou *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2 (Macomber and Imlay 2009 ; Thorgersen and Downs 2007). Le cuivre endommagerait le centre Fe-S des déshydratases impliquées dans la biosynthèse des acides aminés branchés chez *Echerichia (E.) coli* (Macomber and Imlay 2009).

Il a été proposé également que certains métaux tels que le fer puissent provoquer un stress oxydatif à cause de leurs potentiels redox entraînant ainsi la formation de radicaux libres *via* des réactions du type Fenton pouvant endommager les protéines, les lipides et l'ADN (Keyer and Imlay 1996).

Par ailleurs, un déficit en ions métalliques peut altérer la croissance des bactéries ou leur aptitude à coloniser certains milieux. C'est le cas de certaines bactéries pathogènes comme

Mycobacterium (M.) tuberculosis, *Salmonella* ou *Pseudomonas (P.) aeruginosa* chez lesquelles l'acquisition du fer est indispensable pour le déclenchement des mécanismes infectieux (Dupont, Grass et al. 2011). Ces bactéries possèdent également des systèmes d'homéostasie de métaux indispensables au maintien de leur pouvoir virulent (Dupont, Grass et al. 2011).

Chez les eucaryotes, il est connu que l'altération de l'homéostasie des ions métalliques est responsable de plusieurs pathologies (Nelson 1999). Un défaut dans l'absorption du cuivre chez l'homme est responsable des syndrômes de Menkes et de Wilson (Cox and Moore 2002 ; Mercer and Llanos 2003). De même, un défaut de transport du Fer conduit à l'hémochromatose (Nelson 1999). Des organismes tel que la levure et la drosophile servent de modèles d'étude de l'homéostasie des métaux chez les eucaryotes.

I-1- Des cofacteurs métalliques essentiels chez les bactéries

Divers cofacteurs métalliques sont indispensables pour assurer la croissance et la multiplication des bactéries. Ainsi, les ions cuivre sont nécessaires pour les superoxydes dismutases à Cu mais également pour les oxydases terminales (les quinols et les cytochromes oxydases) impliquées dans la chaîne respiratoire de plusieurs bactéries. Le fer est également incorporé au niveau du centre catalytique de nombreux enzymes intervenant dans diverses réactions redox. Ces enzymes jouent un rôle central dans plusieurs processus cellulaires comme le transport d'électrons (cytochromes solubles, cytochrome oxydase, Ferredoxines, complexe *bc₁*, etc...), la biosynthèse des acides aminés à chaîne branchée (valine, leucine et isoleucine) *via* l'action des déshydratases à cluster Fe-S, la régulation des gènes selon l'état redox du milieu ou la disponibilité du fer *via* des facteurs de transcription à cluster Fe-S comme FnrL ou le facteur à fer Fur.

Parmi les métaux indispensables pour le développement des bactéries photosynthétiques comme *Rhodobacter (R.) capsulatus*, *Rhodobacter (R.) sphaeroides*, *Rhodospseudomonas (R.) palustris* ou *R. gelatinosus* on peut citer le magnésium, le fer et le cuivre. Ces métaux sont les plus étudiés chez ces bactéries où ils interviennent dans des processus vitaux. Le fer et le magnésium jouent notamment un rôle important dans la voie de biosynthèse des porphyrines (hèmes et bactériochlorophylles), cofacteurs nécessaires à la respiration et à la photosynthèse.

D'une part, le magnésium constitue le facteur métallique pour la bactériochlorophylle associée au centre réactionnel. Ce pigment joue un rôle dans l'absorption de l'énergie lumineuse au niveau des photosystèmes. D'autre part, l'hème est essentiel pour la synthèse des cytochromes nécessaires pour le complexe *bc₁* ou encore pour la nitrite réductase à cytochrome *cd₁* (*cd₁NIR*) et l'oxyde nitrique réductase (NOR). De plus, le fer est également important pour le centre réactionnel des photosystèmes mais aussi pour la formation des clusters Fe-S de plusieurs enzymes impliquées dans divers voies métaboliques comme la protéine Rieske contenant un cluster [2Fe-2S].

Quant au cuivre, il a une fonction importante dans les oxydases type hème-cuivre (les cytochromes *c* oxydases) et les quinols oxydases ainsi que dans d'autres cuproprotéines membranaires comme la nitrous oxyde réductase (la NOS réductase) ou la nitrate réductase à cuivre (Cu-NIR). Chez les cyanobactéries, le cuivre est le cofacteur de la plastocyanine impliquée dans le transfert d'électrons au niveau de la chaîne photosynthétique. L'approvisionnement des bactéries en ces métaux est assuré par des systèmes de transports (import, efflux) assez spécifiques identifiés et caractérisés chez certaines bactéries dont certains sont présents chez les bactéries photosynthétiques.

I-1.1- Les systèmes de transport du magnésium

Le Mg²⁺ est le cation bivalent le plus abondant dans les cellules vivantes. Contrairement au cuivre et au fer dont la concentration cellulaire est de l'ordre du nanomolaire, la concentration totale en Mg²⁺ dans les cellules procaryotes et eucaryotes est de l'ordre de 15 à 25 mM (Maguire and Cowan 2002). Plusieurs transporteurs de Mg²⁺ ont été caractérisés mais parmi eux aucun système d'efflux du Mg n'a été identifié bien qu'il a été suggéré que le transporteur CorA serait également impliqué dans l'efflux du Mg (Maguire and Cowan 2002).

. Ceci semble indiquer que le magnésium n'est pas toxique pour les cellules à l'inverse des autres métaux.

Les systèmes de transport du magnésium ont été majoritairement étudiés chez la bactérie Gram négative *Salmonella typhimurium*. Quatre transporteurs sont identifiés comme impliqués dans l'import du Mg²⁺ : deux ATPase MgtA/B, MgtE et le transporteur CorA (Figure 1). Ces deux derniers sont largement répandus chez les bactéries et les archées alors que la classe des transporteurs MgtA/MgtB est présente principalement chez les eubactéries.

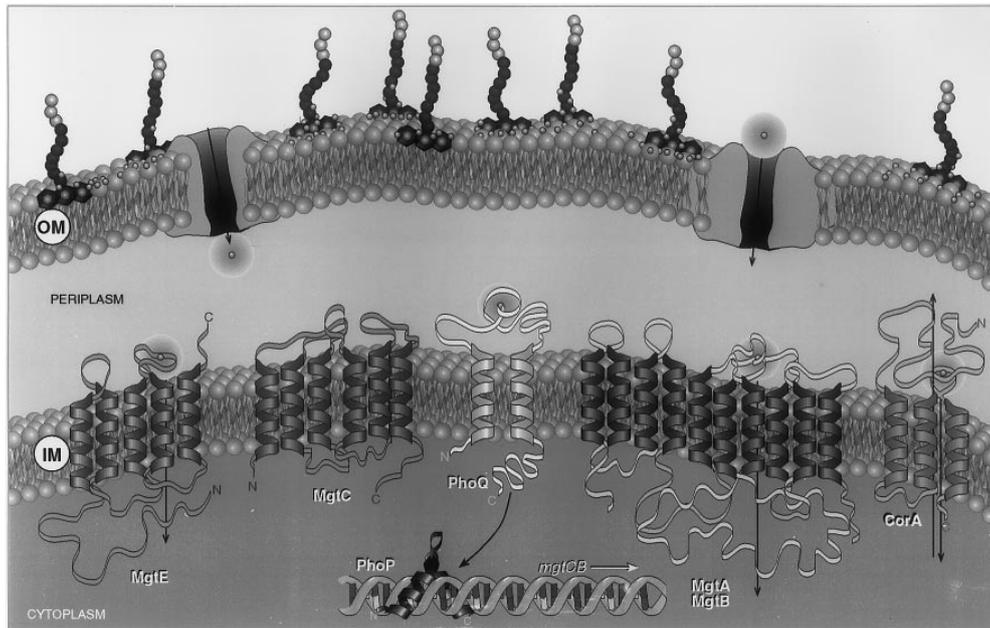


Figure 1 : Les complexes membranaires impliqués dans le transport du Mg^{2+} .

L'entrée du Mg^{2+} dans la cellule se fait par l'intermédiaire d'une porine de la membrane externe (OM). Une fois dans le périplasma, le Mg^{2+} est transporté vers le cytoplasme *via* des transporteurs de la membrane interne CorA, MgtA, MgtB et MgtE. MgtC n'est pas connu pour transporter le Mg^{2+} . Seule CorA est capable d'assurer l'efflux et l'import du Mg^{2+} . PhoQ est un récepteur du Mg^{2+} qui régule avec PhoP l'expression de plusieurs gènes notamment MgtA et MgtB. Le cation Mg^{2+} hydraté associé aux porines et aux différents transporteurs du magnésium est représenté par un grand cercle gris. Le petit cercle en gris foncé représente la forme ionique de Mg^{2+} sans sa coquille d'hydratation (Maguire and Cowan 2002).

Le transport du Mg^{2+} par MgtE et CorA dépend du gradient électrochimique membranaire alors que MgtA/B utilisent l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP. CorA est exprimée d'une manière constitutive alors que l'expression des ATPases MgtA/MgtB est induite en présence de faible concentration de Mg^{2+} dans le milieu *via* le système à double composante PhoP/PhoQ.

Chez les bactéries photosynthétiques, rien n'est connu sur le transport du magnésium. La recherche des séquences codantes pour ces transporteurs dans le génome de *R. gelatinosus*, révèle la présence de la protéine CorA présentant 46% d'identité avec celle d'*E. coli* ainsi que les ATPases MgtA/MgtB et le régulateur à double composants PhoP/PhoQ.

Le métabolisme du Mg^{2+} est peu étudié chez les cyanobactéries ainsi que chez les bactéries pourpres malgré l'importance du Mg^{2+} pour la synthèse de la chlorophylle, ceci peut être due au fait que ce métal n'est pas toxique pour ces organismes.

I-1.2- Les systèmes de transport du Fer

Le fer participe à des processus biologiques majeurs comme la photosynthèse, la fixation de l'azote (N_2), la respiration, le transport de l'oxygène, le cycle des acides tricarboxyliques (TCA), la régulation des gènes et la biosynthèse de l'ADN. Sa fonctionnalité biologique découle presque entièrement de son incorporation dans des protéines, comme espèces mono- ou binucléaires (Fe ou Fe-Fe), ou sous une forme plus complexe en tant qu'élément des clusters fer-soufre ou des groupes hémiques. A l'origine, l'atmosphère de la Terre était hautement réductrice et anaérobie. La forme prédominante du fer se trouvait à l'état ferreux Fe^{2+} relativement soluble. L'enrichissement de l'atmosphère terrestre en dioxygène grâce à la photosynthèse oxygénique des cyanobactéries aurait commencé il y a environ 3.8 milliards d'années. Cet événement majeur bouleversa la vie sur Terre entraînant l'apparition du fer ferrique Fe^{3+} extrêmement insoluble. Au cours de l'évolution, les bactéries ont développé des systèmes d'homéostasie leur permettant de maintenir un approvisionnement suffisant en fer tout en gérant le niveau cellulaire du fer. Ces systèmes sont bien étudiés chez *E. coli* en particulier. Les bactéries élaborent et secrètent des chélateurs ferriques extracellulaires de haut-affinité appelés sidérophores. Plusieurs siderophores ont été caractérisés, les plus connus sont l'entérobactine et le ferrichrome. Ces derniers chélatant le Fe^{3+} passent à travers des récepteurs spécifiques de la membrane externe vers le périplasme.

Ce processus de transport nécessite de l'énergie sous forme de force motrice de protons et le complexe protéique de la membrane interne TonB-ExbB-ExbD, pour transmettre cette énergie au récepteur de la membrane externe (Figure 2A) (Noinaj, Guillier et al. 2010). *E. coli* K12 possède six récepteurs de Fer-sidérophore au niveau de la membrane externe (FhuE, FhuA, FecA, FepA, Cir, Fiu) permettant ainsi l'acquisition de différents complexes chélatés de fer. Au niveau du périplasme, le complexe Fer-sidérophore est pris en charge par une protéine périplasmique liant le fer-sidérophore (FhuB, FecB et FepB) afin de le transporter vers un transporteur de type ABC de la membrane interne (FhuCD, FecCDE et FepCDEG) (Andrews, Robinson et al. 2003). Ce dernier délivre le fer-sidérophore au cytoplasme où le complexe est probablement dissocié par la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion fer ferreux (Fe^{2+}). Le Fer est alors soit destiné au stockage soit à l'incorporation dans des enzymes. Les sidérophores sont détruits ou recyclés vers le milieu extérieur (Figure 2B).

L'expression des transporteurs TonB-dépendants est réglée de différentes manières incluant les régulateurs métal-dépendants (Fur), les systèmes σ /anti- σ facteur et des petits

ARNs. Le système *fecABCDE* d'*E. coli* impliqué dans le transport du citrate ferrique est réprimé par Fe^{2+} -Fur et induit par le système FecI-FecR spécifique du transporteur Fec. Cette régulation est contrôlée par le récepteur de la membrane externe FecA. FecI est un facteur sigma cytosolique « facteur σ de fonction extracytoplasmique (ECF) » qui agit en tant que régulateur direct des gènes *fec*. La régulation nécessite une interaction entre l'extension N-terminale du récepteur FecA avec le domaine périplasmique C-terminal du régulateur de la membrane interne FecR qui enjambe l'espace périplasmique. De cette manière, FecR discerne si FecA interagit ou non avec son substrat de transport (le dicitrate ferrique) et en réponse, FecI subit un changement conformationnel entraînant son activation. Ce dernier déplace le régulateur Fur fixé au niveau de la région promotrice de l'opéron *fecABCDE* permettant ainsi une levée d'inhibition de la transcription (Figure 2A) (Andrews, Robinson et al. 2003).

D'autres systèmes de transport du fer sont également identifiés chez plusieurs bactéries notamment *E. coli*, *Helicobacter (H.) pylori* tels que le système Feo qui transporte du fer ferreux Fe^{2+} en utilisant l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP (Cartron, Maddocks et al. 2006). Ce système interviendrait dans des conditions de faible oxygénation ou d'anaérobiose (Figure 2C). Par ailleurs, plusieurs bactéries possèdent des réserves intracellulaires de Fer par l'intermédiaire de protéine de stockage. Cette réserve de fer pourrait être utilisée par la bactérie si les approvisionnements externes en fer sont restreints. Trois types de protéines de stockage du fer sont reconnus chez les bactéries : les ferritines identifiées aussi chez les eucaryotes, les bactérioferritines contenant de l'hème trouvé seulement chez les eubactéries et enfin la protéine Dps « DNA-binding protein starved cells » présente uniquement chez les procaryotes. Ces protéines s'assemblent pour former une coquille sphérique de protéines dont la cavité centrale sert de réservoir de fer (Andrews, Robinson et al. 2003).

Les différents gènes codant pour ces protéines impliquées dans le transport et le stockage du fer sont réprimés par le régulateur transcriptionnel Fur (Ferric-uptake regulator) en présence de quantité suffisante en fer. Le complexe Fe^{2+} -Fur se fixe à la région promotrice des gènes au niveau de la « Fur Box ». L'analyse du génome de *R. gelatinosus* révèle que le métabolisme du fer est assuré au moins par les récepteurs de sidérophores suivants : Fit et FhuA (ferrichrome récepteur), FecRI-ABCDE (dicitrate récepteur), Fpva (ferripyroverdine récepteur), FepA (enterobactérine récepteur). Chez *R. gelatinosus*, la protéine Dps et deux bactérioferritines ont été identifiées comme protéines de stockage du fer.

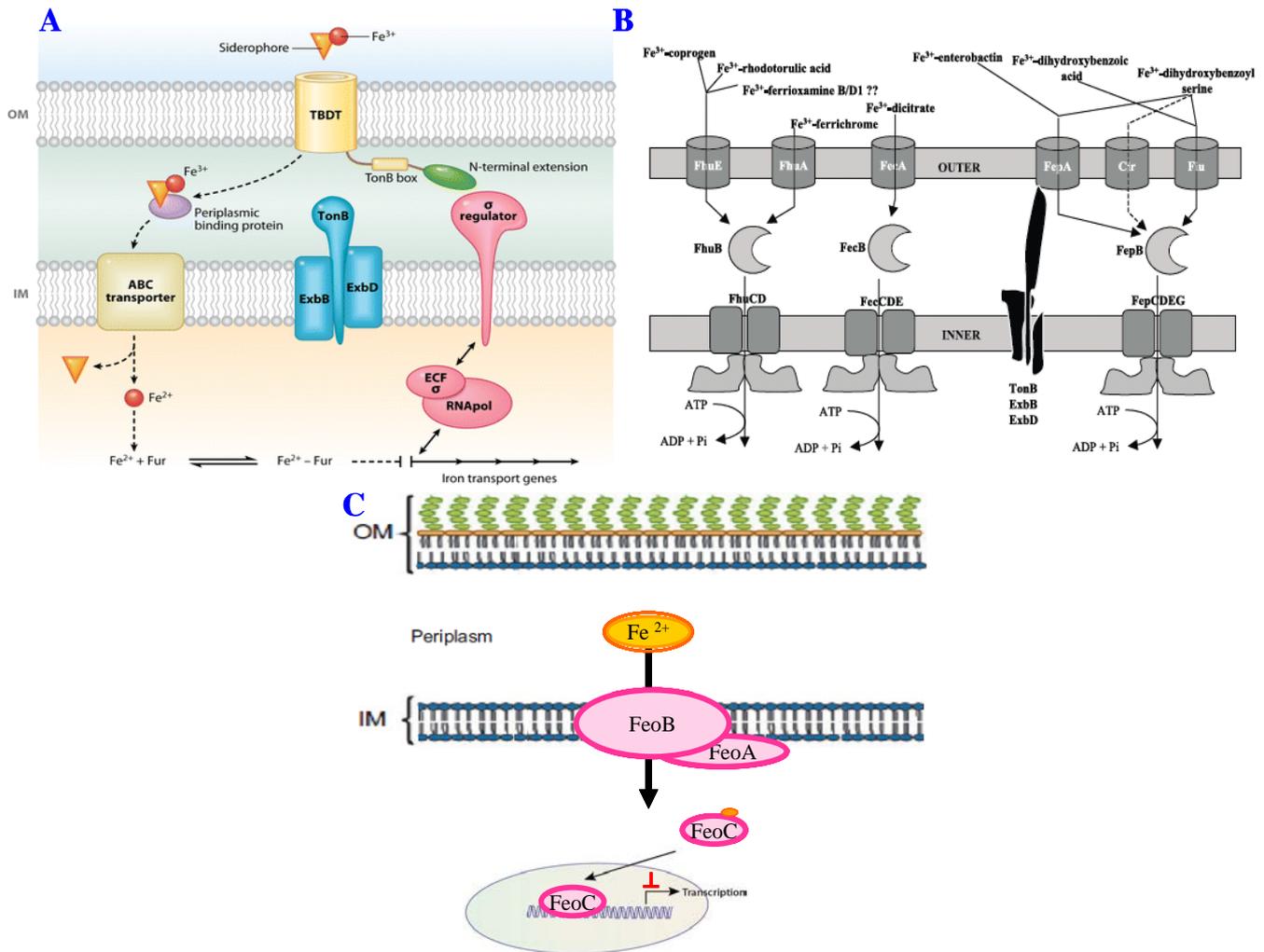


Figure 2 : Les systèmes de transports du fer

- A - Schéma de l'acquisition du fer par l'intermédiaire des sidérophores chez les bactéries Gram négatif. Le récepteur de sidérophores est un transporteur TonB-dépendant, (TBBDT). Le transport des sidérophores à travers la membrane externe nécessite une force motrice de protons provenant du complexe du TonB-ExbB-ExbD de la membrane interne. Le transport des sidérophores ferriques à travers la membrane interne exige l'intervention d'une protéine périplasmique et un transporteur ABC localisé dans la membrane interne. Certains TBBDT sont régulés par le système de régulateur σ (FecR) et du facteur σ de fonction extracytoplasmique (ECF) (FecI) (Noinaj, Guillier et al. 2010).

- B - Représentation schématique des systèmes d'import du fer *via* les sidérophores chez *E. coli* K12. Différents sidérophores sont présents chez *E. coli* K12 chélatent le fer du milieu extracellulaire. L'entrée de ces sidérophores dans le périplasm passe à travers six récepteurs spécifiques de la membrane externe (FhuE, FhuA, FecA, FepA, Cir, Fiu). Le complexe Fer-sidérophore est pris en charge par les protéines périplasmiques (FhuB, FecB et FepB) et ensuite transporté vers le cytoplasme par des systèmes de transports de type ABC de la membrane interne (FhuCD, FecCDE et FepCDEG) (Andrews, Robinson et al. 2003).

- C - Système de transport du fer ferreux Fe²⁺ : le système Feo.

Le Fe²⁺ diffuse à travers les porines de la membrane externe des bactéries. Au niveau du périplasm, le fer est pris en charge par le système FeoABC. FeoA active le transport du Fe²⁺ par FeoB. FeoC aurait un rôle de régulateur de l'expression de l'opéron Feo (Cartron, Maddocks et al. 2006).

I-1.3- Les systèmes de transport du Cuivre

Le cuivre (Cu) est un métal rédox actif essentiel pour la plupart des bactéries. Il sert de cofacteur catalytique et structurel pour des enzymes impliquées dans divers processus biochimiques importants tels que la production de l'énergie *via* la chaîne respiratoire. Le métabolisme du cuivre est bien connu et étudié chez la bactérie *E. coli*. Très peu de choses sont connues sur l'import du cuivre chez *E. coli*, mais il a été supposé que l'entrée du cuivre s'effectue par l'intermédiaire des porines de la membrane externe notamment les porines OmpC et OmpF ou *via* le système d'import du zinc de type ABC *znuABC* (Li, Nikaido et al. 1997 ; Rensing and Grass 2003 ; Kershaw, Brown et al. 2005). Les mécanismes d'efflux du cuivre du cytoplasme vers le périplasma chez cette bactérie sont bien connus, ils sont assurés par l'action successive de l'ATPase CopA et du système CusCFBA. Ces derniers sont respectivement sous le contrôle du régulateur CueR et du système à double composante CusRS. Les systèmes de prise en charge du cuivre sont aussi bien étudiés chez d'autres bactéries comme *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa*, *Cupriavidus (C.) metallidurans* souche CH34 ou encore chez *Enterococcus (E.) hirae* (Espariz, Checa et al. 2007 ; Raimunda, Gonzalez-Guerrero et al. 2010). La résistance au cuivre chez *Salmonella typhimurium* fait intervenir le transporteur membranaire CopA régulé par CueR, l'oxydase à cuivre périplasmique CuiD et la chaperone périplasmique CueP (Espariz, M, Cheva, SK et al., 2007 ; Osman, Waldron et al. 2010). Les études menées sur le système de tolérance au cuivre chez *P. aeruginosa* mettent en évidence jusqu'à présent, la présence de l'ATPase CopA1 (Raimunda, Gonzalez-Guerrero et al. 2010).

En revanche, les systèmes de transports du cuivre chez les bactéries photosynthétiques ne sont pas très étudiés. À l'exception de certaines études réalisées chez les cyanobactéries (transporteurs ATPasiques de cuivre CtaA/PacS) (Tottey, Rich et al. 2001), aucune étude n'est réalisée sur les transporteurs CopA et Cus chez les protéobactéries photosynthétiques à ce jour. Une étude a été réalisée chez *R. capsulatus* sur l'homéostasie du cuivre et porte sur l'oxydase à cuivre CutO (Wiethaus, Wildner et al. 2006) et son rôle dans la tolérance au cuivre. Je me suis intéressée donc au cours de ma thèse au métabolisme du cuivre chez la protéobactérie *R. gelatinosus* afin d'identifier les protéines impliquées dans ce processus et de comprendre les mécanismes qui régissent l'homéostasie du cuivre chez cette bactérie pourpre. Dans le chapitre suivant, je présenterai : 1) Les systèmes d'homéostasie les mieux caractérisés notamment celui d'*E. coli*. 2) Les systèmes d'homéostasie chez les organismes photosynthétiques.

II-Le cuivre

II-1- Généralités

II-1.1- Le cuivre en biologie : un métal essentiel mais à faible concentration

La disponibilité biologique des différents métaux a vraisemblablement changé au cours de l'histoire de la terre. A l'origine, l'atmosphère de la Terre était hautement réductrice et anaérobie. De ce fait, le cuivre comme d'autres métaux se trouvait à l'état réduit Cu(I) sous la forme de sulfites hautement insolubles. La production de dioxygène par les cyanobactéries a rendu le cuivre disponible et soluble pour les processus biologiques (Dupont, Grass et al. 2011).

Des études ont montré que la toxicité du cuivre varie selon son état redox. En effet, il semblerait que le cuivre en anaérobiose soit plus toxique (Outten, Huffman et al. 2001). Récemment, une étude menée par Macomber a révélé que le cuivre en excès attaquerait les centres intracellulaires de Fer-Soufre des déshydrogénases chez *E. coli* (Macomber and Imlay 2009). De plus, en condition oxygénique, le cuivre peut catalyser une réaction comme la réaction de Fenton ($\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$) qui peut endommager les lipides et des protéines.

Rapidement, la plupart des micro-organismes ont dû s'adapter à la présence du cuivre dans leur habitat en se dotant de mécanismes de tolérance au cuivre et en modifiant probablement les structures de protéines déjà existantes (Castresana, Lubben et al. 1994). Avec l'apparition de l'oxygène sur terre, les microorganismes ont mis en place des cuproprotéines qui participent directement à des processus biologiques vitaux. Ainsi, il semblerait que la cytochrome *c* oxydase *cbb*₃ dérive de la NO réductase (Castresana, Lubben et al. 1994). La sous-unité catalytique de la NO réductase, NorB contenant deux hèmes de type *b* et un fer non hémique Fe_B aurait évolué en remplaçant le fer par le cuivre. Cette modification aurait abouti à la formation de la sous-unité catalytique CcoN afin d'utiliser l'oxygène accumulé dans l'atmosphère (Zumft 1997 ; Castresana, Lubben et al. 1994).

Aujourd'hui, plus d'une trentaine de protéines à cuivre est répertoriée. Ces protéines peuvent être impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la respiration où le cuivre fait parti du site actif des oxydases terminales lieu de la réduction de l'oxygène en eau.

Dans la photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries, le cuivre est le cofacteur des plastocyanines et intervient dans le transfert d'électrons du *b6f* vers le photosystème. Le cuivre est aussi trouvé dans les enzymes de la voie de dénitrification comme la nitrite réductase à cuivre catalysant la réduction du nitrite en oxyde nitrique (NO) ou encore la nitrous oxyde réductase (Nos) intervenant dans la dernière étape de la chaîne de dénitrification en réduisant l'oxyde nitreux N₂O en azote N₂. Des cuproprotéines sont aussi impliquées dans la détoxification d'espèces réactives d'oxygène (la Superoxyde dismutase à cuivre Cu-SOD).

Les enzymes à cuivre utilisent le métal comme donneur/accepteur d'électrons grâce aux deux états redox Cu(I) et Cu(II). Cependant, ces propriétés redox du cuivre le rendent à la fois essentiel et toxique. En effet, l'excès de cuivre est très nocif pour les cellules vivantes induisant divers dysfonctionnements cellulaires. De ce fait, il est nécessaire aux cellules de posséder un ou plusieurs systèmes spécifiques de prise en charge du cuivre afin d'assurer le contrôle de la concentration intracellulaire du cuivre (Osman and Cavet 2008). Ces systèmes comprendraient des protéines permettant la prise en charge et le transport du cuivre vers les enzymes à cuivre (Puig and Thiele 2002) et des systèmes de régulations qui détecte la concentration en cuivre pour induire la réponse adéquate.

Par ailleurs, le cuivre ne se trouve pas à l'état libre dans la cellule. Il est soit séquestré par du glutathion (Ascone, Longo et al. 1993) soit par des chaperonnes (CopZ, Atx1,..) soit associé à des enzymes en tant que cofacteur pour assurer des multiples fonctions indispensables à la survie des cellules (Kim, Nevitt et al. 2008).

II-1.2-Toxicité du cuivre

Lorsque la concentration intracellulaire en cuivre augmente, le cuivre peut interagir de manière non spécifique avec différentes protéines. Il peut également entrer en compétition avec d'autres cofacteurs métalliques en les déplaçant de leur site de liaison (Macomber and Imlay 2009). Ceci peut être à l'origine de changements conformationnels de la protéine voire son inactivation. Le cuivre Cu(I) en anaérobie est plus toxique. Il a été montré chez *Bacillus (B.) subtilis* qu'une forte affinité pour les groupements thiolate affecte la biogenèse des clusters Fe-S (Chillappagari, Seubert et al. 2010).

Chez *E. coli*, deux déshydratases sont inactivées par les ions cuivre : la dihydroxy-acide déshydratase (IlvD) impliquée dans la voie commune de biosynthèse des acides aminés à

chaîne branchée (valine, leucine, isoleucine) et l'isopropylmalate déshydrogénase (LeuC) qui intervient dans la branche spécifique de synthèse de la leucine (Macomber and Imlay 2009). Dans ce contexte, chez *E. coli*, il existe deux voies d'assemblage du cluster fer-soufre : SUF et ISC (Py, Moreau et al. 2011). Il a été montré que le système SUF (*sufABCDSE*) est plus résistant au stress oxydatif induit par le cuivre que le système ISC (Dai and Outten 2009).

De plus, l'excès de cuivre peut également catalyser de manière indirecte la formation de radicaux libres et autres espèces activées de l'oxygène (ROS) (Keyer K, Imlay JA. 1996). En effet, le cuivre en excès déplace le Fer de son site de fixation au niveau du cluster Fe-S menant à une augmentation intracellulaire du Fer libre (Keyer K, Imlay JA. 1996). Ce dernier peut catalyser des réactions de type Fenton causant des dommages oxydatifs touchant l'ADN (Imlay and Imlay 1996).

II-2- L'homéostasie du cuivre

Afin de maintenir une concentration intracellulaire adéquate en cuivre, les cellules possèdent des systèmes d'homéostasies permettant la régulation de l'excrétion du cuivre, il s'agit de systèmes d'import, d'efflux et de stockages du cuivre.

Les protéines à cuivre sont largement répandues dans les bactéries et assurent principalement le transfert d'électrons (oxydases et transporteurs). Ces cuproprotéines sont presque exclusivement localisées dans le périplasma ou dans la membrane interne (Rensing and Grass 2003 ; Quaranta, McEvoy et al. 2009). Les oxydases à cuivre (CueO, CuiD) et les superoxydes dismutases à cuivre et à zinc (Cu, Zn-SOD) sont localisées dans le périplasma. Chez les bactéries aérobies, les cytochromes oxydases et les quinols oxydases sont situées dans la membrane cytoplasmique. Chez les bactéries anaérobies, les protéines à cuivre impliquées dans la dénitrification sont localisées dans la membrane interne. Pour le bon fonctionnement de ces enzymes à cuivre, l'acquisition du cuivre nécessaire doit être assurée soit du milieu extérieur *via* des porines, ou autre système d'import, soit du cytoplasme *via* des transporteurs de la membrane interne.

Au niveau du cytoplasme, le cuivre cytoplasmique Cu(I) est généralement complexé au glutathion ou à d'autres petites molécules permettant son transfert aux métallothionéines ou aux superoxydes dismutases (Ascone, Longo et al. 1993).

En cas d'excès de cuivre dans la cellule, un système d'efflux se met en place pour extraire le cuivre dans le milieu extracellulaire. Ces systèmes d'efflux sont largement répandus chez les bactéries et fait intervenir en général un système Cue similaire à celui d'*E. coli*. Ce système met en jeu principalement l'ATPase CopA pour transporter le cuivre du périplasma vers le milieu extracellulaire (ou périplasmique) est notamment identifié chez *P. aeruginosa* ou encore *Salmonella typhimurium* et (Espariz, Checa et al. 2007 ; Raimunda, Gonzalez-Guerrero et al. 2010).

La majorité des études concernant l'homéostasie du cuivre a été réalisée chez *E. coli*. Le système d'homéostasie du cuivre d'*E. coli* est considéré comme un modèle de référence. La partie suivante décrit les différents composants de ce système ainsi que sa régulation.

II-2.1- Système d'homéostasie du cuivre chez *Escherichia coli*

E. coli possède deux systèmes d'efflux (Cue et Cus) qui assurent l'efflux du cuivre en excès vers le milieu extracellulaire lui conférant ainsi une forte tolérance au cuivre. Les opérons qui codent pour les systèmes *Cue* et *Cus* sont portés par le chromosome. Ces deux opérons sont régulés différemment en réponse à la concentration intracellulaire du cuivre et à la disponibilité en oxygène (Rensing and Grass 2003 ; Outten, Huffman et al. 2001) (Figure 3).

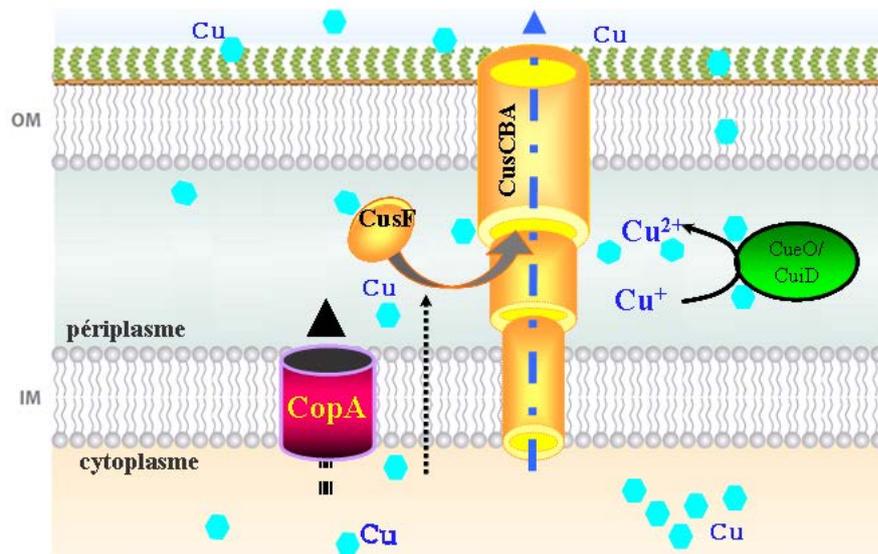


Figure 3 : Les mécanismes d'homéostasie du cuivre chez *Escherichia coli* : les systèmes Cue et Cus.

Le système Cue : CopA est une ATPase de type P qui transporte les ions Cu (I), CueO est une oxydase à cuivre périplasmique. Le système Cus est constitué de quatre sous-unités CusCFBA intervenant dans l'efflux du cuivre du périplasma vers le milieu extracellulaire.

Certaines souches d'*E. coli* présentent une tolérance plus importante au cuivre grâce à l'acquisition de nombreux gènes de résistances plasmidiques (le plasmide pRJ1004) en plus des gènes chromosomiques. En effet, la souche d'*E. coli* K12 est capable de se développer en présence de cuivre jusqu'à une concentration limite de 6 mM alors que les souches *E. coli* possédant le plasmide pRJ1004 sont capables de croître en présence de 12 à 20 mM de cuivre (Tetaz and Luke 1983).

II.2.1.1- Le système *Cue*

Le système *Cue* (pour Cu efflux) est constitué de l'ATPase CopA qui est un transporteur transmembranaire du cuivre et de l'oxydase à cuivre périplasmique CueO. Ce système est modulé par un régulateur transcriptionnel sensible au cuivre annoté CueR. Ce régulateur induit l'expression des gènes codant pour CopA et CueO en condition d'aérobie et d'excès de cuivre (induction en présence de 3 μ M de cuivre) (Outten, Huffman et al. 2001). Toutefois, il a été montré que CueO intervient dans des conditions d'aérobie alors que l'ATPase CopA est importante pour la tolérance au cuivre quelle que soient les conditions d'oxygénation (Outten, Huffman et al. 2001).

- Les transporteurs de cuivre : l'ATPase CopA

CopA est une composante centrale dans l'homéostasie du cuivre chez *E. coli*, elle est requise pour la résistance au cuivre aussi bien en aérobie qu'en anaérobie. Il a été montré que CopA transporte aussi l'argent (Ag) (Stoyanov and Brown 2003 ; Rensing, Fan et al. 2000). En présence de Cu(I) et d'Ag (I), l'expression du gène *copA* est activée par le facteur CueR (Stoyanov and Brown 2003). Les souches d'*E. coli* délétées du gène *copA* présentent une forte sensibilité au cuivre et à l'argent (Outten, Huffman et al. 2001 ; Rensing, Fan et al. 2000 ; Stoyanov and Brown 2003). Afin de protéger le cytoplasme de l'excès de cuivre, l'ATPase CopA transporte les ions de cuivre sous forme de Cu(I) du cytoplasme vers le périplasma en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. CopA appartient à la sous-famille P1B des ATPases de type P dont les caractéristiques sont présentées brièvement dans le paragraphe suivant.

i- La sous-famille des ATPases de type P1B

Les ATPases de type P1B transportant le métal sont impliquées dans l'homéostasie des métaux comme le cuivre, le zinc ou encore le cadmium...

Les gènes qui codent pour ces ATPases ont été trouvés chez les archées, les procaryotes et les eucaryotes incluant l'Homme. Cette sous-famille peut être également divisée en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe ayant pour substrat les métaux monovalents tels que le Cu (I) et du Ag(I) avec comme exemple CopA d'*E. hirae* (Solioz, Odermatt et al. 1994) et d'*E. coli* et leurs homologues, l'ATPase7A et l'ATPase7B de l'homme. Les membres de l'autre sous-groupe des ATPases de type P1B transportent les métaux bivalents tels que le zinc Zn (II), le cobalt Co(II) et le cadmium Cd (II)... (Rensing, Fan et al. 2000).

ii- La structure des ATPases de type P : exemple CopA

En commun avec les autres ATPase de type P, CopA est une protéine de la membrane interne possédant cinq domaines conservés ayant des structures et des fonctions distinctes :

- Le domaine phosphatase (TGE) est une phosphatase intégrée à la protéine qui déphosphoryle le domaine P au cours de chaque cycle catalytique de l'ATPase, il est annoté domaine A (pour actuator domain).

- Le deuxième motif est le domaine de phosphorylation (DKTGT) où a lieu la phosphorylation transitoire du résidu acide aspartique « Asp » conservé. Ce domaine P est hautement conservé et représente la signature de la famille des ATPase de type P.

- Le domaine de fixation du nucléotide (domaine N) est le motif conservé de liaison de l'ATP (GDGIN). Ce domaine lie l'ATP et sert de protéine kinase intégrée qui phosphoryle le domaine P.

- Le domaine de transport (domaine T), constitué de huit hélices transmembranaires, contient le site de fixation de l'ion transporté.

- La séquence spécifique de fixation de l'ion cuivre est le motif CPC incorporé dans la membrane au niveau de la sixième hélice transmembranaire. Ce motif est nécessaire pour la translocation de l'ion métallique à travers la membrane.

- Le domaine T est hautement flexible, ses mouvements pendant le cycle catalytique permettent l'association et la dissociation de l'ion Cu (I) (Rensing, Fan et al. 2000 ; Palmgren and Nissen 2011) (Figure 4).

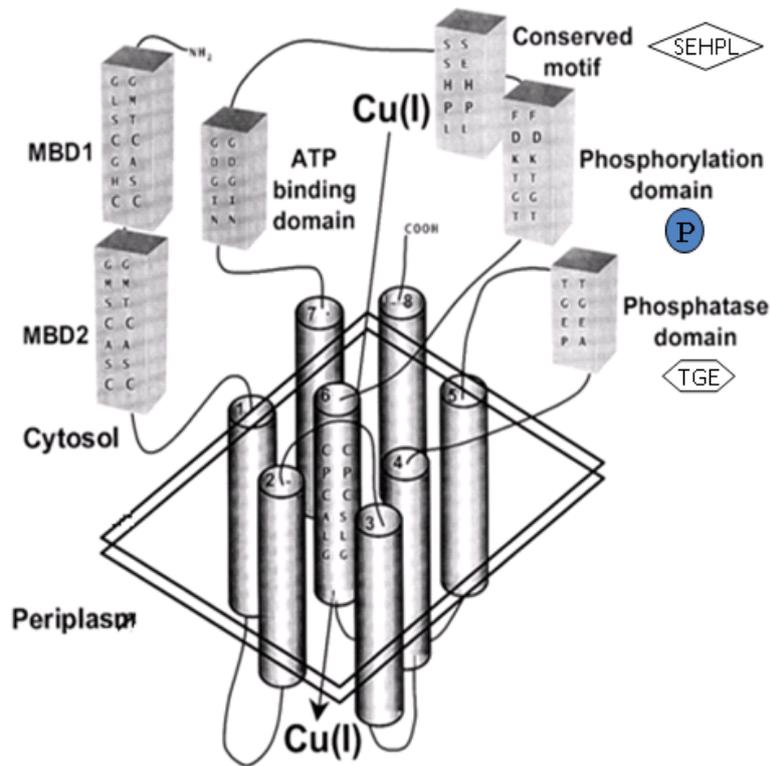


Figure 4 : Représentation schématique d'une ATPase de type P

Les domaines MBDs sont des sites de fixation du cuivre contenant le motif CXXC. Les hélices transmembranaires sont représentées par des cylindres. La 6^{ème} hélice comporte le motif CPC. Sur le schéma est représenté également les différents domaines conservés chez les ATPases de type CPX (Rensing, Fan et al. 2000).

Enfin, en N-terminal on trouve le motif CXXC appelé MBD (Metal-Binding-Domain) qui serait impliqué dans la fixation du métal. Les pompes à cuivre humaines présentent six motifs MBD contrairement à celle d'*E. coli* et d'*E. hirae* qui ne possèdent respectivement que deux et un motif MBD (Solioz, Odermatt et al. 1994). Par ailleurs, ces motifs MBD semblent ne pas être nécessaires ni pour la résistance ni pour le transport du cuivre *via* CopA (Fan and Rosen 2002) et pourraient plutôt avoir un rôle de régulateurs.

Récemment, la structure de CopA de *Legionella (L.) pneumophila* a été résolue et publiée. Les auteurs suggèrent une voie d'entrée et de sortie du cuivre et présentent la nature des résidus conservés dans les ATPases à cuivre de type P1B qui pourraient être impliqués dans ce transport (Gourdon, Liu et al. 2011). Gourdon *et al.*, montrent que les résidus conservés méthionine M148, acide glutamique E197 et acide aspartique D339 seraient probablement impliqués dans l'entrée de cuivre (Gourdon, Liu et al. 2011) (Figure 5).

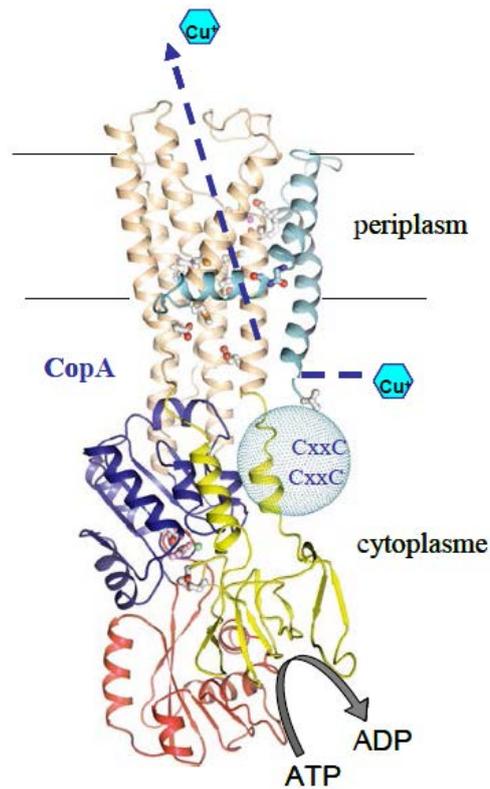


Figure 5 : Structure cristallographique de CopA de *Legionella pneumophila*

(Gourdon, Liu et al. 2011)

iii- Le mécanisme catalytique des ATPases de type P1B

Le modèle suggéré pour le transport d'ion par l'intermédiaire des ATPases de type P1B propose que le site de fixation de l'ion localisé dans la sixième hélice transmembranaire du domaine T présente une affinité alternée (faible / élevée) pour le métal. En coordonnant les changements de l'affinité et de l'accessibilité des sites de liaison de l'ion, les ions sont transportés contre le gradient de concentration. Ce changement d'affinité est associé à une transformation entre deux états E1 et E2 contrôlé par la phosphorylation. Dans la conformation E1 de la protéine, le site CPx présente une haute affinité et s'expose au compartiment cytoplasmique alors que dans la conformation E2, le même site se convertit en site de faible affinité pour l'ion en s'exposant de l'autre côté de la membrane (Arguello, Eren et al. 2007).

La fixation de l'ion au niveau de son site de liaison entraîne le réarrangement des hélices, ce changement conformationnel est transmis au domaine P. En raison de la répulsion

électrostatique due à la charge négative du phosphate γ de l'ATP, le résidu Aspartate conservé du domaine P est ainsi phosphorylé. Cette phosphorylation entraîne les mouvements coordonnés des domaines N, P, A et du domaine de transport transmembranaire T. Ainsi, la rotation du domaine A détruit la haute affinité du site de liaison de l'ion dans le domaine T et ouvre un canal de sortie pour l'ion de l'autre côté de la membrane (Figure 6) (Palmgren and Nissen 2011).

D'autre part, le mouvement du domaine A place le motif TGE (signature du domaine A) à proximité du résidu d'acide aspartique phosphorylé, afin que cet acide aminé soit déphosphorylé. Le changement conformationnel associé à la rotation du domaine A provoque une transition de la forme *E1-ATP* de la pompe à la forme *E2-P*. Quand l'ion diffuse de l'autre côté de la membrane, la pompe est déphosphorylée attendant le cycle catalytique suivant (Allen, Wu et al. 2011).

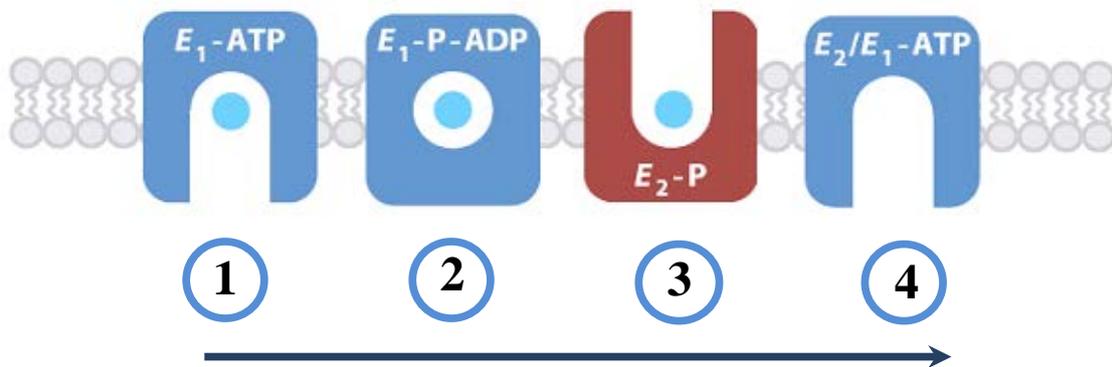


Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme de transport des ATPases de type P1B.

Les états E1 représentés en bleus, présente une haute affinité pour son ligand (Cu). La fixation du ligand (bleu-clair) stimule la phosphorylation de l'ATPase (1). Ceci entraîne un changement conformationnel de l'ATPase (2) modifiant ainsi l'affinité de l'ATPase pour son ligand. L'état E2 en marron, présente une faible affinité pour l'ion Cu ce qui conduit à une ouverture de canal de sortie de l'autre côté de la membrane (3). Les mouvements des domaines de l'ATPase entraînent ainsi sa déphosphorylation. La pompe est déphosphorylée et retourne de l'état E2 à E1-ATP attendant le cycle catalytique suivant (4). Le transport du ligand a lieu grâce à une alternance entre la forme (E1-ATP) (1) côté cytoplasmique ou la forme (E2-P) (3) du côté périplasmique. (Schéma modifié de (Palmgren and Nissen 2011)

- Multicopper oxidase CueO

Le cuivre transporté (Cu(I)) vers le périplasme *via* l'ATPase CopA est pris en charge par l'oxydase à cuivre CueO. Cette dernière oxyde le cuivre Cu(I) sous une forme moins toxique Cu(II). Le rôle de CueO est de protéger, en aérobie, le périplasme des dommages qui peuvent se produire à cause de l'excès de cuivre. Ainsi, la délétion du gène *cueO* rend les cellules mutées sensibles au cuivre en aérobie (Grass and Rensing 2001). L'expression du gène *cueO* est induite par le cuivre et régulée par le facteur transcriptionnel CueR.

Les oxydases à cuivre associent l'oxydation du substrat à la réduction d'une molécule d'oxygène en eau en utilisant une unité fonctionnelle contenant quatre atomes de cuivre (Grass and Rensing 2001 ; Singh, Roberts et al. 2011). Les oxydases à cuivre exigent la présence de l'oxygène pour assurer leur activité. En effet, aucune activité oxydase n'est détectée dans des conditions d'anaérobie (Outten, Huffman et al. 2001). CueO (54 kDa) présente une hélice riche en méthionine. Cette hélice aurait un rôle de senseur de cuivre périplasmique et fixerait en plus deux ions de cuivre afin d'approvisionner le site T1 en substrat (Cu(I)). Cette hélice aurait également un rôle pour protéger le site T1 du milieu aqueux (Roberts, Weichsel et al. 2002 ; Singh, Roberts et al. 2011). Il a été montré que CueO protège la phosphatase alcaline des dommages qui pourraient être causés par l'excès de cuivre. CueO présenterait une homologie avec les laccases et les ferroxidases (Grass and Rensing 2001). Elle possède en N-terminal un motif de translocation à deux arginines, cette séquence signal est reconnue par le système TAT qui exporte les protéines repliées ayant déjà leurs cofacteurs liés dans le périplasme (Rensing and Grass 2003).

II.2.1.2- Le système *Cus*

Le deuxième système d'efflux du cuivre est le système *cus* (pour Cu-sensing) constitué de deux opérons codant pour le système régulateur CusRS et les gènes *cusCFBA*. L'opéron *cusRS* code pour une histidine kinase CusS et un régulateur transcriptionnel CusR. Dans des conditions d'anoxygénie, le système d'efflux CusCFBA est induit par l'intermédiaire du système de transduction du signal à deux composants CusRS.

Ce système pourrait transporter le métal du cytoplasme ou périplasma vers le milieu extracellulaire. L'analyse phénotypique du double mutant *copA⁻/cusA⁻* indique qu'il n'est pas plus sensible au cuivre comparé au mutant *copA⁻*. Ces résultats indiquent que CusCFBA n'est pas une pompe alternative à CopA pour transporter des ions de cuivre à partir du cytoplasme. Néanmoins, il est possible que Cus ait un rôle mineur dans ce transport. Cependant, l'hypothèse la plus probable est que CusCFBA transfère le métal (Cu(I)) à travers la membrane externe pour protéger le compartiment périplasmique contre des dommages causés par le métal (Grass and Rensing 2001).

Des études ont montré que le système *cus* est également impliqué dans la résistance à l'argent (Franke, Grass et al. 2001).

CusCFBA présente une homologie de structure avec le système d'efflux des antibiotiques AcrAB-TolC (Zgurskaya and Nikaido 1999). Le complexe CusCBA est constitué de trois parties (Figure 7) :

- CusA est une protéine de la membrane interne formé de 12 hélices transmembranaires appartenant à la superfamille des RND (Resistance Nodulation cell Division). Elle transporte le cuivre en utilisant la force motrice des protons comme source d'énergie. Il a été montré que les méthionines de la deuxième boucle périplasmique à la position 573, 623 et 672 ainsi que l'alanine 399 sont essentielles pour le bon fonctionnement de CusA dans la résistance au cuivre (Franke, Grass et al. 2003).

- Le gène *cusB* code pour une protéine de fusion membranaire (MFP) ancrée dans la membrane interne et possédante un long domaine enjambant le périplasma. La protéine MFP sert d'adaptateur entre CusA et CusC. Des analyses par mutagenèse dirigée ont montré que les résidus Méthionines en N-terminal à la position 21, 36 et 38 sont importants pour la fixation du métal. La fixation du cuivre au niveau de ce site induit le changement conformationnel de CusB permettant l'ouverture du canal du complexe CusCBA (Kim, Nies et al. 2011).

- Enfin, CusC est un facteur de la membrane externe (OMF) formant un canal à travers l'espace périplasmique. Il présente une homologie structurale et fonctionnelle avec TolC (Koronakis, Sharff et al. 2000). L'OMF peut former une structure en tonneau β servant de pore pour le passage rapide du substrat accumulé (Paulsen, Park et al. 1997). L'inactivation

du gène *cusC* engendre une forte diminution de la résistance au cuivre (Rensing and Grass 2003).

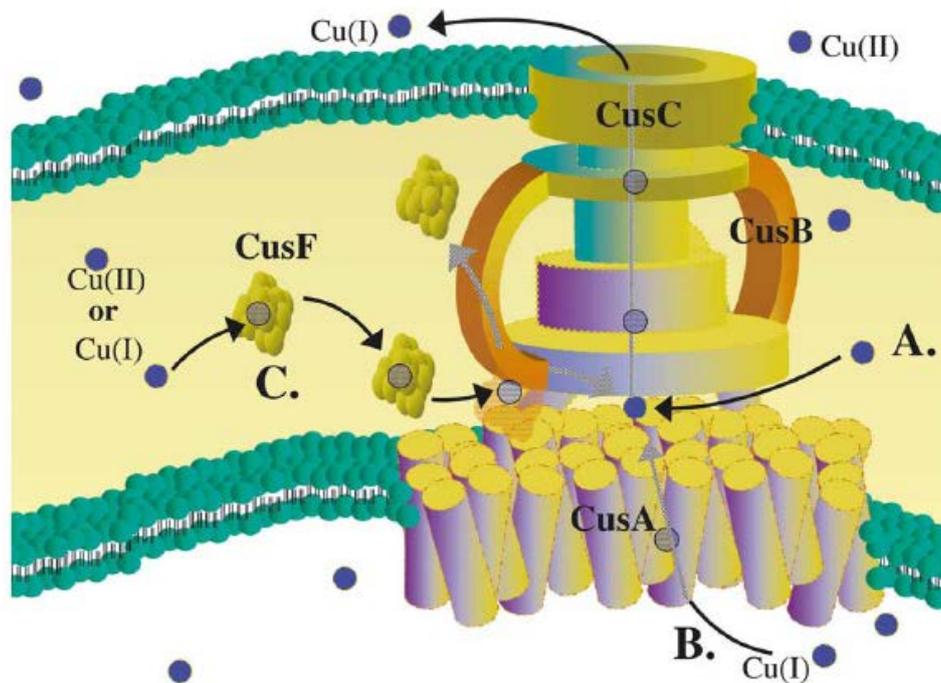


Figure 7 : Modèle fonctionnel du complexe Cus dans l'efflux du cuivre.

Le complexe Cus comprend CusA une pompe de la membrane intérieure, la protéine périplasmique CusB et la protéine de la membrane externe CusC qui forme un canal enjambant l'espace périplasmique. Le cuivre transporté par Cus pourrait provenir du périplasmique (A), du cytoplasme (B) ou par l'intermédiaire de la chaperonne à cuivre CusF pris en charge au niveau du périplasmique (C) (Rensing and Grass 2003).

Le gène *cusF* code pour une petite protéine périplasmique de 10 kDa qui fixe un ion de cuivre ou d'argent par molécule (Franke, Grass et al. 2003). Cette chaperonne à cuivre interagit avec CusB pour transférer le métal Cu(I) au complexe *cusCFBA* (Bagai, Rensing et al. 2008). Cette métallochaperonne pourrait jouer un double rôle dans la protection du périplasmique contre des dommages causés par le cuivre en séquestrant le cuivre dans l'espace périplasmique et en facilitant le retrait du cuivre de la cellule. La fixation du métal dans CusF est assurée par deux résidus méthionines aux positions 47 et 49 et un résidu histidine à la position 36 (Kittleson, Loftin et al. 2006 ; Bagai, Rensing et al. 2008). CusF présente aussi une forte affinité pour l'argent comparé au cuivre.

II-2.2- La résistance au cuivre conférée par des gènes plasmidiques.

Pendant au moins 45 ans, le sulfate de cuivre a été très utilisé dans l'alimentation des porcs comme complément alimentaire. Cette pratique a continué à être utilisée parce que les porcs présentaient un gain de poids et de croissance journalier. Une souche d'*E. coli* résistante au cuivre a été isolée à partir de l'effluent d'une porcherie où des porcs ont été alimentés par un régime complétement en cuivre. Cette forte résistance au cuivre est conférée par un plasmide conjugatif désigné pRJ1004 permettant à ces souches de se développer en présence de 12 à 20 mM de cuivre (Tetaz and Luke 1983).

Ce plasmide contient le cluster *pco* qui code pour sept gènes *pcoABCDRSE* organisés en trois opérons : *pcoABCD*, *pcoRD* et *pcoE*. La résistance conférée par l'opéron *pco* est homologue au système *copABCDRS* porté par le plasmide Ppt23D de *P. syringae* pathovar tomato (Silver and Phung 1996). Le mécanisme d'efflux du cuivre, associé au système de résistance au cuivre *pco*, nécessiterait de l'énergie. Le mécanisme de résistance gouverné par le système *pco* est illustré dans la Figure 8.

Ce système de résistance au cuivre est inductible par le cuivre. L'induction de l'opéron *pco* se fait par le biais du système PcoRS. PcoR est un activateur transcriptionnel se fixant sur l'ADN. PcoS est une histidine kinase, senseur de cuivre. La régulation par PcoRS peut être remplacée par le système CusRS (Magnani 2007).

La protéine centrale de ce système est la protéine PcoA (66 kDa) qui est une oxydase à cuivre similaire à CueO. PcoA par analogie à CueO oxyderait les ions Cu(I) en Cu(II) moins toxiques et/ou oxyderait les sidérophores de catéchol comme l'entérobactine qui peut séquestrer le cuivre. De plus, PcoA comme CueO possède un motif à deux arginines dans sa séquence « leader » et est probablement transloquée vers le périplasme par le système TAT à travers la membrane interne.

La protéine PcoB (33 kDa) est prédite comme une protéine de la membrane externe. Elle permettrait la séquestration du cuivre CuII et agirait avec PcoA pour conférer une plus grande résistance au métal.

PcoC est une protéine périplasmique de 12 kDa et fixerait un ion de cuivre Cu(I) ou Cu(II) par molécule. La protéine PcoC semble délivrer le cuivre périplasmique à la protéine

PcoD (34 kDa) de la membrane interne pour le passer dans le cytoplasme, probablement pour le charger sur PcoA (Figure 8).

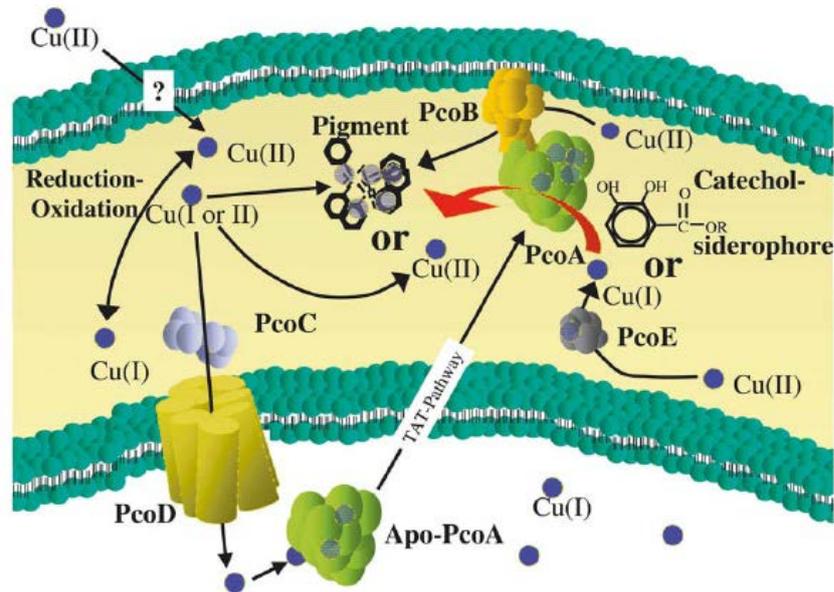


Figure 8 : Mécanisme de détoxification du cuivre assuré par les protéines Pco.

La fonction prédite de la protéine PcoB de la membrane externe serait de séquestrer le cuivre Cu(II). La détoxification du cuivre pourrait se faire au niveau du périplasma soit par sa séquestration *via* les sidérophores de catéchol soit par l'oxydation du Cu (I) sous une forme moins toxique Cu(II) par l'oxydase PcoA. Afin de charger le cuivre dans les sites catalytiques de PcoA, le cuivre doit être transporté à travers la membrane cytoplasmique par PcoC qui livre le cuivre à PcoD. PcoE lie le cuivre Cu (I) au niveau du périplasma et le transporte probablement à PcoA (Rensing and Grass 2003).

Le dernier gène code pour PcoE qui est requis pour conférer une résistance totale au métal. PcoE fonctionne comme une chaperonne à cuivre périplasmique. Le gène *pcoE* possède son propre promoteur. L'expression de *pcoE* est régulée par le cuivre et par le système à double composants PcoRS et CusRS (Rensing and Grass 2003).

Il est à noter que *C. metallidurans* CH34 possède également le plasmide pMOL30 portant de nombreux gènes de résistance au cuivre.

II-3- Les systèmes de régulation de l'homéostasie du cuivre : CueR et CusRS

Chez *E. coli*, la régulation des systèmes d'homéostasie du cuivre Cue et Cus est respectivement sous le contrôle de CueR, régulateur de type MerR et d'un système à double composants CusRS.

II-3.1- Le régulateur type MerR : CueR

En effet, en présence de concentration élevée en cuivre, CueR active la transcription de *copA* et de *cueO* (Outten, Outten et al. 2000). Le régulateur transcriptionnel CueR appartient à la famille des MerR. C'est un groupe d'activateurs transcriptionnels présentant en N-terminal un motif hélice-tour-hélice permettant la fixation à l'ADN et en C-terminal, un site spécifique de fixation de l'effecteur (métal). La majorité des régulateurs de cette famille répond à un stimulus environnemental tel que le stress oxydatif, les ions métalliques ou les antibiotiques (Brown, Stoyanov et al. 2003). Les promoteurs cibles activés par la protéine de la famille MerR présentent dans la région localisée entre les sites -10 et -35 des séquences répétées inversées. Dans le cas de CueR, l'espace entre les sites -10 et -35 est de 19 pb contenant deux séquences répétées inversées séparées par 7 pb ACCTTCCNNNNNNNGGAAGGT (Outten, Outten et al. 2000 ; Stoyanov, Hobman et al. 2001).

Le régulateur CueR est un senseur cytoplasmique du cuivre, de l'argent et de l'or (Stoyanov and Brown 2003). Des études ont montré que les cystéines à la position 112 et 120 sont impliquées dans la reconnaissance et la fixation de ces trois métaux (Stoyanov and Brown 2003). En effet, les études de la réponse du promoteur *copA* aux ions métalliques Cu(I), Ag(I) et Au(I) par fusion avec le gène rapporteur *lacZ* montrent une réponse maximale après l'addition de 50 µM de CuSO₄, 2.5 µM d'AgNO₃, ou 25 µM d'AuCl₃ (Stoyanov, Hobman et al. 2001 ; Stoyanov and Brown 2003).

II-3.2- Le système à double composants de transduction du signal CusRS

Dans des conditions d'anaérobiose et d'excès de cuivre, le système à double composants CusRS induit l'activation de l'expression du système CusCFBA. La protéine CusS est une kinase liée à la membrane, senseur de la concentration du cuivre périplasmique. En présence de concentration élevée en métal, CusS s'autophosphoryle au niveau du résidu histidine. CusS phosphoryle le régulateur CusR au niveau du résidu aspartate. Par conséquent, CusR se fixe sur l'ADN au niveau de la « CusR box » qui est une séquence répétée inversée AAAATGACAANNNTTGCATTTT (Magnani 2007). Cette séquence est retrouvée uniquement entre les opérons divergents *cusRS* et *cusCFBA*. Le système Cus peut également être induit par l'argent et même par l'or (Franke, Grass et al. 2001).

En fonction de la concentration environnementale en oxygène, *E.coli* met en place le système d'efflux du cuivre adéquat Cue ou Cus (Rensing and Grass 2003 ; Outten, Huffman et al. 2001). En aérobie, *E. coli* fait intervenir le système Cue alors qu'en anaérobie, elle met en jeu le système Cus. D'ailleurs, dans un mutant *cusR*⁻, l'expression des gènes *cusC*, *cusF* et *cusB* n'est pas induite. Ce mutant *cusR*⁻ présente une résistance au cuivre similaire au sauvage en aérobie grâce à la présence du système Cue (Grass and Rensing 2001). Cependant, en anaérobie, le mutant *cusR*⁻ présente une forte sensibilité au cuivre (Outten, Huffman et al. 2001)

II-4- L'homéostasie du cuivre chez d'autres organismes

II-4.1 Chez la cyanobactérie : *Synechocystis* PCC6803

Contrairement à *E. coli*, le système d'acquisition du cuivre n'est pas complètement élucidé chez *Synechocystis* PCC6803. Ce système ferait intervenir probablement une protéine périplasmique encore inconnue jusqu'à présent et une ATPase de type P1B CtaA. En effet, chez *Synechocystis* PCC6803, il a été observé qu'un mutant FutA2⁻ présentait une faible activité de la cytochrome oxydase *caa₃* et accumulait le cytochrome *c₆* pour le transport d'électrons en raison d'un défaut d'approvisionnement de la plastocyanine en cuivre (Waldron, Tottey et al. 2007). Ce phénotype suggérait que la protéine FutA2, impliquée dans l'import du fer (Kato, Hagino et al. 2001), pourrait également transporter le cuivre. Cependant cette étude écarte cette hypothèse et montre que le phénotype observé serait lié à un effet indirect du fer sur le contenu en cuivre du mutant FutA2.

Quant à l'ATPase CtaA localisée dans la membrane interne, elle serait impliquée dans le transport du cuivre du périplasma vers le cytoplasme. La délétion du gène *ctaA* chez *Synechocystis* PCC 6803 n'engendre pas un changement dans la tolérance au cuivre mais réduit la quantité de cuivre accumulé dans la cellule (Tottey, Rich et al. 2001). La délétion du gène homologue à CtaA chez *Synechococcus* PCC7942 entraîne une légère augmentation de la résistance au cuivre. De plus, en cohérence avec un rôle de CtaA dans l'import du cuivre, un mutant *ctaA*⁻ de *Synechocystis* PCC6803 présente une faible activité de la cytochrome oxydase *caa₃* dans les membranes purifiées et une altération du transport d'électrons dans la chaîne photosynthétique *via* la plastocyanine (Tottey, Rich et al. 2001) (Figure 9). L'ensemble des résultats obtenus chez *Synechocystis* PCC6803 et PCC7942 a permis de conclure que

CtaA est impliqué dans l'import du cuivre dans le cytoplasme puis le thylacoïde (Phung, Ajlani et al. 1994).

Synechocystis possède une chaperonne à cuivre (Atx1) qui interagirait avec le domaine MBD en N-terminal de CtaA pour acquérir le cuivre. Atx1 transporte alors le cuivre à une deuxième ATPase type P, PacS, localisée dans la membrane du thylacoïdale (Tottey, Rich et al. 2001). PacS joue un rôle dans la résistance au cuivre et dans l'approvisionnement des protéines en cuivre (Tottey, Harvie et al. 2005).

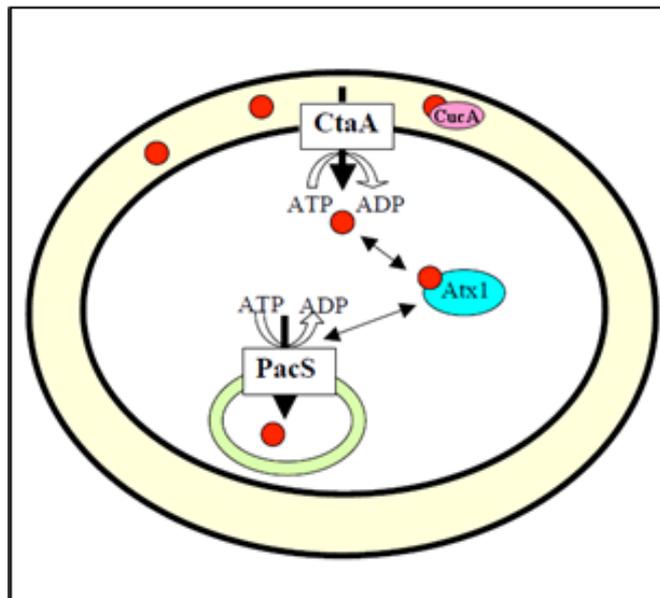


Figure 9 : Le système d'homéostasie du cuivre chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803.

Le cuivre est transporté aux membranes thylacoïdales par l'action de deux ATPases de type P1B : CtaA et PacS, et par la chaperonne à cuivre Atx1. Atx1 est supposé acquérir le cuivre de l'importateur CtaA au niveau de la membrane cytoplasmique pour le donner à PacS qui l'exporte dans les thylakoïdes. La chaperonne périplasmique CucA est impliquée dans la protection de ce compartiment contre la toxicité du cuivre en le séquestrant.

Récemment, une protéine périplasmique CucA fixant un ion de cuivre par molécule a été identifiée chez *Synechocystis* (Tottey, Waldron et al. 2008). La protéine CucA est exportée au périplasma sous forme d'apoprotéine pour acquérir le cuivre. La structure de CucA a été dernièrement publiée par Waldron (Waldron, Firbank et al. 2010). La fixation de l'ion cuivre Cu^{2+} se fait par l'intermédiaire de trois résidus histidine aux positions 88, 90 et 149 et un résidu glutamate à la position 95. Les deux transporteurs CtaA et PacS et la

métallochaperonne Atx1 sont nécessaires pour fournir le cuivre à CucA. Cependant, l'expression du gène *cucA* n'est pas altérée dans les mutants *pacS*⁻, *ctaA*⁻ et *atxI*⁻. Le rôle suggéré pour CucA serait de protéger le périplasme des dégâts éventuels causés par le cuivre libre (Waldron, Firbank et al. 2010).

II-4.2- Chez les bactéries Gram positive : *Enterococcus hirae*

E. hirae est l'une des premières bactéries Gram⁺ à être étudiée pour sa tolérance élevée au cuivre. La découverte des deux ATPases à cuivre d'*E. hirae* a eu lieu en 1992. *E. hirae* possède l'opéron *cop* qui régule l'acquisition, la disponibilité et l'export du cuivre. Il contient quatre gènes qui codent pour un répresseur CopY, une chaperonne à cuivre CopZ et deux ATPases de type Cpx : CopA et CopB (Solioz and Stoyanov 2003 ; Solioz, Abicht et al. 2010). Cet opéron permet à la souche sauvage d'*E. hirae* de pousser jusqu'à une condition limite de cuivre de 8 mM (Figure10). L'ATPase CopA sert pour l'acquisition du cuivre du milieu extracellulaire. En effet, la souche *copA*⁻ présente une résistance au cuivre et à l'argent plus importante comparée à la souche sauvage. Cependant, Raimunda et Argüello ont montré récemment que CopA pourrait également assurer l'efflux du cuivre vers le milieu extracellulaire (Raimunda, Gonzalez-Guerrero et al. 2010). En effet, ils ont observé que CopA d'*E. hirae* exprimée dans le mutant *copA*⁻ d'*E. coli* restaure le phénotype de la tolérance au cuivre dans cette souche (Arguello, Gonzalez-Guerrero et al. 2011)

En présence d'excès de cuivre, l'ATPase CopB intervient pour extraire vers le milieu extracellulaire le cuivre en excès. CopB n'a pas de domaine MBD (CxxC) en N-terminal contrairement à CopA mais présente une séquence riche en histidine qui constituerait un site de fixation du cuivre. Un mutant *copB*⁻ présente une hypersensibilité au cuivre.

L'expression de ces ATPases est sous la régulation du même système CopY/CopZ (Solioz, Odermatt et al. 1994 ; Magnani 2007). CopY (145 acides aminés) est un répresseur transcriptionnel identifié seulement dans les bactéries Gram-positif. En effet, un mutant *copY* présente une surexpression constitutive de *copA* et *copB* (Solioz, Odermatt et al. 1994). La structure de CopY comporte deux parties, l'extrémité N-terminal est le site de fixation à l'ADN. L'extrémité C-terminal de CopY présente un motif consensus CxCx_{4,5}CxC qui peut fixer soit un ion Zn²⁺ soit deux ions Cu⁺.

La chaperonne CopZ (8 kDa) présente en N-terminal une homologie avec la chaperonne Atx1 et les ATPases CopA et CopB. CopZ possède un site de liaison du cuivre CxxC exposé au solvant facilitant ainsi la réception et le transfert du cuivre. La chaperonne livre le cuivre aux cuproprotéines *via* une interaction protéine-protéine. Ainsi, en présence du cuivre, CopZ interagit avec le motif MBD de CopA, une fois chargée en cuivre, CopZ-Cu⁺ agit comme un anti-répresseur de CopY pour activer l'opéron *cop* (Solioz and Stoyanov 2003).

En présence d'une concentration environnante faible en cuivre, CopY est sous la forme d'homodimère contenant du Zn(II) fixé dans la région promotrice de l'opéron *cop*. Le dimère de CopY se fixe au niveau de deux séquences répétées inversées de 27 et 28 pb appelées *cop* box (TACNNNTGTA) identifiées dans la région promotrice entre -70 et -11. Quand le taux de cuivre dans le milieu augmente, la chaperonne CopZ-Cu⁺ donne l'ion Cu(I) à CopY. Ceci déplace le Zn(II) lié et CopY est libéré de l'ADN permettant à la transcription de se faire. En conséquence, un mutant *copZ* présente une diminution de l'expression de *copA* et *copB* et une hypersensibilité au cuivre, les cellules cessent de croître au bout d'une heure après l'addition de 750 µM de CuSO₄ (Solioz, Odermatt et al. 1994).

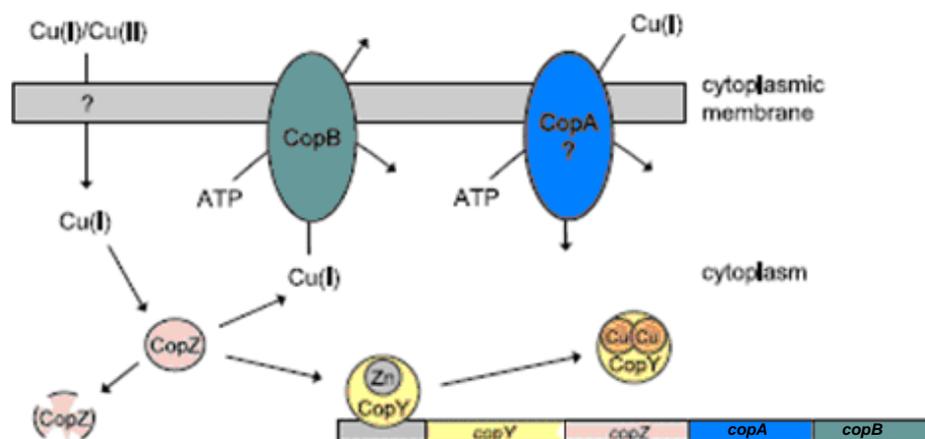


Figure 10 : Modèle d'homéostasie du cuivre chez *E. hirae*

L'ATPase de type PIB CopA importe le cuivre. À l'intérieur de la cellule, le cuivre est conduit au répresseur CopY par la chaperonne à cuivre CopZ entraînant ainsi la libération du promoteur et permettant de ce fait l'expression des gènes. Dans le cas de cuivre excédentaire, CopZ délivre le cuivre à l'ATPase CopB qui assure son efflux dans le milieu extracellulaire (Magnani 2007).

En présence d'excès de cuivre, CopZ transporterait le cuivre à CopB pour l'excréter dans le milieu extracellulaire. Cependant, l'expression de CopZ augmente avec la

concentration de cuivre jusqu'à 0.5 mM de CuSO₄ mais à forte concentration de cuivre elle devient indétectable. Ceci suggère que l'expression élevée de CopZ est toxique pour la cellule, ce serait dû au fait que le cuivre lié par CopZ est exposé au solvant. Le cuivre ainsi exposé peut participer à des réactions de type Fenton et mener à la production de radicaux hydroxyls réactifs et à des dommages cellulaires. Afin d'éviter cet effet toxique l'expression de CopZ est régulé par un mécanisme de protéolyse induit par le cuivre (Lu and Solioz 2001 ; Solioz and Stoyanov 2003 ; Magnani 2007)

II-4.3- Chez les plantes supérieures : *Arabidopsis thaliana*

Au sein des cellules de plante, le cuivre est requis dans six compartiments différents : le cytosol, le réticulum endoplasmique (RE), la membrane interne des mitochondries, le stroma du chloroplaste, la lumière du thylakoïde et l'apoplasme. Pour permettre la croissance et le développement optimal de la plante, l'approvisionnement en cuivre de chacun de ces compartiments est essentiel (Pilon, Abdel-Ghany et al. 2006 ; Palmer and Guerinot 2009).

L'entrée du cuivre dans le cytosol se fait probablement *via* un transporteur de la famille des « Copper Transporter Protein » appelé COPT. Les transporteurs COPT appartiennent à une famille des transporteurs de cuivre répandue chez les eucaryotes les 'Ctr' pour « Copper transporters ». Cette famille de transporteurs « Ctr » est caractérisée par la présence de trois domaines transmembranaires. Le deuxième fragment transmembranaire renferme un motif MxxxM qui serait essentiel pour l'acquisition du cuivre. Le troisième domaine transmembranaire contient un motif GxxxG important pour la trimérisation (Grotz and Guerinot 2006). Le N-terminal localisé dans l'espace extracellulaire, présente un motif riche en méthionine nécessaire pour la fixation du cuivre. Les protéines CTR n'utilisent pas l'ATP pour l'import du cuivre mais leur capacité de transport est stimulée par la concentration extracellulaire du potassium K⁺ (Puig, Andres-Colas et al. 2007).

Chez *Arabidopsis*, il existe cinq membres putatifs de cette famille (COPT1-5). Le mieux caractérisé est COPT1, qui a été isolé par un crible de complémentation fonctionnelle réalisée chez des cellules de levures déficientes dans l'import du cuivre. COPT2 permettrait également l'entrée du cuivre (Sancenon, Puig et al. 2003). La protéine COPT1 est impliquée dans l'acquisition du cuivre au cours de l'élongation de la racine et dans le développement du

pollen. En réponse à un excès de cuivre, l'expression de *copt1* et *copt2* est réprimée (Sancenon, Puig et al. 2004).

On trouve également deux transporteurs ZIP2 et ZIP4 appartenant à la famille ZIP (Zinc-regulated transporter, Iron regulated transporter-like Protein) qui semblent être aussi des voies d'entrée du cuivre. Cette famille de transporteur est connue pour transporter préférentiellement les cations bivalents ce qui suggère que les protéines ZIP2 et ZIP4 transporteraient le cuivre sous forme de Cu^{2+} . Ces deux transporteurs sont capables de compléter des défauts de croissance de mutants de levure déficients pour le transport du Zinc ou du Cuivre. En outre, l'expression des deux gènes ZIP2 et ZIP4 sont induits chez *Arabidopsis* dans des conditions de déficience en Zn et Cu (Wintz, Fox et al. 2003).

Une fois dans la cellule, le cuivre doit être distribué au niveau subcellulaire de différents compartiments (chloroplastes, mitochondries, réticulum endoplasmique...). Dans ce cadre, les cellules mettent en place divers transporteurs et chaperonnes. *Arabidopsis* possède des ATPases de type CPx connues également sous le nom de HMA (Heavy Metal P-type ATPase). RAN1 (Responsive-to-ANTagonist1, annotée aussi HMA7) est une ATPase similaire à celles de l'homme (l'ATP7A et l'ATP7B). La localisation de HMA7 est prédite au niveau du réticulum endoplasmique afin de délivrer le cuivre au récepteur éthylène (ETR1) et probablement à d'autres cuproprotéines de la voie de sécrétion (Colangelo and Guerinot 2006).

Contrairement à HMA7, HMA5 aurait un rôle de détoxification du cuivre au niveau des racines. Cependant, il n'est pas clair si HMA5 transporte le cuivre hors de la cellule ou dans des organelles pour sa séquestration. Par ailleurs, un mutant *hma5⁻* est sensible à des concentrations élevées en cuivre. Des études d'interaction directe par l'approche de double-hybride effectuées chez la levure indiquent que HMA5 interagit avec deux chaperonnes à cuivre ATX1 (Anti-oxidant) et CCH (Copper CHaperone) qui seraient aussi impliquées dans l'homéostasie de cuivre (Puig, Andres-Colas et al. 2007 ; Palmer and Guerinot 2009).

Le transport du cuivre dans les chloroplastes dépend également de protéines de la famille HMA : HMA6 (ou PAA1 pour P-type ATPase of *Arabidopsis*) et HMA8 (PAA2). PAA1 et PAA2 sont les homologues fonctionnels des ATPases à cuivre des cyanobactéries CtaA et PacS. Ces gènes *paal* et *paal2* ont été isolés dans un crible de mutants présentant un phénotype de fluorescence élevée de la chlorophylle, conséquence d'activité réduite du

transport d'électrons au niveau de la chaîne photosynthétique. Des expériences de fusion avec la GFP indiquent que PAA1 est localisée à la périphérie du chloroplaste alors que PAA2 est située dans la membrane du thylacoïdale (Abdel-Ghany, Muller-Moule et al. 2005). L'analyse des mutants *paal1*⁻ et *paa2*⁻ montrent que ces transporteurs sont requis pour délivrer le cuivre à la plastocyanine au niveau du thylakoïde. La distribution du cuivre dans le stroma du chloroplaste est inhibée dans le mutant *paal1*⁻ mais pas dans le mutant *paa2*⁻. De plus, le transport du cuivre au niveau du chloroplaste n'est pas complètement aboli dans le double mutant *paal1*⁻ *paa2*⁻ ce qui suggérerait l'existence d'un autre transporteur, il pourrait s'agir de HMA1.

En effet, l'ATPase HMA1 est localisée dans l'enveloppe chloroplastique. L'analyse du mutant *hma1*⁻ montre une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) avec une sensibilité élevée à la lumière qui sont liés à une faible accumulation du cuivre dans le chloroplaste (Abdel-Ghany, Muller-Moule et al. 2005). Chez *Arabidopsis*, des métallochaperonnes ont été identifiées comme étant impliquées dans la fixation et la livraison du cuivre aux cuproprotéines. La première chaperonne à avoir été identifiée est la CCH (Copper CHaperone) qui présente une homologie avec la chaperonne ATX1p de la levure.

Cependant, CCH présente un domaine C-terminal présent exclusivement chez les plantes ayant des caractéristiques structurelles spéciales. Ce domaine C-terminal aurait un rôle de régulation. CCH joue un rôle dans le recyclage du cuivre à partir des feuilles en sénescence vers des organes en croissance (Mira, Vilar et al. 2001 ; Himelblau, Mira et al. 1998). Le génome d'*Arabidopsis* contient un seul gène qui présente une homologie significative avec la chaperonne CCS qui transfère le cuivre aux trois isoformes de Cu/Zn SOD : cytosolique (CSD1), chloroplastique (CSD2) et péroxysomique (CSD3). En effet, le mutant *ccs*⁻ montre une diminution de l'activité de ces trois Cu/ZnSOD.

Enfin, chez *Arabidopsis* la chaperonne Cox19p homologue à Cox17 de la levure est impliquée dans le trafic du cuivre vers la cytochrome *c* oxydase au niveau de la mitochondrie (Attallah, Welchen et al. 2007). Chez la plante, les gènes sont régulés selon la disponibilité en cuivre. Dans des conditions de déficience en cuivre, l'expression de la Cu/ZnSOD chloroplastique est réprimée en faveur de l'activation de l'expression de la FeSOD. Quand le cuivre est rare dans le milieu, cette substitution coordonnée des superoxydes dismutases permet à la plante d'économiser du cuivre pour donner la priorité à la livraison du cuivre aux plastocyanines chloroplastiques (Puig, Andres-Colas et al. 2007). Cette régulation se ferait par

l'intermédiaire d'un micro-ARN, le *miR398* en réponse au changement du niveau de cuivre (0.2 - 0.5 μM). Ce micro-ARN intervient quand la concentration en cuivre est limitée afin de promouvoir la dégradation de l'ARNm de la Cu/ZnSOD (Yamasaki, Abdel-Ghany et al. 2007). Ceci permet de favoriser l'insertion du cuivre dans des protéines importantes pour le développement de la plante comme la plastocyanine (Yamasaki, Abdel-Ghany et al. 2007).

Arabidopsis possède deux gènes qui codent pour deux isoformes de la plastocyanine (PETE1 et PETE2). La présence de ces deux isoformes semble être un mécanisme d'adaptation en fonction de la concentration du cuivre disponible dans le milieu. Dans des conditions de déficience en cuivre, seul *petE1* est exprimé, la régulation par le *miR398* permet de fournir le cuivre nécessaire pour la mise en place de la plastocyanine PETE1.

En présence d'excès de cuivre, PETE2 est fortement exprimée afin d'assurer le transport d'électrons au niveau de la chaîne photosynthétique mais elle aurait également une fonction dans l'homéostasie du cuivre (Abdel-Ghany 2009). En effet, PETE2 est très abondante dans ces conditions et fixerait alors le cuivre protégeant ainsi le chloroplaste contre le cuivre excédentaire (Abdel-Ghany 2009).

II-4.4- Chez les algues vertes : *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas (C.) reinhardtii a longtemps servi comme modèle pour étudier l'adaptation des métabolismes à une déficience en cuivre. Les principales protéines à cuivre dans cet organisme sont la plastocyanine et la cytochrome oxydase qui fonctionnent respectivement dans la photosynthèse au niveau du chloroplaste et dans la respiration au niveau de la mitochondrie. Chez *C. reinhardtii*, le même système d'import du cuivre semble être impliqué aussi bien dans des conditions d'excès en cuivre que dans des conditions de déficience en cuivre.

Le génome de *C. reinhardtii* comporte quatre gènes qui coderaient pour des transporteurs de cuivre de la famille des CTR : CTR1, CTR2, CTR3 et COPT1 (homologue à celle des plantes) (Page, Kropat et al. 2009). Ces transporteurs possèdent les motifs et les structures caractéristiques de la famille des CTR mais ils présentent en N-terminal un nouveau motif de liaison du métal Cys-Met (CxxMxxMxxC-x_{5/6}-C) qui augmenterait vraisemblablement la capacité de chélation et donc l'affinité au cuivre (Hill, Hassett et al. 1996). Les transporteurs CTR1 et CTR2 sont localisés au niveau de la membrane plasmique et ils représentent les perméases majeures d'assimilation du cuivre chez *Chlamydomonas*. La

protéine CTR3 présente une duplication partielle de CTR2, CTR3 serait une protéine soluble et aurait un rôle de chaperonne à cuivre périplasmique qui délivrerait le cuivre de CTR1 à CTR2 (Blaby-Haas and Merchant 2012). Dans des conditions de déficience en cuivre, l'expression de ces transporteurs CTR est induite par le facteur transcriptionnel CRR1 (Page, Kropat et al. 2009 ; Sommer, Kropat et al. 2010). Par ailleurs, pour maintenir ses compétences photosynthétiques lorsque le cuivre se fait rare dans le milieu, *Chlamydomonas* dégrade la plastocyanine et la substitue par le cytochrome c_6 qui contient de l'hème comme cofacteur (CYC6C) (Hill and Merchant 1995). En effet, dans les cellules déficientes en cuivre, les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des tétrapyrrolles (hèmes): la coproporphyrine III oxydase (CPXI) et la Mg protoporphyrine IX monométhylester cyclase (CRDI) sont également induites (Jamers, Van der Ven et al. 2006), (Page, Kropat et al. 2009). L'expression des gènes qui codent pour l'ensemble de ces protéines semblent être modulée par le même facteur transcriptionnel CRR1. CRR1 se fixe sur le domaine CuRE (Copper-Response Element) localisé en 5' des gènes cibles. CuRE contient une séquence cruciale GTAC reconnue par le domaine de fixation à l'ADN de CRR1 (Kropat, Tottey et al. 2005 ; Page, Kropat et al. 2009 ; Sommer, Kropat et al. 2010).

Des analyses de microarrays montrent que divers gènes impliqués dans plusieurs voies métaboliques sont induits ou réprimés selon la disponibilité en cuivre. En effet, la déficience en cuivre induit l'expression des gènes codant pour des désaturases des acides gras entraînant ainsi une modification de la composition de la membrane lipidique du chloroplaste (Castruita, Casero et al. 2011). Récemment, la protéase RSEP1 localisée au niveau de la membrane du thylakoïde a été identifiée comme fortement induite en absence de cuivre. Dans ces conditions de déficience en cuivre, RSEP1 semblerait être la principale candidate impliquée dans la dégradation de la plastocyanine (Castruita, Casero et al. 2011). Une chaperonne à cuivre PCC1 (Plastid Copper Chaperone) a été également identifiée. Cette chaperonne serait réprimée en absence de cuivre. Il est également prédit dans le génome de *Chlamydomonas*, l'existence de quatre gènes qui coderaient pour des ATPases de type P, CTP1, CTP2 (fonction homologue à PAA1), CTP3 (homologue au transporteur HMA5 des plantes), CTP4 (fonction homologue à PAA2) et de deux gènes qui coderaient pour deux chaperonnes présentant une similarité Atx1 et PCC1 (Blaby-Haas and Merchant 2012).

II-4.5- L'homéostasie du cuivre chez l'homme et ses dysfonctionnements

Chez l'homme, l'import du cuivre dans la cellule se fait par l'intermédiaire de la protéine membranaire Ctr1. Le transport intra et extra cellulaire du cuivre fait intervenir les ATP7A et ATP7B. L'ATP7A est présente dans toutes les cellules excepté le foie, elle assure la distribution du cuivre dans le corps. Contrairement à l'ATP7A, l'ATP7B est exprimée principalement dans les cellules du foie (Figure 11A). Elle joue un rôle dans la régulation de la concentration intracellulaire de ce métal et dans son excrétion dans la bile. Le cuivre est transféré à ces ATPases par la chaperonnes Atox1 (Figure 11B). D'autres chaperonnes à cuivre sont également identifiées telles que les chaperonnes à cuivre Cox17, Sco1 et Cox11 impliquées dans l'incorporation du cuivre au sein de la cytochrome oxydase au niveau de la membrane interne mitochondriale (Figure 11C) (Kim, Nevitt et al. 2008).

De ce fait, une distribution adéquate dans l'organisme est indispensable. Une altération du système de transport du cuivre est responsable de maladies sévères chez l'homme. En effet, le dysfonctionnement de l'ATP7A est responsable du syndrome de Menkes. Cette maladie génère un défaut de transport du cuivre entraînant un dérèglement de nombreux cuproprotéines. Ceci se manifeste principalement par une neurodégénérescence, un retard de développement, des anomalies du tissu conjonctif, une hypothermie et la déminéralisation du squelette. Cette maladie est incurable et en général les patients décèdent dans les premières années de la vie (Cox and Moore 2002).

Par ailleurs, chez l'homme la maladie de Wilson engendre l'accumulation du cuivre particulièrement au niveau du foie. C'est une anomalie congénitale causée par des mutations génétiques touchant l'ATP7B. La fonctionnalité altérée de cette ATPase se caractérise par un défaut d'excrétion du cuivre par la bile couplé à une augmentation du cuivre dans l'urine. Le deuxième défaut est l'absence d'incorporation du cuivre à la ceruloplasmine. Cette maladie génétique touche 1 sur 30 000 individus et se manifeste par divers symptômes hépatiques, neurologiques et psychiques (Cox and Moore 2002 ; Mercer and Llanos 2003)

De plus, le cuivre joue un rôle important dans l'immunité innée chez l'homme. En effet, les macrophages utilisent le cuivre en combinaison avec la production des espèces réactives d'oxygène et d'oxyde nitrique pour tuer les agents infectieux tels que les microbes. De ce fait, les agents pathogènes ont dû trouver des stratégies efficaces de résistance au cuivre afin d'assurer leur survie (Dupont, Grass et al. 2011).

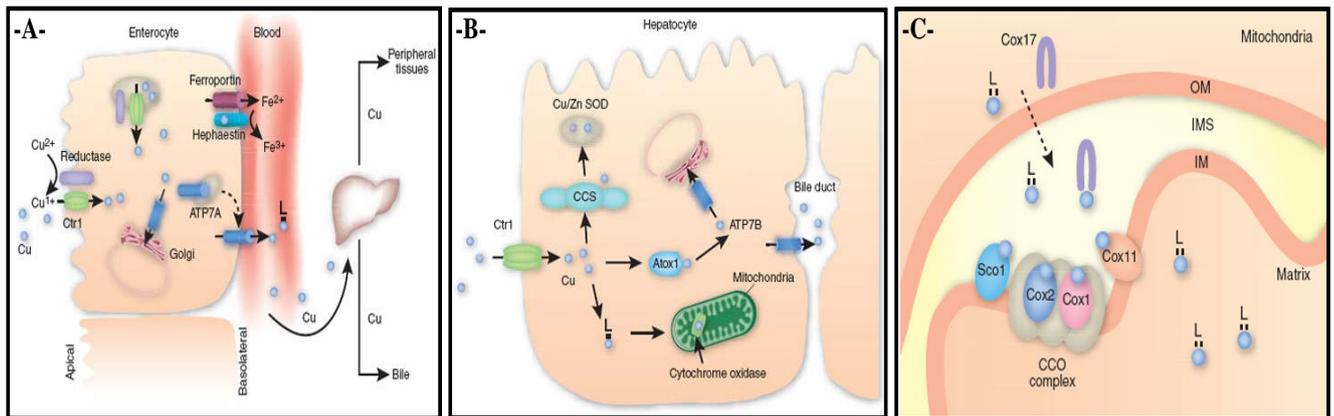


Figure 11 : Transport du cuivre dans les différentes cellules eucaryotes.

- **A** - Modèle d'absorption et de distribution du cuivre au niveau des entérocytes d'après (Kim, Nevitt et al. 2008). Le transporteur du cuivre $Ctr1$ est localisé dans la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin et dans les membranes des vésicules intracellulaires. $Ctr1$ transporte le cuivre sous sa forme réduite $Cu(I)$, la réduction du $Cu(II)$ en $Cu(I)$ ferait intervenir des métalloréductases membranaires putatives. Le cuivre est ainsi soit acheminé *via* la chaperonne $Atx1$ (non représentée) vers un transporteur de cuivre de l'appareil de Golgi l' $ATP7A$ afin d'être intégré aux protéines qui le requièrent ; soit transporté vers la circulation sanguine à travers la membrane basolatérale de l'entérocyte par l' $ATP7A$. Des ligands (L) sanguins du cuivre (inconnus) transportent ainsi le cuivre vers le foie. Le cuivre est alors distribué vers les tissus périphériques par l'intermédiaire de la circulation systémique. Le Cu excédentaire est excrété dans la bile. La ferroportine est une ferroxidase à cuivre qui acquiert son cuivre au niveau de l'appareil de Golgi. Elle est essentielle pour le transport de haute affinité du fer vers la circulation sanguine. - **B** - Modèle d'import et de trafic du Cu dans les hépatocytes. L'import du Cu se fait par l'intermédiaire de $Ctr1$ au niveau de la membrane plasmique. Le cuivre est adressé soit au superoxyde dismutase Cu/Zn SOD1 par la chaperonne CCS soit à l' $ATP7B$ de l'appareil de Golgi, ou vers l' $ATP7B$ au niveau de la membrane canaliculaire de bile par la chaperonne $Atx1$. Le cuivre est également acheminé vers les mitochondries pour fournir le cuivre aux oxydases terminales de la chaîne respiratoire. Cependant, les ligands (L) intracellulaires impliqués dans cet acheminement ne sont pas caractérisés jusqu'à présents. - **C** - Dans l'espace intermembranaire (IMS), le cuivre $Cu(I)$ lié par $Cox17$ est transféré aux chaperonnes $Sco1$ et $Cox11$ localisées dans la membrane interne. $Sco1$ et $Cox11$ délivrent le cuivre aux sous-unités $Cox1$ et $Cox2$ du cytochrome oxydase (CCO) (Schéma Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ.2008).

Comme souligné dans cette introduction, chez les protéobactéries, la majorité des études de caractérisation de l'homéostasie du cuivre a été réalisée chez les bactéries Gram négatives telles que *E. coli*, *P. aeruginosa* ou encore *C. metallidurans* CH34.

De même chez les microorganismes photosynthétiques, la quasi-totalité des études portantes sur l'homéostasie du cuivre a été conduite chez les cyanobactéries (*Synechocystis* PCC6803) et chez l'algue verte *C. reinhardtii*. Extrêmement peu de travaux font référence aux mécanismes d'homéostasie du cuivre chez les protéobactéries photosynthétiques. Pour pallier à ce manque de données, le modèle *R. gelatinosus* semble être un modèle qui peut allier l'étude de l'homéostasie du cuivre chez les protéobactéries aux études de la fonction photosynthétique et respiratoire. Je me suis donc intéressée au métabolisme du cuivre chez

cette protéobactérie et à la toxicité du cuivre excédentaire sur ses métabolismes énergétiques.

Dans le chapitre suivant, je présenterai les bactéries pourpres et les différents complexes impliqués dans ses métabolismes énergétiques, ainsi que mon projet de recherche.

III-1- Les protéobactéries photosynthétiques

III-1.1- Classification et caractéristique des protéobactéries photosynthétiques

Les protéobactéries photosynthétiques se divisent en trois familles: les Chromatiacées, les Ectothiorhodospiracées (sulfureuses) et les Rhodospirillacées (non sulfureuses).

En se basant sur l'analyse de leurs ARN 16S, les protéobactéries ont été divisées en cinq sous classe α , β , γ , δ et ϵ . La sous classe α comprend la majorité des protéobactéries photosynthétiques étudiées à ce jour. Pendant de nombreuses années, les protéobactéries appartenant à cette classe comme *R. capsulatus*, *R. sphaeroides* *Rhodopseudomonas (R.) palustris* et *Bradyrhizobium ORS278* ont été les plus étudiées et le génome de plusieurs d'entre elles a été séquencé. Depuis une vingtaine d'années, la β -protéobactérie *R. gelatinosus* fait l'objet d'étude. Jusqu'à ce jour, c'est la seule bactérie étudiée de ce sous-groupe à avoir la capacité d'effectuer la photosynthèse. Quatre souches de *R. gelatinosus* sont des modèles d'étude *Rubrivivax (R.) benzoatilyticus* JA2T, *Rubrivivax gelatinosus* IL144, *Rubrivivax gelatinosus* CBS et *Rubrivivax gelatinosus* SI. Dans la classe des β -protéobactéries, on trouve aussi la bactérie photosynthétique *Rhodocyclus (R.) tenuis*, mais peu étudiée, les outils génétiques n'ayant pas été développés pour cette souche.

Dans le groupe des γ -protéobactéries, deux bactéries photosynthétiques sont étudiées depuis peu *Allochromatium vinosum* et la bactérie marine *Congregibacter (C.) litoralis* dont les génomes ont été entièrement séquencés (Fuchs, Spring et al. 2007)

Contrairement aux plantes supérieures, aux algues et aux cyanobactéries, le déroulement de la photosynthèse chez les protéobactéries ne requiert qu'un seul photosystème et n'aboutit pas à la production d'oxygène (photosynthèse anoxygénique) (Blankenship 2010 ; Hohmann-Marriott and Blankenship 2011). Selon les conditions environnementales en oxygène, on distingue deux groupes de bactéries pourpres photosynthétiques : les protéobactéries capables

d'effectuer la photosynthèse en présence d'oxygène (photosynthétique aérobie) comme *A. vinosum* et *C. litoralis* ; et les protéobactéries ne mettant en place la photosynthèse qu'en absence d'oxygène (photosynthétique anaérobie) telles que *R. gelatinosus*, *R. capsulatus*.

Les protéobactéries présentent un métabolisme très varié et une aptitude exceptionnelle à utiliser divers sources d'énergie et de nutriments. De ce fait, elles sont largement répandues dans la nature, particulièrement dans les milieux aquatiques. Elles sont capables de s'adapter rapidement aux variations des conditions environnementales en mettant en place les complexes énergétiques requis.

En absence d'O₂ et en présence de la lumière, les protéobactéries photosynthétiques anaérobies effectuent la photosynthèse anoxygénique. A l'obscurité, elles génèrent leur énergie par la respiration aérobie en présence d'oxygène ou par la respiration anaérobie en utilisant comme accepteur finale d'électrons le nitrate, DMSO, TMAO,

III-1.2- Les protéobactéries photosynthétiques comme modèle d'étude :

Depuis de nombreuses années, des études sur la photosynthèse ont été réalisées en utilisant les bactéries pourpres comme modèle car ces bactéries sont facilement cultivables en laboratoire, les outils génétiques nécessaires pour générer des mutants sont disponibles et leur centre réactionnel est simple présentant des homologies structurales et fonctionnelles avec le photosystème II des plantes supérieures.

L'aptitude de ces bactéries de croître par le biais de deux voies bioénergétiques différentes (respiratoire et photosynthétique) est un atout important permettant de générer facilement des mutants déficient pour l'une des deux voies énergétiques. En effet, de nombreuses bactéries pourpres sont facilement manipulables génétiquement et l'efficacité élevée des mécanismes de recombinaisons homologues permet d'effectuer facilement des mutagenèses sites spécifiques (Donohue and Kaplan 1991 ; Ouchane, Picaud et al. 1996). Ceci a permis pendant de nombreuses années d'étudier les différents aspects de la photosynthèse des bactéries pourpres chez les deux alpha-protéobactéries *R. capsulatus* et *R. spaeroides* (Bauer, Buggy et al. 1993 ; Lang and Hunter 1994 ; Komiya, Yeates et al. 1988).

Par ailleurs, les analyses biophysiques et cristallographiques ont permis à H. Michel de résoudre la structure du premier complexe membranaire : le centre réactionnel chez *Rhodospseudomonas (R.) viridis* (prix Nobel de chimie en 1988) (Deisenhofer and Michel 1989). A ce centre réactionnel sont associées des antennes collectrices de lumière LHI et LHII, la structure des antennes LHII de *Rhodospseudomonas (R.) acidophila* a été également résolue par Cogdell (Isaacs, Cogdell et al. 1995). Ces bactéries ont été également des modèles pour d'autres études telles que l'étude de la fixation du CO₂ chez *R. capsulatus* et *R. sphaeroides* ou encore les études de l'expression génique en réponse à des stimuli externes et à des variations des conditions environnementales (état redox et lumière) (Swem, Kraft et al. 2003 ; Zeilstra-Ryalls and Kaplan 2004). Ces bactéries ont également constitué des modèles pour l'étude de la biogenèse des complexes respiratoires comme les cytochromes *c* oxydases (Koch, Winterstein et al. 2000). Il est à noter également, que ces protéobactéries possèdent des voies et des enzymes de biosynthèse des chlorophylles bien conservées chez les organismes photosynthétiques supérieurs (Blankenship 2010). De ce fait, ces bactéries photosynthétiques ont servi de modèle pour étudier la voie de biosynthèse des tétrapyrroles (Yang and Bauer 1990 ; Ouchane, Picaud et al. 1995 ; Ouchane, Steunou et al. 2004).

Parmi les bactéries photosynthétiques, la betaprotéobactérie *R. gelatinosus* a été introduite au laboratoire de photosynthèse de Gif sur Yvette en 1991 par Françoise Reiss et Chantal Astier pour développer les études génétiques et structurales de l'appareil photosynthétique des betaprotéobactéries (Agalidis and Reiss-Husson 1991). Les premières études réalisées chez cette bactérie ont porté sur la caractérisation structurale des complexes photosynthétiques, l'étude des gènes codants pour les différents composants du photosystème ainsi que les gènes codants pour les enzymes de la voie de synthèse des photopigments qui leur sont associés (Ouchane, Picaud et al. 1995 ; Ouchane, Picaud et al. 1997 ; Pinta, Picaud et al. 2002 ; Francki, Chang et al. 2000). Par la suite, des études ont été menées sur les régulations des voies bioénergétiques par la lumière et l'oxygène chez cette bactérie (Steunou, Astier et al. 2004 ; Ouchane, Picaud et al. 2007). Dernièrement, le rôle des oxydases terminales dans la respiration aérobie mais aussi dans le démarrage de la photosynthèse chez *R. gelatinosus* a été démontré (Hassani, Steunou et al. 2010). Des études sur la biogenèse des oxydases de type « hème-cuivre » ont été également initiées en s'intéressant particulièrement à la mise en place du cuivre au sein de ces complexes (Hassani, Astier et al. 2010). Ces études ont révélé que *R. gelatinosus* possède une tolérance relativement élevée à certains métaux. En effet, *R. gelatinosus* est capable de croître en photosynthèse jusqu'à une concentration de 1,8

mM et de 5 mM respectivement en présence de cuivre et de cadmium (Hassani, Astier et al. 2010 ; Ouchane/Steunou non publié).

III-2- Les métabolismes énergétiques :

Pour assurer toute fonction biologique, les cellules ont besoin d'énergie. Pour cela, les cellules produisent de l'ATP soit par voie chimique comme la glycolyse soit par photosynthèse pour les organismes photosynthétiques. Les organismes qui utilisent une source chimique comme source d'énergie sont appelés des organismes chimiotrophes. Les organismes qui utilisent l'énergie lumineuse comme source d'énergie sont appelés des organismes phototrophes (bactéries photosynthétiques, algues et plantes).

La fermentation, la respiration et la photosynthèse sont les trois métabolismes qui aboutissent à la production de l'ATP à partir de différentes sources d'énergie. La fermentation se déroule en anaérobie, c'est un processus biologique permettant la libération d'énergie à partir d'un substrat organique tel que le glucose. Lors de la fermentation, l'accepteur final d'électron est souvent le produit final. En revanche, lors de la photosynthèse et la respiration le métabolisme générateur d'énergie fait intervenir des transporteurs d'électrons le long de complexes protéiques localisés dans la membrane. A ce transport d'électrons est couplée la formation d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. L'ATP est formée lors de la dissipation de ce gradient *via* l'ATP synthase.

III-2.1- La photosynthèse chez les protéobactéries

Les bactéries pourpres sont capables de s'adapter rapidement aux variations environnementales en mettant en place les complexes protéiques adéquats. Ainsi la structure et la composition protéique et lipidique de leur membrane varie en fonction des conditions environnementales.

Dans des conditions de croissance photosynthétique (lumière et anaérobie), quatre complexes membranaires sont mis en jeu : les antennes collectrices de lumière auxquelles sont associées des pigments (bactériochlorophylles (BChls) et caroténoïdes), le centre réactionnel, le complexe cytochrome *bc₁* et l'ATP synthase (Figure 12).

Au cours de la photosynthèse, un transfert d'électrons a lieu entre ces composants membranaires par l'intermédiaire des transporteurs liposolubles (les quinones) et des transporteurs hydrosolubles (les cytochromes *c* et/ou l'*HiPIP*). Le transport d'électrons est couplé à la translocation de protons du cytoplasme vers le périplaste, nécessaire à la production de l'ATP par l'ATP synthase.

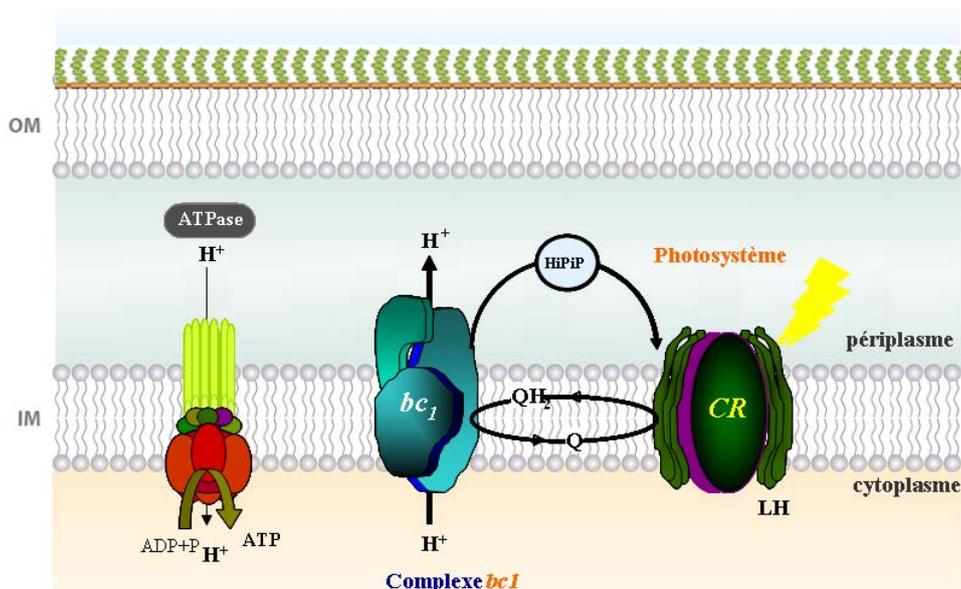


Figure 12 : Représentation schématique des complexes énergétiques mis en jeu lors de la photosynthèse.

Les antennes collectrices (LH) sont associées au centre réactionnel (CR) et sont dessinées en vert. Le complexe *bc1* est représenté en bleu et l'ATPase en rouge. Les quinones (Q) et le cytochrome *c* (*cytc*) sont des transporteurs solubles d'électrons.

III-2.1.1- Les complexes photosynthétiques et les pigments

III-2.1.1.1- Les complexes membranaires

Les antennes

Les antennes collectrices de lumière, LH (pour Light Harvesting) sont des complexes protéiques absorbant l'énergie lumineuse grâce aux pigments qui leur sont associés. Les antennes sont localisées autour du centre réactionnel permettant ainsi la transmission de l'énergie au centre réactionnel sous forme d'excitons. Généralement, chez les protéobactéries, on distingue deux types d'antennes, les antennes LHI et les antennes LHII. Les antennes LHI

sont intimement liées au centre réactionnel et autour d'elles s'organisent les antennes accessoires LHII (Figure 13). La stœchiométrie entre le centre réactionnel et les antennes LHI varie très peu, alors que le taux de LHII varie en fonction de l'intensité de lumière. A faible intensité lumineuse, la quantité des antennes LHII augmente. En revanche à forte lumière, la quantité des antennes LHII est réduite (Zeilstra-Ryalls, Gomelsky et al. 1998).

Les deux types d'antennes sont des hétérodimères constitués de deux polypeptides α et β auxquels sont associés de façon non covalente les pigments bactériochlorophylles (BChls) et caroténoïdes. Les hétérodimères $\alpha\beta$ forment un oligomère de forme cylindrique, les polypeptides β sont à l'extérieur alors que les polypeptides α sont à l'intérieur. Les hétérodimères des antennes LHI et ceux du LHII s'associent à un nombre différent de molécules de BChls et de caroténoïdes. Les antennes LHI lient deux molécules de BChls et une ou deux molécules de caroténoïdes. En revanche, les hétérodimères des antennes LHII fixent trois molécules de BChls et une molécule de caroténoïde (Cogdell, Isaacs et al. 1999).

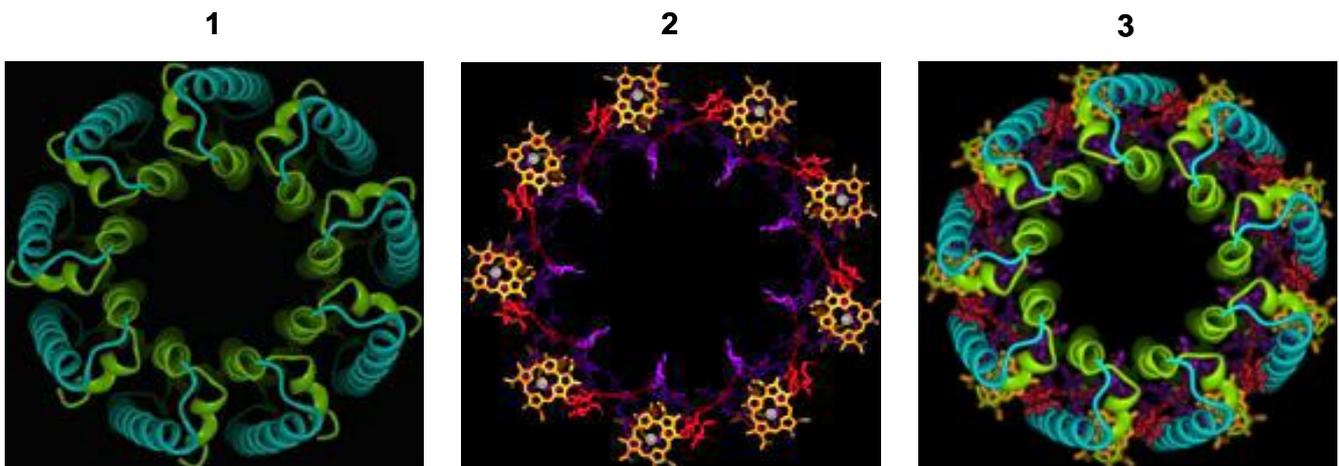


Figure 13 : Vue cytoplasmique de la structure de l'antenne LH2 de *R. acidophila* 10050.

1 - Représentation des polypeptides α et β , - 2 - Représentation des pigments (bactériochlorophylles carotènes), - 3 - Représentation du complexe protéines-pigments.

Les polypeptides β sont représentés en bleu, les apoprotéines α en vert, les carotènes en rouge, les bactériochlorophylles absorbant à 850 nm en violet et les bactériochlorophylles absorbant à 800 nm en orange. Image issue de la galerie photos du laboratoire du Professeur R. Cogdell (<http://www.gla.ac.uk/ibls/BMB/rjc/lh2gallery.html>)

Le centre réactionnel

Le centre réactionnel est un complexe membranaire multi-protéique constitué généralement de trois polypeptides L, M et H. Les sous-unités L et M présentent cinq hélices transmembranaires auxquelles sont associés les cofacteurs : quatre BChl *a* dont deux composent la paire spéciale, deux bactériophéophytines, un caroténoïde, un atome de fer non-hémique et deux accepteurs d'électrons quinoniques (Q_A et Q_B). La sous-unité H ancrée par une hélice transmembranaire, présente une protubérance de forme globulaire du côté cytoplasmique. Elle joue un rôle important pour la mise en place, la stabilité et le transfert des protons (Figure 14).

Dans les membranes des bactéries photosynthétiques, le centre réactionnel est étroitement associé avec les antennes LH. Cette association permet l'acheminement de l'exciton des bactériochlorophylles des antennes au centre réactionnel. La paire spéciale des BChls est alors excitée, et un électron est transmis *via* la bactériophéophytine à l'accepteur primaire d'électron qui est la Quinone A du polypeptide M. L'accepteur secondaire d'électron est une quinone membranaire (Q_B). Les quinones membranaires possèdent un site d'attachement au polypeptide L (poche Q_B) et leur affinité pour ce site dépend de leur état d'oxydoréduction.

Le transfert d'électron primaire conduit à une séparation de charge de part et d'autre de la membrane, la paire spéciale des BChls portant une charge positive d'un côté de la membrane, et la quinone portant une charge négative de l'autre. Un nouveau cycle de séparation de charge est amorcé par l'absorption d'un second photon *via* le dimère de BChls. La Quinone B portant une charge négative capte un second électron et deux protons H^+ , stabilisant ainsi la forme entièrement réduite de la quinone QH_2 . Le changement de l'état d'oxydoréduction de la quinone engendre alors la diminution de l'affinité de cette dernière pour le centre réactionnel. Ceci entraîne la libération de la quinone dans la phase lipidique de la membrane qui réduit alors le complexe bc_1 . Le dimère de BChls photooxydé est directement réduit par le cytochrome *c* *via* le complexe bc_1 .

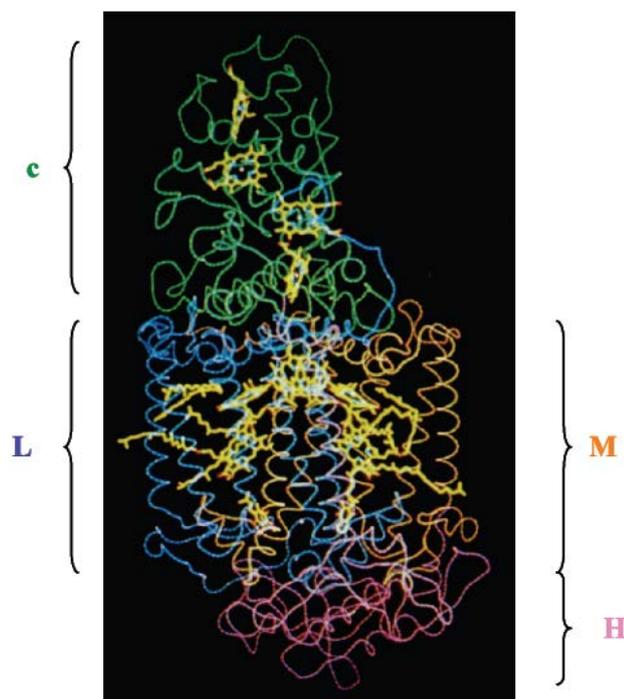


Figure 14: Structure cristallographique du centre réactionnel de *R. viridis*.

En bleu est la sous-unité L, en orange est la sous-unité M, la sous-unité H en rose et la sous-unité PufC. (c) en vert. Les atomes des cofacteurs sont représentés: carbone en jaune, azote en bleu, oxygène en rouge, magnésium en blanc (Deisenhofer and Michel 1989).

Chez *R. gelatinosus*, *R. tenuis* et *R. viridis*, il existe une quatrième sous-unité du CR repéré du côté périplasmique. Il s'agit d'un cytochrome tétrahémique composé de quatre hèmes de type *c*. Cette sous-unité a un rôle dans la réduction de la paire spéciale de BChls photooxydée (Agalidis, Othman et al. 1999).

III-2.1.1.2- Les pigments photosynthétiques

La capacité des organismes photosynthétiques notamment les protéobactéries à effectuer la photosynthèse repose sur la présence de pigments ou photorécepteurs qui absorbent l'énergie lumineuse à diverses longueurs d'ondes. L'énergie ainsi absorbée est transmise au centre réactionnel sous forme d'exciton. Chez les protéobactéries, on distingue deux types de pigments : les Bactériochlorophylles (BChls) et les caroténoïdes. Ces photorécepteurs sont des composés organiques colorés complexes et doivent leurs propriétés à leurs structures chimiques (doubles liaisons conjuguées et cycles).

III-2.1.1.2.1- La biosynthèse des porphyrines : Bactéριοchlorophylles / Hèmes

Les étapes communes de biosynthèse :

Au sein de la famille des porphyrines, on trouve les hèmes, les bilines, la vitamine B12, le sirohème, la chlorophylle et la bactériochlorophylle. Les premières étapes de la voie de biosynthèse des porphyrines sont communes à la voie de biosynthèse des bactériochlorophylles et à celle des hèmes. Au cours de la respiration et de la photosynthèse, les hèmes jouent un rôle clé dans l'activité de plusieurs complexes notamment celle des oxydases terminales, du complexe *bc₁* et du centre réactionnel. Ce groupement prosthétique intervient également dans l'assemblage et la stabilité des ces complexes.

Dans la voie de biosynthèse de l'hème et des bactériochlorophylles, l'action successive des produits des gènes *hemA*, *hemB*, *hemC* et *hemD* à partir du L-Glutamate aboutit à la formation du premier tétrapyrrole, l'Uroporphyrinogène III. Cet intermédiaire suit une voie réductrice aboutissant à la formation de la vitamine B12, du sirohème et de l'hème *d₁*, soit une voie oxydative catalysée par le produit du gène *hemE*, amenant à la formation du coproporphyrinogène III. Ce dernier subit une étape de décarboxylation oxydative en protoporphyrinogène IX qui peut être catalysée selon les conditions d'oxygénation par deux enzymes structurellement différentes. En aérobie, cette oxydation est assurée par la coproporphyrinogène III oxydase aérobie, HemF à cluster [Fe-Fe], qui utilise l'oxygène comme accepteur d'électron. En micro-aérobie et anaérobie, l'enzyme coproporphyrinogène III oxydase anaérobie HemN, contenant un cluster [4Fe-4S], assure la décarboxylation oxydative du coproporphyrinogène III (Troup, Hungerer et al. 1995).

Le protoporphyrinogène IX est oxydé par la protoporphyrinogène IX oxydase (codée par *hemG*, *hemK* ou *hemY*) en protoporphyrine IX, le précurseur commun à la biosynthèse des hèmes et des BChls.

Les hèmes :

A partir de la Protoporphyrine IX, un atome de fer est chélaté par l'enzyme HemH (Ferrochélatase) au centre du noyau tétrapyrrolique aboutissant à la formation du protohème IX (hème *b*) (Figure 15). Ce dernier est le précurseur de l'hème *c*, l'hème *o* et l'hème *a*.

La coordination de ces différents types d'hèmes avec l'apoprotéine varie en fonction de l'environnement de leur site de liaison.

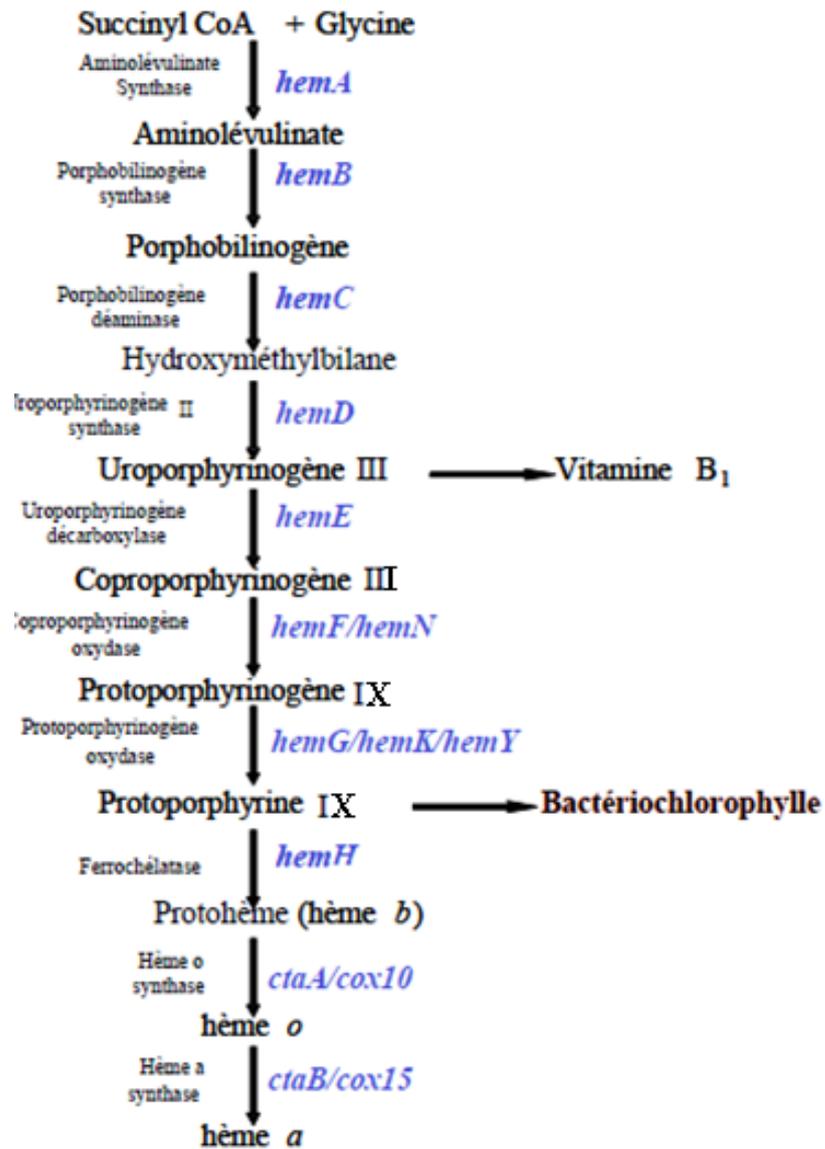


Figure 15 : Voie de biosynthèse des tétrapyrroles.

Cette voie est commune à la voie de biosynthèse de la vitamine B12, la bactériochlorophylle et les hèmes. Les gènes codant pour les enzymes qui catalysent les différentes voies sont indiqués en bleu.

L'hème *b* est par exemple le cofacteur de l'hémoglobine, permettant la fixation et le transport de l'oxygène. Les cytochromes *c*, contenant un hème de type *c*, sont les principales hémoprotéines impliquées dans le transport des électrons au niveau de la chaîne photosynthétique et respiratoire.

Pour sa mise en place dans les cytochromes, l'hème est pris en charge par différents transporteurs et chaperonnes. Chez les protéobactéries pourpres, notamment pour les cytochromes de type *c*, l'hème est transloqué *via* les systèmes de biogenèses de l'hème *c* (CCM ou CCS) dans la membrane puis fixe de façon covalente l'apocytochrome (Feissner, Richard-Fogal et al. 2006).

Les Bactériorchlorophylles

La voie de biosynthèse des hèmes et celle des BChls bifurquent à partir de l'intermédiaire commun la protoporphyrine IX (Proto IX) (Figure 16). Il existe différents types de BChls (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*) chez les bactéries pourpres, on trouve majoritairement de la BChls *a*.

La Proto IX est converti en BChls après une série de transformations incluant la chélation d'un atome de magnésium au centre du noyau tétrapyrrolique aboutissant à la formation du Mg Protoporphyrine IX (MgP). Cette étape est catalysée par les produits des gènes *bchD*, *bchI* et *bchH* (Mg chélatase). Le MgP est méthylé par BchM en méthyl Mg Protoporphyrine IX (MgPMe).

La formation d'un cinquième cycle est assurée par une cyclase pour former le Mg-divinyl-protochlorophyllide (PChlide *a*). Selon la disponibilité de l'oxygène, cette réaction est catalysée par deux enzymes structurellement différentes BchE et AcsF chez les protéobactéries bactéries pourpres (Pinta, Picaud et al. 2002 ; Ouchane, Steunou et al. 2004). L'enzyme BchE possède un cluster [4Fe-4S] labile en présence d'oxygène alors qu'AcsF dispose d'un centre [Fe-Fe] beaucoup plus stable en aérobie. L'enzyme BchE catalyse la cyclisation oxydative en anaérobie tandis qu'AcsF catalyse cette réaction en présence d'O₂ (Pinta, Picaud et al. 2002 ; Ouchane, Steunou et al. 2004).

Le PChlide *a* est le composé précurseur de la chlorophyllide *a*. Des étapes supplémentaires catalysées par des complexes enzymatiques solubles ou membranaires aboutissent donc à la production de la bactériorchlorophylle *a* (BChl *a*) à partir de la chlorophyllide *a*. Les différentes étapes de biosynthèse du BChl *a* et de la chlorophylle *a* sont détaillées dans la Figure 165 avec les différents gènes impliqués pour chaque étape.

Comme signalé précédemment, les bactériorchlorophylles ont un rôle essentiel dans les complexes photosynthétiques. Elles sont associées aux antennes pour absorber l'énergie

lumineuse et elles jouent également le rôle de donneur primaire d'électron au niveau du centre réactionnel. Les mutants de biosynthèse de la chlorophylle sont souvent non photosynthétiques.

Les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des BChls sont organisés en opérons et regroupés dans le cluster photosynthétique d'environ 40 et 50 kb chez les bactéries photosynthétiques.

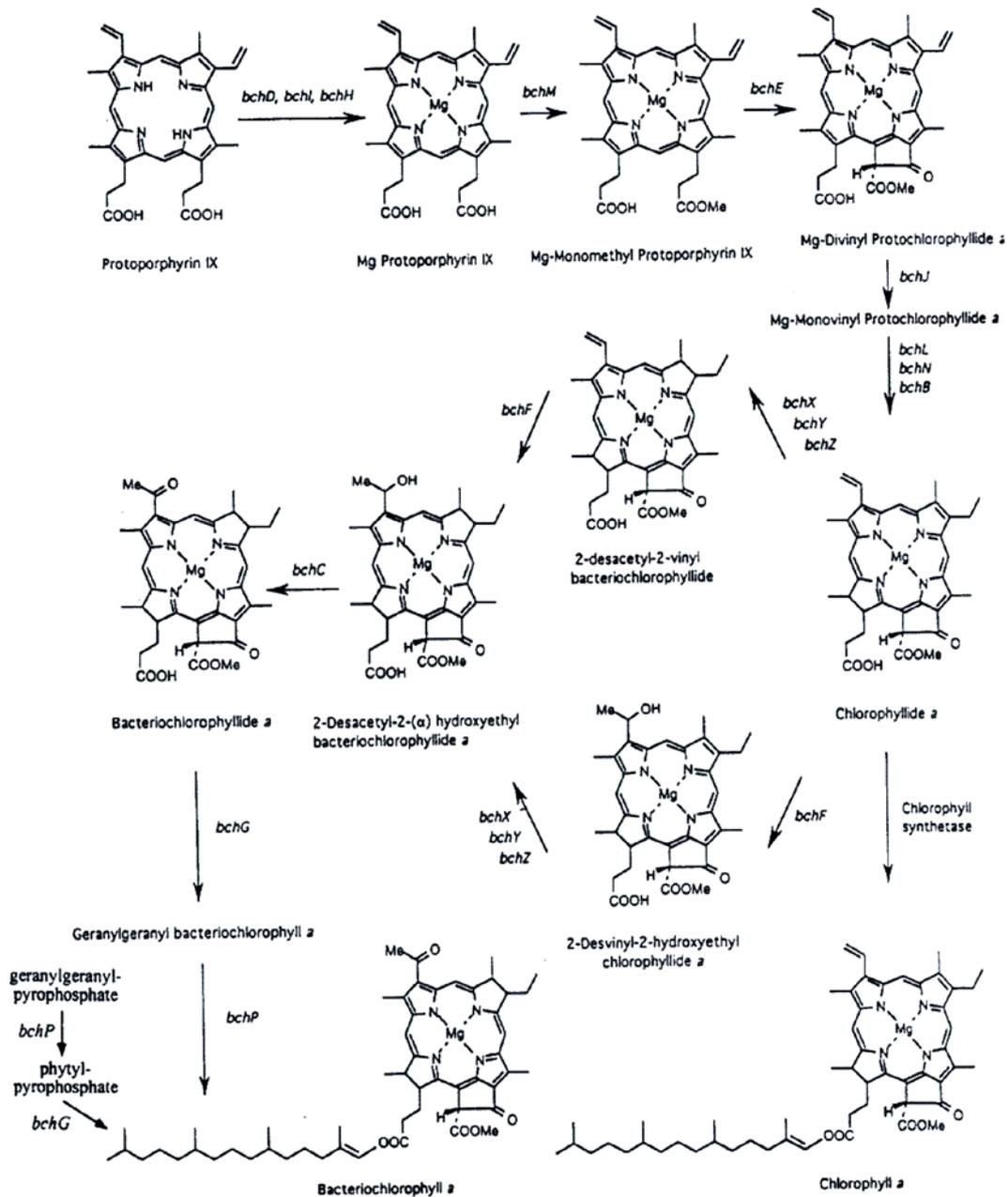


Figure 16 : La voie de biosynthèse de la chlorophylle *a* et de la bactériochlorophylle *a*.

(Alberti, Burke et al. 1995)

III-2.1.1.2.2- Les caroténoïdes

Les caroténoïdes constituent une deuxième catégorie de pigments présents dans l'appareil photosynthétique. Les caroténoïdes sont des pigments naturels liposolubles de couleurs variées (jaune, orange, rouge). Ils sont synthétisés par toutes les algues, toutes les plantes vertes et par de nombreux champignons et bactéries photosynthétiques et non photosynthétiques.

Dans les cellules phototrophes, ce sont des pigments accessoires de la photosynthèse, qui ont trois rôles principaux :

- Un rôle de collecteur de lumière : ils absorbent à des longueurs d'onde situées entre 400 et 530 nm dans le bleu puis ils transfèrent l'énergie aux bactériochlorophylles qui ont une faible absorption dans cette région du spectre de la lumière. Ceci contribue ainsi à l'augmentation de l'efficacité de l'appareil photosynthétique.

- Un rôle photoprotecteur : ils protègent les cellules photosynthétiques et particulièrement le centre réactionnel des dommages occasionnés par la photooxydation due à la formation de singulets d'oxygène et des radicaux libres générés par les différents métabolismes cellulaires en présence d'oxygène (Olson 1993 ; Ouchane, Picaud et al. 1997).

- Un rôle structural dans l'assemblage et la stabilité des antennes (Gall, Cogdell et al. 2003).

III-2.1.2- Organisation des gènes photosynthétiques

III-2.1.2.1- Le cluster photosynthétique : opéron et super-opéron

Chez les protéobactéries, les gènes impliqués dans la structure, l'assemblage et la régulation de l'expression de l'appareil photosynthétique sont regroupés dans le génome sur environ 40 à 50 kb selon les espèces et forment le « cluster photosynthétique ». Ce cluster, en plus des gènes de la voie de biosynthèse des bactériochlorophylles (gènes *bch*) comprend les gènes *pufLM*, *pufC* et *pufA* codant le centre réactionnel (respectivement sous-unité L et M, cytochrome tétrahémique et la sous-unité H), les gènes *pufB* et *pufA* codant les protéines de l'antenne LHI, les gènes codant les enzymes de synthèse des caroténoïdes (*crt*) et parfois des gènes codant pour des régulateurs d'expression génétique comme *ppsR* et *aerR*. Chez certaines bactéries pourpres comme *R. capsulatus*, *R. sphaeroides* et *R. gelatinosus*, le cluster

photosynthétique a été entièrement séquencé et caractérisé (Youvan, Bylina et al. 1984 ; Choudhary and Kaplan 2000 ; Liotenberg, Steunou et al. 2008).

Les gènes impliqués dans la même voie métabolique sont souvent regroupés en opéron tels que les gènes de biosynthèse des BChls ou encore des caroténoïdes (*bchFNBHLM* et *crtEF*). Dans le cluster de *R. gelatinosus*, les gènes qui codent pour les antennes LHI et le centre réactionnel sont rassemblés avec les gènes de synthèse des carotènes *crtADC* formant ainsi l'opéron *pufBALMCcrtADC* (Ouchane, Picaud et al. 1997 ; Liotenberg, Steunou et al. 2008).

Certains opérons sont groupés également avec d'autres opérons pour former des super-opérons exemple le *crtEF-bchCXYZ-pufBALMCcrtADC*. L'expression de chaque opéron de ce super-opéron peut être assurée à partir de divers promoteurs situés en amont de *crtE*, *bchC* et *pufB* (Figure 17).

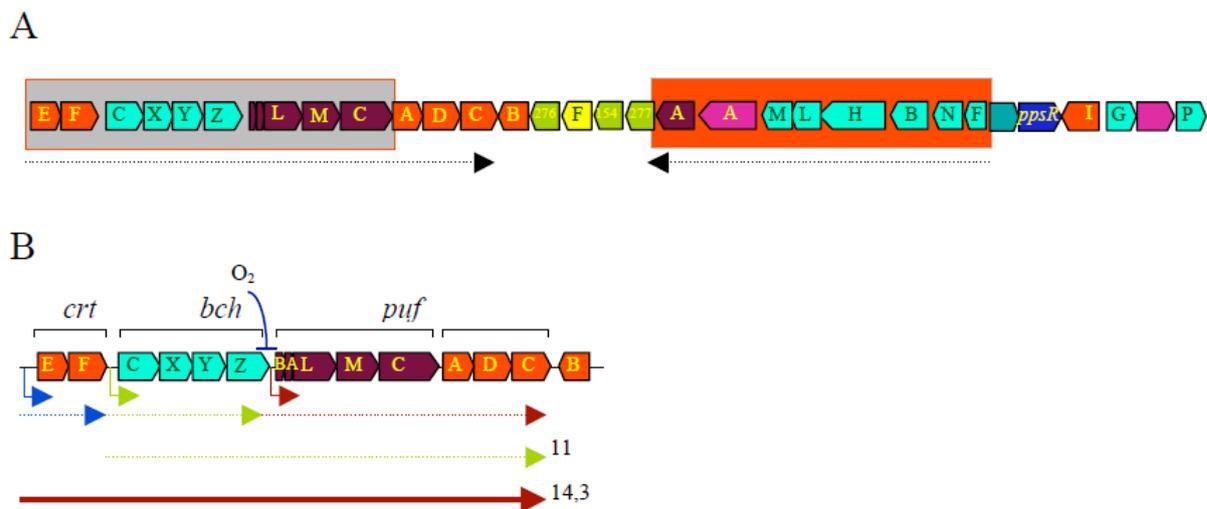


Figure 17 : Organisation du cluster photosynthétique chez *R. gelatinosus*.

- **A** - Les deux super-opérons *crt-bch-puf* (cadre gris) et *bch-puf* (cadre rouge) sont transcrits dans un sens opposé. En vert, les gènes *bch*; en marron les gènes *puf* et *phxA* ; en orange, les gènes *crt* ; en jaune, le gène *ascF* ; en bleu, le gène *ppsR* et en rose, le gène *lhA*. - **B** - Organisation transcriptionnelle de la région couvrant *crtE* à *crtB* (en orange). Les promoteurs *crtEF*, *bchCXYZ* et *pufBALMC-crtADC* sont marqués par des flèches brisées bleue, verte et rouge, respectivement. Les flèches horizontales indiquent la taille des transcrits correspondants à chaque promoteur (Liotenberg, Steunou et al. 2008)

Cette organisation en super-opérons joue un rôle important pour l'adaptation rapide de la bactérie aux variations des conditions de son habitat. En effet, les gènes de ces opérons (*crt*, *bch* et *puf*) sont co-transcrits en aérobic. Cette organisation génique est très favorable pour la bactérie, lui permettant d'assurer la production d'un niveau basal de complexes

photosynthétiques, même en présence d'une faible quantité d'oxygène. Ceci permet à la bactérie de démarrer rapidement la photosynthèse après le passage à la lumière quand l'oxygène du milieu devient limité. Par contre, en anaérobie et en présence de lumière chaque opéron est fortement transcrit à partir de son propre promoteur (Ouchane, Picaud et al. 1997 ; Liotenberg, Steunou et al. 2008).

Un deuxième super-opéron a été identifié chez *R. gelatinosus* regroupant tous les gènes de *bchF* à *puhA* (Liotenberg, Steunou et al. 2008).

III-2.1.2.2- L'opéron *puc*

Contrairement aux gènes qui codent pour les antennes LHI, les gènes *pucB* et *pucA* qui codent respectivement pour les polypeptides β et α des antennes LHII et constituent l'opéron *pucBA* sont localisées à l'extérieur du cluster photosynthétique.

Chez *R. capsulatus*, en aval des gènes *pucB* et *pucA*, trois gènes supplémentaires *pucCDE* sont présents. La protéine PucC semble être un régulateur alors que la protéine PucD joue un rôle dans la stabilité et la mise en place de l'antenne LHII (Tichy, Albien et al. 1991). Le gène *pucE* code pour une protéine γ de 14 kDa associé au complexe LHII (LeBlanc, Lang et al. 1999). Chez *R. gelatinosus*, le gène *pucC* est présent en aval de *pucA* avec une orientation opposée à celle de *pucBA*. L'inactivation de *pucC* engendre une forte diminution dans la production des antennes LHII chez *R. gelatinosus* ce qui indique la présence d'un autre facteur qui remplace *pucC* dans la biogenèse de ces antennes (Steunou, Ouchane et al. 2004).

III-2.2- La respiration

En absence de la lumière, les bactéries pourpres produisent de l'ATP *via* la respiration. Selon l'accepteur final d'électrons, on distingue deux types de respiration :

La respiration aérobie, l'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire est l'oxygène. Dans la respiration anaérobie, l'accepteur final des électrons est un composé tel que le DMSO (diméthyl sulfoxyde) ou le TMAO (triméthylamine-N-oxide) ou le nitrate (Richardson 2000).

III-2.2.1- La respiration aérobie

En présence d'O₂, les bactéries pourpres produisent l'ATP *via* la respiration aérobie. La dégradation des biomolécules par des processus comme la glycolyse et le cycle de Krebs, des coenzymes réduits comme la NADH ou du FADH₂ sont produits. L'oxydation de ces coenzymes génère des électrons qui passent à travers des complexes de la chaîne respiratoire jusqu'au site de fixation de l'accepteur final d'électrons : l'oxygène.

La chaîne respiratoire met en jeu différents complexes protéiques membranaires : les déshydrogénases (NADH-déshydrogénase (le complexe I) et Succinate-déshydrogénase (le complexe II), le complexe *bc*₁ (le complexe III), les oxydases terminales (le complexe IV) et l'ATP synthase (le complexe V) (Figure 18).

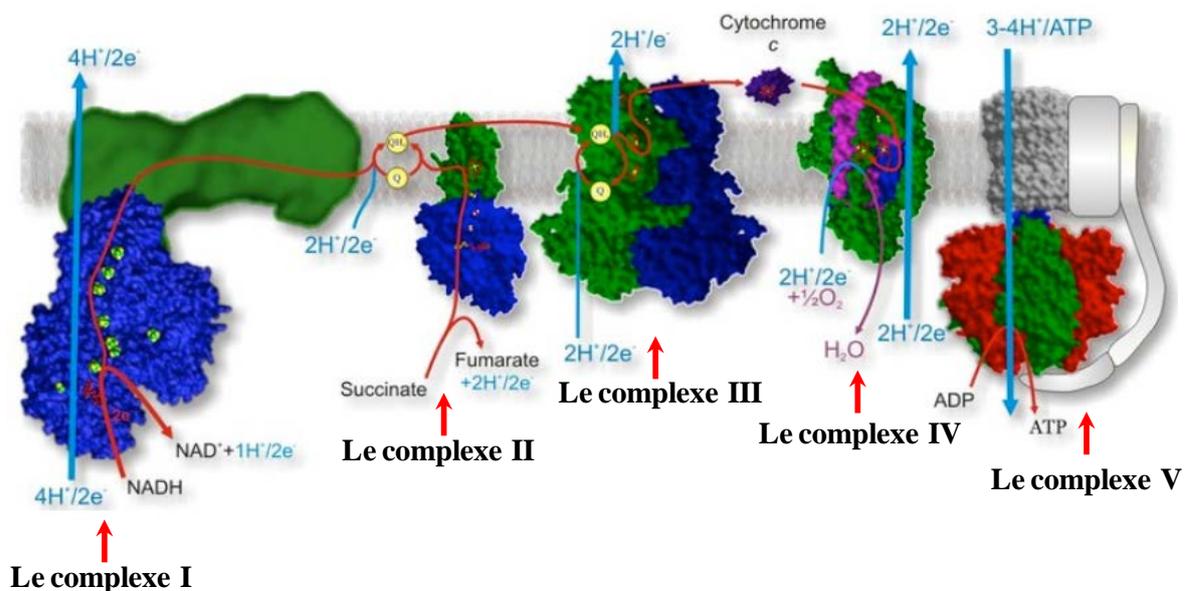


Figure 18 : Les complexes énergétiques de la chaîne respiratoire aérobie.

Dans la mitochondrie comme chez les bactéries, les déshydrogénases : (le complexe I la NADH-déshydrogénase) et le complexe II (la Succinate-déshydrogénase) réduisent les pools de quinones membranaires dans la chaîne respiratoire. Le transport d'électrons entre ces complexes, le complexe *bc*₁ (le complexe III) et les oxydases terminales (*cbb*₃/*bd*) se fait grâce aux transporteurs solubles d'électrons : les quinones (Q) et le cytochrome *c* (*cytc*). Les protons transloqués par ces complexes sont utilisés pour la production de l'énergie par l'ATPase (From Marten Wikström Bioenergetics Group).

Lors de la respiration, le métabolisme générateur d'énergie fait intervenir des transporteurs d'électrons solubles, les cytochromes *c* et liposolubles, les quinones. A ce

transfert d'électrons d'un donneur primaire vers un accepteur terminal est couplée la formation d'un gradient de protons. L'ATP est formée par l'ATP synthase.

III-2.2.1.1- Le complexe bc_1

Lors de la respiration, les déshydrogénases (NADH-déshydrogénase ou Succinate-déshydrogénase) réduisent le pool de quinones membranaires. Ces quinones sont oxydées soit par les quinols oxydases pour réduire l' O_2 en H_2O soit par le complexe bc_1 .

Ce dernier réduit aussi les cytochromes c solubles contribuant ainsi au recyclage des électrons vers le centre réactionnel en photosynthèse (Figure 18).

Le complexe bc_1 , également nommé ubihydroquinone cytochrome c oxydoréductase, intervient dans la respiration mais également dans la photosynthèse. Il est constitué généralement de trois sous unités (Figure 19):

- Le cytochrome b est une protéine hydrophobe de 45 kD et présente de multiples hélices transmembranaires. Elle renferme deux hèmes de type b , un de haut potentiel de réduction (b_H) et l'autre de bas potentiel (b_L)

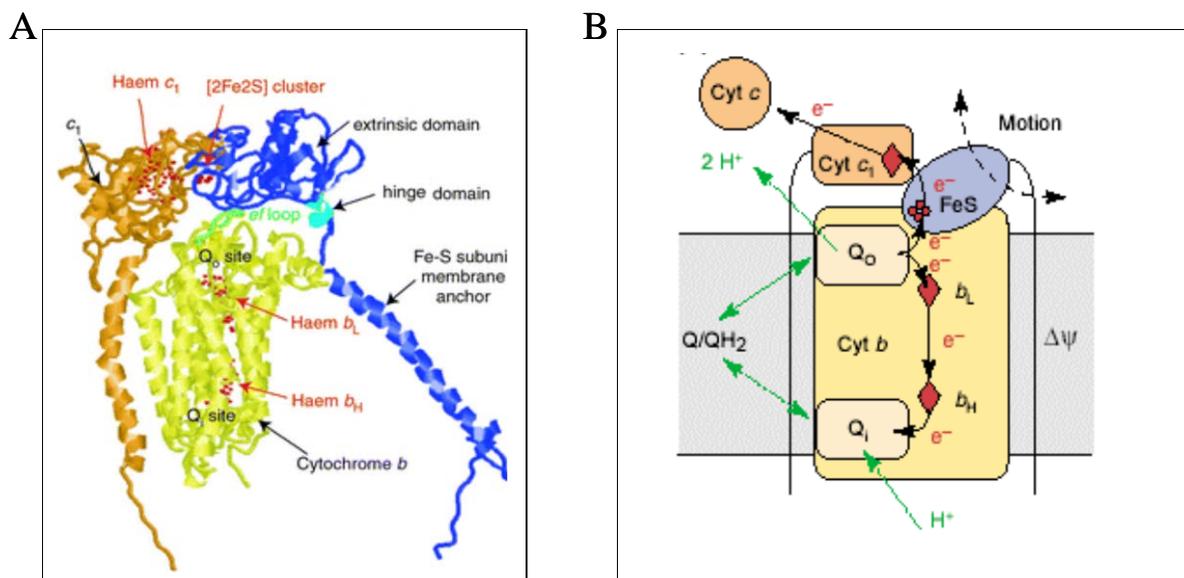


Figure 19: Le complexe bc_1 .

- **A** - Structure tridimensionnelle du complexe bc_1 : Le cyt b (en vert), le cyt c_1 (en orange), la Rieske (en bleue). En rouge sont représentés les cofacteurs de chaque sous unité du complexe (hèmes b_L , b_H , c_1 et le cluster [2Fe-2S]) ainsi que les sites actifs Q_o et Q_i (Darrouzet, Valkova-Valchanova et al. 2000). - **B** - Mécanisme du cycle Q dans le complexe bc_1 : Représentation schématique des 3 sous unités catalytiques (Cyt b , Cyt c_1 et la Rieske), des cofacteurs (hèmes b_L , b_H , c_1 et cluster [Fe-S]) et des sites actifs Q_o et Q_i . Le transfert des électrons et des protons est catalysé par l'enzyme, ils sont séparés au site Q_o indiqués en flèche noire et vert respectivement. La double flèche en pointillé fait référence au mouvement intrinsèque de la sous unité Rieske. Le $\Delta\Psi$ réfère au potentiel de membrane généré par le transfert des électrons de b_L vers b_H (Darrouzet and Daldal 2003).

- La protéine de Rieske de 20 kD présente un centre [2Fe-2S] coordonné par deux cystéines et deux histidines. Elle est attachée à la membrane par son extension N-terminal.

- Le cytochrome c_1 est une protéine d'environ 30 kDa ayant comme cofacteur une molécule d'hème de type c liée d'une façon covalente par deux cystéines. Elle est attachée à la membrane par son domaine C-terminal hydrophobe (Darrouzet, Valkova-Valchanova et al. 2000 ; Cox and Moore 2002 ; Darrouzet and Daldal 2003).

Des sous-unités supplémentaires à ces trois dernières protéines peuvent être présentes selon les espèces.

La fonction de ce complexe dans la respiration est d'oxyder les quinones réduites par les déshydrogénases et de réduire les cytochromes c (cyt c) qui seront à leur tour oxydés par les cytochromes c oxydases.

Lors de la photosynthèse, le cyt bc_1 oxyde les quinones réduites par le centre réactionnel et réduit les transporteurs hydrosolubles (les cytochromes c) ou HiPIP qui seront oxydé à leur tour par le centre réactionnel. En même temps, le complexe bc_1 participe à la formation d'un potentiel de membrane et d'un gradient de protons en permettant la translocation de protons à travers la membrane.

Le mécanisme de transfert d'électrons des quinols vers les cytochromes c à l'intérieur du complexe bc_1 est appelé le cycle Q. Une molécule de quinol est ainsi oxydée en quinone au niveau du site Q_0 localisé du côté périplasmique. Simultanément, deux protons sont relargués dans l'espace périplasmique. Le domaine périplasmique mobile de la protéine Rieske contenant le cluster Fe-S interagit avec le cytochrome b au niveau du site Q_0 pour prélever un électron et le transférer à l'hème du cytochrome c_1 . L'électron est alors transféré soit vers le centre réactionnel (au cours de la photosynthèse anoxygénique) soit vers les cytochromes c oxydases (lors de la respiration) *via* les transporteurs solubles.

Le deuxième électron est transféré successivement de l'hème b_L de bas potentiel à l'hème b_H de haut potentiel et enfin à une molécule de quinone liée au site Q_i . Il en résulte alors un intermédiaire radicalaire semi-quinone. Un deuxième cycle d'oxydation du QH₂ au site Q_0 est indispensable afin que cette semi-quinone soit complètement réduite.

Chez *R. gelatinosus*, les polypeptides du complexe bc_1 sont codés par l'opéron *petAIBC*. Le gène *petA1* code pour la protéine Rieske, le gène *petB* pour le cytochrome de type b , et le gène *petC* pour le cytochrome de type c_1 (Ouchane, Agalidis et al. 2002). Un gène

petA2 codant pour une deuxième protéine de Rieske a été identifié et son rôle dans le fonctionnement du cytochrome bc_1 a été établi (Ouchane, Nitschke et al. 2005).

III-2.2.1.2- Les transporteurs solubles d'électrons : cytochrome *c*, HiPIP

Les électrons sont transférés à travers les complexes membranaires et passent d'un complexe à l'autre aussi bien dans la chaîne respiratoire que dans la chaîne photosynthétique *via* les transporteurs liposolubles ou hydrosolubles. Chez les protéobactéries, on distingue deux types de transporteurs d'électrons de haut potentiel :

- Les quinones membranaires transportent les électrons et les protons : (i) du complexe I (la NADH-déshydrogénase) et/ou du complexe II (la Succinate-déshydrogénase) au complexe bc_1 au cours de la respiration, (ii) et du centre réactionnel au complexe bc_1 lors de la photosynthèse.

- Les cytochromes *c* et les HiPIP (ferrédoxine de haut potentiel) interviennent dans le transport des électrons aux oxydases terminales et du complexe bc_1 vers le centre réactionnel.

Chaque transporteur a un potentiel redox différent, qui dépend de son groupe prosthétique et de sa structure.

III-2.2.1.3- Les oxydases terminales : structures et opérons

L'accepteur final d'électron de la chaîne respiratoire aérobie est l'oxygène. Ce dernier est réduit en eau *via* les oxydases terminales. Ces oxydases membranaires participent également à la translocation des protons du cytoplasme vers le périplasme nécessaire pour la formation d'un potentiel membranaire et d'un gradient de protons. Selon le donneur d'électrons, on distingue chez les protéobactéries deux types d'oxydases terminales : (i) les cytochromes *c* oxydases (enzymes oxydant les cytochromes *c* : aa_3 et cbb_3) et (ii) les quinols oxydases (enzymes oxydant les quinols : bd et bo ou autres). Ces oxydases présentent des différences au niveau de leur composition en sous-unités et en cofacteurs (type d'hème (*a*, *b*, *c*, *d*, *o*) et/ou cuivre) mais aussi au niveau de leur affinité pour l'oxygène.

Chez *R. gelatinosus*, quatre opérons codant pour quatre différentes oxydases terminales ont été identifiés dans le génome de cette bactérie, trois sont de type bactérien, cbb_3 , bd et bo et une de type mitochondrial, caa_3 . Le rôle de ces oxydases terminales dans la respiration chez

cette bactérie a été étudié. Les résultats ont montré que seules les oxydases *cbb₃* et *bd* sont fonctionnelles dans la souche sauvage. Aucune activité pour les oxydases *bo* et *caa₃* n'a pu être décelée (Hassani, Steunou et al. 2010). L'activité des oxydases *cbb₃* et *bd* dépend de la concentration en O₂, l'oxydase *cbb₃* est impliquée dans la respiration micro-aérobie (faible oxygénation) alors que la quinol oxydase *bd* est importante pour la respiration aérobie (forte oxygénation). Dans ce chapitre, je me limiterai donc à la description de la cytochrome *c* oxydase *cbb₃* et de la quinol oxydase *bd*.

- La cytochrome *c* oxydase *cbb₃* : type bactérien

Les oxydases terminales qui acceptent les électrons des transporteurs solubles (habituellement les cytochromes *c*) réduits préalablement par le complexe *bc₁* sont appelées les cytochromes *c* oxydases (COX). Elles font partie de la superfamille des oxydases de type hème-cuivre car leur site actif est composé d'hèmes et de cuivre. On définit les oxydases de cette superfamille en fonction de la composition en hème.

*i - Structure de la cytochrome oxydase *cbb₃**

L'oxydase de type hème-cuivre *cbb₃* a été identifiée uniquement chez les bactéries (Ducluzeau, Ouchane et al. 2008). Elle intervient dans la respiration en condition de faible oxygénation.

Elle est généralement constituée de 4 sous-unités CcoNOQP (Thony-Meyer 1997 ; Pitcher and Watmough 2004). La sous-unité catalytique CcoN présente 12 hélices transmembranaires, possède un hème *b* de bas potentiel et un centre bimétallique formé d'un hème de haut potentiel *b₃* et d'un ion cuivre Cu_B. L'hème de bas potentiel sert comme donneur immédiat d'électrons au centre bimétallique où a lieu la réduction de l'oxygène.

Les sous-unités transmembranaires CcoO (23 kD) et CcoP (35 kD) fixent respectivement au niveau de leur domaine périplasmique soluble un et deux hèmes de type *c* fixés sur le motif CXXCH, grâce auxquels le transfert d'électron au site actif de CcoN peut être effectué. Le rôle de la 4^{ème} sous-unité CcoQ reste inconnu mais il a été suggéré qu'elle contribue à la stabilité du centre catalytique de l'enzyme (Peters, Kulajta et al. 2008).

Récemment, la structure tridimensionnelle de l'oxydase *cbb₃* de *Pseudomonas (P.) stutzeri* a été résolue et publiée (Figure 20). Dans cette structure, la sous-unité CcoQ est

absente mais elle serait remplacée par une 4^{ème} sous-unité dont la nature est encore inconnue (Buschmann, Warkentin et al. 2010).

L'oxydase *cbb₃* est répandue aussi bien chez les protéobactéries non photosynthétiques comme *Paracoccus (P.) denitrificans* et *B. japonicum* (Preisig, Zufferey et al. 1996) que chez les protéobactéries photosynthétiques telles que *R. sphaeroides*, *R. capsulatus* et *R. gelatinosus* (Koch, Hwang et al. 1998). Elle est également identifiée chez plusieurs bactéries pathogènes comme *H. pylori* ou encore *Neisseria (N.) meningitidis* (Myllykallio and Liebl 2000).

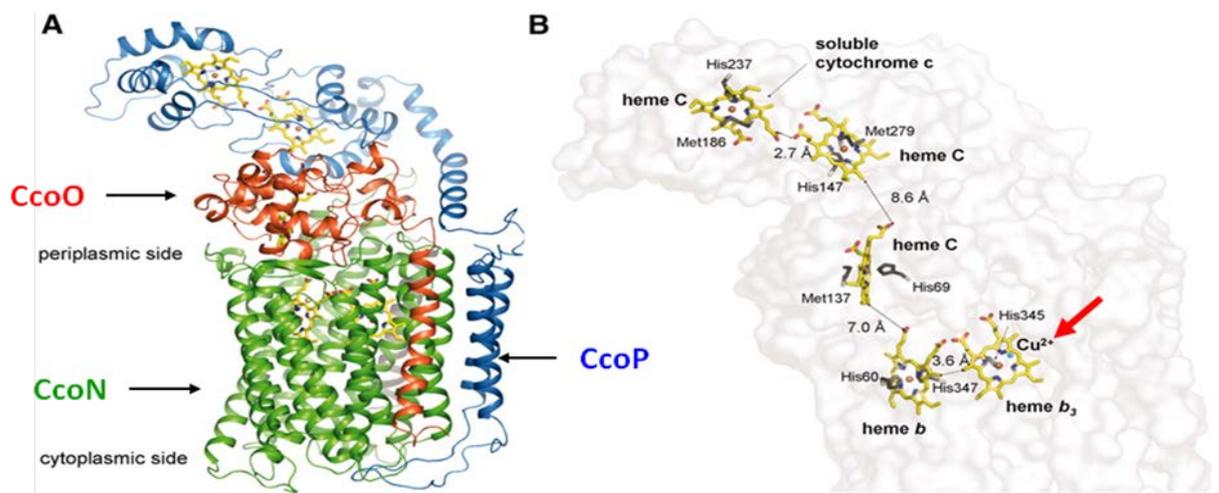


Figure 20: Structure de l'oxydase *cbb₃* de *P. stutzeri*.

A- Structure cristallographique : sous-unité catalytique CcoN représentée en vert, en rouge sous-unité CcoO et en bleu la sous-unité CcoP.
 B- Position des cofacteurs hème (*b* et *c*) et cuivre dans les différents sous-unités de l'oxydase (Buschmann, Warkentin et al. 2010).

ii- Opérons codant les cytochromes c oxydases

L'opéron codant pour les différentes sous-unités de l'oxydase COX de type *cbb₃* a été initialement identifié chez *B. japonicum* et désigné *fixNOQP* (Preisig, Zufferey et al. 1996). Des opérons homologues ont été identifiés chez *R. sphaeroides* et *R. capsulatus* et annotés *ccoNOQP*. De manière générale, en aval des gènes structuraux *ccoNOQP*, l'opéron présente un ensemble de gènes (opéron *ccoGHIS*) codant les facteurs d'assemblage de *cbb₃* (Ducluzeau, Ouchane et al. 2008).

L'opéron qui code les sous-unités des oxydases *cbb*₃ de *R. gelatinosus* a été cloné au laboratoire.

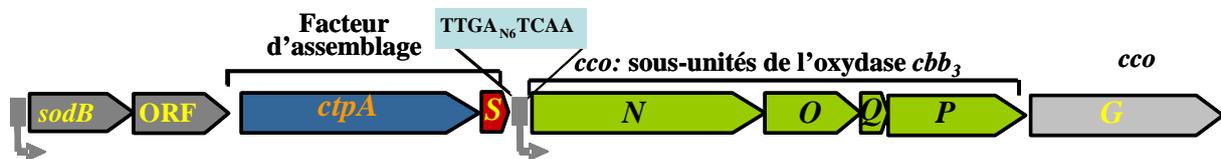


Figure 21 : Organisation des gènes de l'opéron qui code pour l'oxydase *cbb*₃ de *R. gelatinosus*.

En vert (*ccoNOQP*) sont représentés les gènes structuraux du complexe *cbb*₃. Le gène *ccoS* (en rouge) et *ctpA* (en bleu) coderaient pour des facteurs d'assemblage de l'oxydase *cbb*₃. Le produit du gène *ctpA* a un rôle dans la mise en place du Cu au sein de cette oxydase.

Les gènes *ccoNOQP* (Figure 21) codent pour l'oxydase *cbb*₃. En aval des gènes structuraux de l'oxydase *cbb*₃, on trouve le gène *ccoG* qui code pour une polyferrodoxine dont la fonction est inconnue. En amont des gènes *ccoNOQP*, le gène *ctpA* (*ccoI*) code pour une ATPase à cuivre de type CPx impliquée dans le transport du cuivre. Chez *R. capsulatus* et *B. japonicum*, le défaut de croissance du mutant *ccoI* est lié à un défaut d'assemblage de l'oxydase *cbb*₃. Chez *R. gelatinosus*, la protéine CtpA serait également impliquée dans l'assemblage de l'oxydase *cbb*₃ et *caa*₃, vraisemblablement dans la mise en place du cuivre au sein de ces deux complexes (Hassani, Astier et al. 2010).

- Les quinols oxydases

Les quinols oxydases assurent une voie alternative à celle de COX pour réduire l'oxygène. Elles oxydent directement le pool de quinones (provenant du complexe I et/ou II) pour réduire le dioxygène en H₂O, générer un gradient de protons et permettre la production de l'ATP. Ces complexes contiennent différents types de cytochromes, on peut en distinguer deux types : les quinols oxydases de type hème et de type hème-cuivre.

Ces deux types peuvent être présents dans une même bactérie comme, par exemple, chez *E. coli* où une oxydase de type *bo*₃ (oxydase de type hème cuivre) et une oxydase de type *bd* (oxydase hème) ont été identifiées (D'Mello, Hill et al. 1996 ; Murray, Pires et al. 1999).

La majorité des connaissances obtenues sur les structures et les fonctions de ces complexes proviennent des études réalisées chez *E. coli*. Les quinols oxydases sont également

identifiées chez les protéobactéries telles que *R. capsulatus* et *R. sphaeroides*. Chez *R. gelatinosus*, les opérons qui codent pour les deux types de quinol oxydase (*bo* et *bd*) ont été identifiés. Cependant, nous avons montré que seule la quinol oxydase de type hème (*bd*) est fonctionnelle.

L'expression de la quinol oxydase, sa mise en place ainsi que son affinité à l'oxygène changent selon les microorganismes et les conditions environnementales. Chez *E. coli*, l'oxydase de type *bd* présente une forte affinité pour l'oxygène et se met en place dans les conditions de faible oxygénation (micro-aérobie) (Junemann 1997). C'est un complexe hétérodimérique constitué de deux sous-unités CydA et CydB dans lesquelles sont associés respectivement deux hème *b* (*b₅₅₈* et *b₅₉₅*) et un hème *d* de bas potentiel. Les électrons issus de l'oxydation des quinols membranaires passent au niveau de l'hème *b₅₅₈* de bas potentiel de la sous-unité CydA, alors que le cytochrome *b₅₉₅* de haut potentiel interagit avec l'hème *d* pour constituer le site actif où a lieu la réduction de l'oxygène en eau (Hill, Alben et al. 1993).

Les gènes codant pour la quinol oxydase *bd* sont organisés en opéron. Le premier opéron codant *bd* à être identifié est celui d'*E. coli* annoté *cydAB* (Green, Fang et al. 1988). En aval des gènes structuraux de l'oxydase *cydAB*, on trouve souvent les gènes *cydC* et *cydD* codant pour des facteurs d'assemblages du complexe. Ces derniers coderaient pour un transporteur ABC qui serait impliqué dans le transport et la mise en place de l'hème au sein de l'oxydase (Winstedt, Yoshida et al. 1998).

Peu de données sont connues sur les quinols oxydases chez les protéobactéries. Chez *R. gelatinosus*, les gènes de l'opéron *cydAB* codant pour la quinol oxydase de types *bd* ont été clonés. Cependant, les gènes qui coderaient pour *cydC* et *cydD* n'ont pas été identifiés.

III-2.2.2- La respiration anaérobie : la dénitrification

La majorité des bactéries a une grande flexibilité respiratoire. En présence d'oxygène, elles réalisent la respiration aérobie grâce à la chaîne respiratoire. En absence d'oxygène, elles sont capables d'utiliser une gamme variée d'accepteurs d'électrons comme le DMSO, le TMAO, le nitrate, le nitrite... (Richardson 2000). Cette flexibilité respiratoire contribue à la capacité des procaryotes à coloniser plusieurs environnements (aérobie / microaérobie / anaérobie) en adaptant rapidement leur métabolisme en fonction de leur environnement et la

disponibilité du substrat. Les bactéries comme *E. coli* peuvent choisir comme accepteurs d'électrons entre l'oxygène, le nitrate, le nitrite, et les produits de fermentation comme le pyruvate et l'acétate. Le choix de l'accepteur d'électron à utiliser par *E. coli* est souvent régulé par la protéine FNR et la disponibilité du substrat (Potter, Millington et al. 2000). Quand une culture devient anaérobie, le nitrate est souvent privilégié à n'importe quel autre accepteur d'électrons (Potter, Millington et al. 2000).

Paracoccus (P.) denitrificans est un modèle très étudié en raison de la diversité métabolique qu'elle possède. Elle a une remarquable capacité d'utiliser différentes sources d'énergie et de nutriments (Figure 22). Elle détient un métabolisme respiratoire qui lui procure la capacité de proliférer dans diverses conditions d'oxygénation (aérobie, micro aérobie et anaérobie) (Richardson, Felgate et al. 2009 ; Baker, Ferguson et al. 1998).

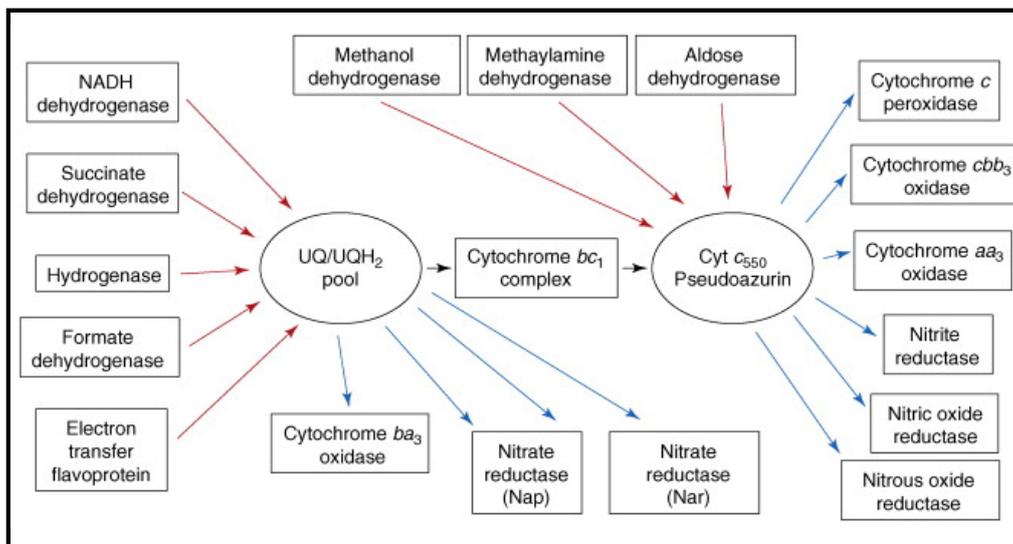


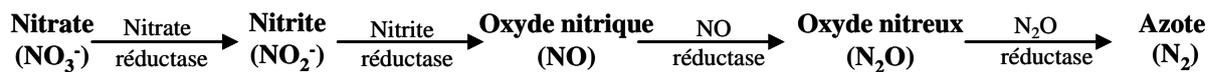
Figure 22 : Présentation schématique des différentes chaînes de transports d'électrons chez *P. denitrificans*.

Le pool d'ubiquinone/ubiquinol et le cytochrome c₅₅₀ / pseudoazurine sont respectivement des transporteurs liposoluble et hydrosoluble d'électrons entre ces différents complexes. Les flèches rouges correspondent aux donneurs d'électrons à ces transporteurs. Les flèches bleues correspondent aux accepteurs d'électrons provenant de ces transporteurs UQ/UQH₂ et c₅₅₀/ pseudoazurine (Baker, Ferguson et al. 1998).

En effet, en présence d'oxygène, elle respire en mettant en jeu la NADH déshydrogénase ou la succinate déshydrogénase en plus des oxydases terminales : les cytochromes oxydases (cbb₃, aa₃), les quinols oxydases ba₃. En anaérobie, elle effectue la respiration anaérobie en mettant en place les enzymes impliqués dans la dénitrification : les

nitrate réductases (Nap et Nar), la Nir, la Nos et la Nor (Figure 22) (Richardson, Felgate et al. 2009 ; Baker, Ferguson et al. 1998).

La dénitrification constitue une des branches principales du cycle d'azote global soutenu par les bactéries. Dans ce processus, le nitrate est réduit en diazote N_2 par une série de réactions catalysées par des réductases spécifiques. Cette conversion fait intervenir différents états redox intermédiaires de l'azote comme le nitrite (NO_2^-), l'oxyde nitrique (NO) et l'oxyde nitreux (N_2O) (Zumft 1997 ; Richardson and Watmough 1999).



La dénitrification peut être soit dissimilatrice soit assimilatrice. La voie dissimilatrice transforme le nitrate ou le nitrite en azote gazeux (N_2O , N_2). Toutes les bactéries dénitrifiantes correspondent à des espèces aérobies qui peuvent réaliser une respiration sur nitrate quand elles sont privées d'oxygène. La dénitrification fonctionne donc comme une respiration productrice d'énergie sous forme d'un potentiel membranaire convertible en ATP (Moreno-Vivian and Ferguson 1998 ; Ferguson 1998 ; Strohn, Tobin O *et al.*, 2006). A l'issue de cette voie dissimilatrice, le produit final gazeux (N_2O , N_2) est dissipé dans l'environnement (Zumft 1997). La voie assimilatrice réduit le nitrate en ammonium utilisé par les cellules pour la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques (Luque-Almagro, Gates et al. 2011).

En effet, certaines bactéries fixatrices d'azote N_2 et dénitrifiantes peuvent fixer de l'azote grâce à une nitrogénase pour produire de l'ammonium NH_4^+ utilisé par la cellule. La réduction dissimilatrice est inhibée par l'oxygène mais pas par la présence d'ammonium contrairement à la réduction assimilatrice

Parmi les protéobactéries, il existe des bactéries possédant une voie partielle de dénitrification et d'autres procédant une dénitrification complète. Dans le génome des bactéries à dénitrification complète telles que *R. sphaeroides* f. sp. *denitrificans* et *R. sphaeroides* 2.4.3 (Sabaty, Schwintner et al. 1999 ; Bartnikas, Tosques et al. 1997), l'ensemble des opérons qui codent pour les différents constituants de la chaîne de dénitrification est présent, contrairement aux bactéries à dénitrification partielle comme *R. sphaeroides* 2.4.1 qui contiennent uniquement la nitrate réductase et la NO réductase (Rock and Moir 2005).

III-2.2.2.1- La nitrate réductase :

La première étape de la chaîne de dénitrification est catalysée par la nitrate réductase qui réduit le nitrate en nitrite (Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999). Il existe quatre types de nitrates réductases assimilatrices chez les eucaryotes et trois différentes enzymes bactériennes de structure et de localisation cellulaire distinctes : assimilatrice cytoplasmique (NAS), respiratoire liée à la membrane cytoplasmique (Nar) et dissimilatrice périplasmique (Nap) (Figure 23) (Morozkina and Zvyagilskaya 2007). Toutes ces enzymes sont à cluster Fe-S et ont du molybdène sous forme de molybdoptérine-guanine dinucléotide (MGD) comme cofacteur au niveau de leur site actif (Zumft 1997).

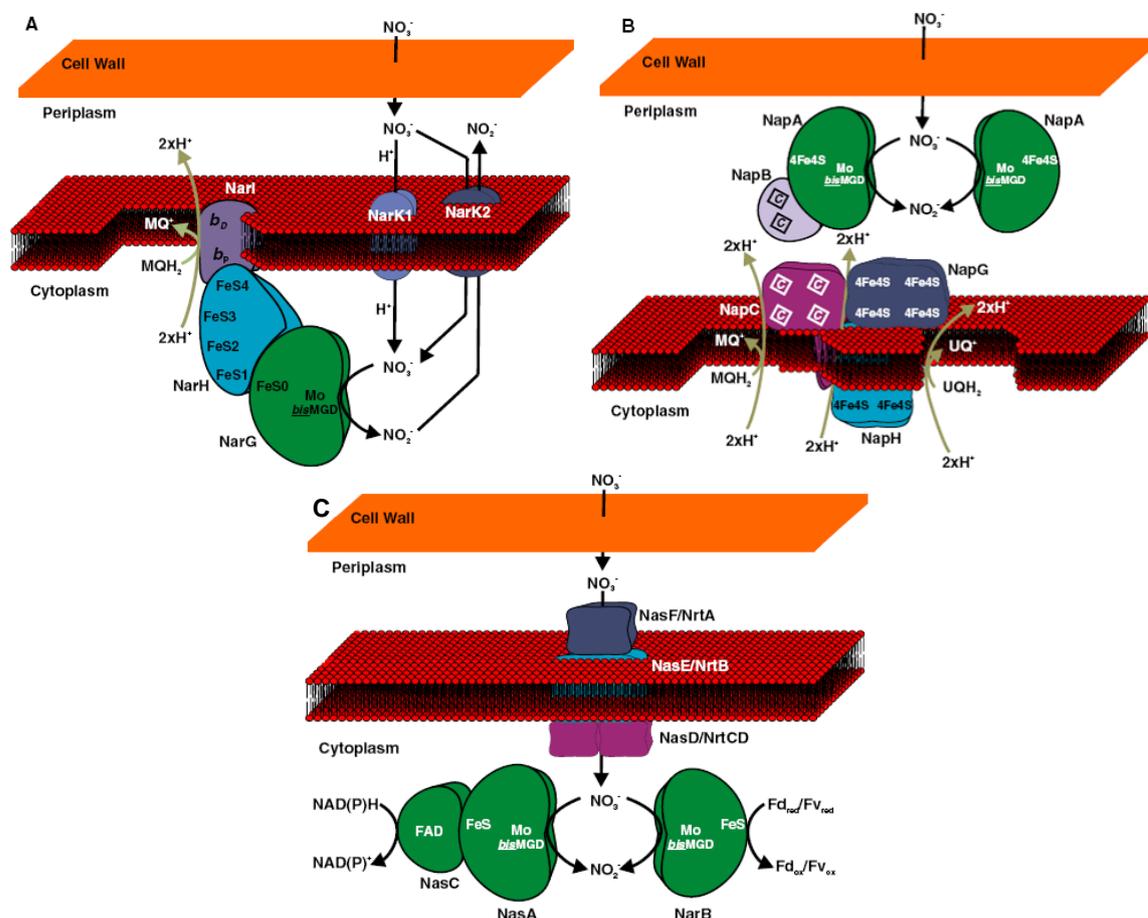


Figure 23 : Les nitrates réductases bactériennes NAR, NAP et NAS.

A- NAR est composée de trois sous-unités structurales NarGHI. Les électrons issus de l'oxydation des quinols au niveau de NarI sont transférés jusqu'à la sous-unité catalytique NarG où le nitrate est réduit. Les transporteurs NarK1 et NarK2 assure le transport du nitrate et du nitrite à travers la membrane. B- NAP est constituée de deux sous-unités NapAB. L'oxydation des quinols a lieu au niveau du complexe NapGHC ou NapC seul. Suite à cette oxydation, les électrons sont transférés vers la sous-unité catalytique NapA. B- NAS est formé de deux sous-unités NasAC. Ce complexe utilise le NAD(P)H comme donneur d'électron. Le transport du nitrate du périplasm vers le cytoplasme est assuré par le complexe NasFED (Gonzalez, Correia et al. 2006).

III-2.2.2.1.1- La nitrate réductase respiratoire : Nar

La nitrate réductase membranaire (Nar) est répandue parmi des entérobactéries et elle est bien étudiée chez *E. coli* (Gonzalez, Correia et al. 2006). L'oxydation des quinols membranaires et la réduction du nitrate par Nar est couplée à la création d'un gradient de proton transmembranaire permettant la synthèse de l'ATP *via* l'ATP synthase.

L'enzyme Nar est constituée de trois sous-unités : une sous-unité catalytique α (NarG) contenant un cofacteur MGD, une sous-unité soluble cytoplasmique β (NarH) contenant un cluster [3Fe-4S] et trois [4Fe-4S], et enfin une sous-unité membranaire γ (NarI) contenant deux hèmes de type *b* (Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999). Les sous-unités solubles α et β sont ancrées du côté cytoplasmique de la membrane par la sous-unité γ . NarI reçoit les électrons des quinols et transloque deux protons dans le périplasme. Les électrons sont transférés *via* les hèmes *b* à la sous-unité NarH. Les électrons sont conduits de NarH *via* le cluster à haut potentiel [3Fe-4S] vers le site catalytique MGD de NarG où le nitrate est réduit en nitrite en utilisant deux protons cytoplasmiques (Gonzalez, Correia et al. 2006). La réduction du nitrate se fait du côté cytoplasmique, nécessitant ainsi le transport du nitrate du périplasme au cytoplasme. Cet import est assuré par deux types de transporteurs : le premier NarK1 dépendant de la force motrice de proton (PMF), le second NarK2, un transporteur de type ABC, utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP, c'est un nitrate/nitrite antiporter (Wood, Alizadeh et al. 2002 ; Moir and Wood 2001 ; Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999 ; Gonzalez, Correia et al. 2006 ; Zumft 1997).

Chez *E. coli*, les gènes qui codent pour la nitrate réductase respiratoire sont groupés en opéron *narGHIIJ*, *narJ* code pour un polypeptide qui participe à l'assemblage de NarGH avant son attachement à la membrane *via* NarI (Gonzalez, Correia et al. 2006).

L'expression de l'opéron *nar* est régulée par un système de régulation à deux composants *narXL* en réponse au nitrate/nitrite. NarX est un senseur de nitrate/nitrite et NarL est un régulateur se liant à l'ADN. Un deuxième système de transduction du signal *narQP*, homologue à *narXL*, régule aussi l'expression des gènes *nar* (Rabin and Stewart 1993 ; Arai, Igarashi et al. 1995). Chez *E. coli*, le régulateur transcriptionnel Fnr joue également un rôle central dans l'expression des gènes du métabolisme anaérobie notamment la dénitrification (Spiro 1994).

Chez *P. aeruginosa* et d'autres espèces de *Pseudomonas*, une protéine Anr de structure et de fonction homologue à Fnr a été identifiée comme nécessaire pour l'induction en cascade de la dénitrification pendant la croissance en présence d'oxyde d'azote (Ye, Haas et al. 1995).

III-2.2.2.1.2- La nitrate réductase périplasmique : Nap

L'enzyme Nap est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique de 90 kDa (NapA), incorporant en N-terminal le MGD comme cofacteur et un cluster [4Fe-4S], et d'une sous-unité NapB contenant deux hèmes de type *c*. NapB reçoit les électrons de la protéine membranaire NapC qui contient quatre hèmes de type *c*. Ce dernier oxyde le pool de quinols membranaires et transloque deux protons qui serviront pour la réduction du nitrate.

La nitrate réductase périplasmique (Nap) semble être dissimilatrice car l'oxydation des quinols par Nap n'est pas directement couplée à la génération d'une force proto-motrice (FPM). Son rôle serait de maintenir une balance redox appropriée nécessaire pour la croissance optimale des bactéries dans certaines conditions physiologiques en particulier pendant le métabolisme oxydant des substrats de carbone fortement réduits comme le butyrate dans les hétérotrophes aérobies ou lors de la croissance photohétérotrophique anaérobie des protéobactéries photosynthétiques comme chez les *Rhodobacter* (Sears, Little et al. 1997 ; Reyes, Gavira et al. 1998 ; Gavira, Roldan et al. 2002).

Chez certaines bactéries telles que *E. coli*, Nap pourrait être impliquée dans la production d'une FPM si un complexe membranaire est impliqué comme donneur d'électrons telle que la NADH déshydrogénase ou la quinol déshydrogénase NapHGC (Kern and Simon 2008 ; Brondijk, Nilavongse et al. 2004). De ce fait, la réduction du pool de quinols membranaires par ces déshydrogénases est couplé à la translocation de protons à travers la membrane, la FPM résultante est suffisante pour soutenir la synthèse de l'ATP (Moreno-Vivian and Ferguson 1998). Il a été montré que Nap joue un rôle dans la dénitrification anaérobie chez *Paracoccus (P.) pantotrophus*, où l'inactivation de Nar entraîne l'induction de l'expression de Nap en anaérobie (Richardson and Watmough 1999). De même, chez *R. sphaeroides* f. sp. *denitrificans* qui peut exprimer chacune des deux nitrates réductases Nar et Nap, la mutation de Nap abolie la dénitrification anaérobie (Liu, Takio et al. 1999 ; Tabata, Yamamoto et al. 2005).

Chez *E. coli*, l'opéron *nap* contient sept gènes *napFDAGHBC* : *napG* code pour une protéine soluble contenant quatre centres [4Fe-4S], *napH* est une protéine membranaire qui lie deux centres [4Fe-4S]. Le complexe NapGH semble être un senseur redox contrôlant le flux d'électrons pour NapA, il s'agirait d'une quinol déhydrogénase (Brondijk, Fiegen et al. 2002 ; Brondijk, Nilavongse et al. 2004 ; Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999).

La régulation de l'expression de l'opéron *nap* varie selon les bactéries. Comme exemple chez *E. coli*, l'opéron *nap* est induit en anaérobiose en présence du nitrate *via* le régulateur Fnr, mais également par NarL et NarP.

III-2.2.2.1.3- La nitrate réductase assimilatrice : Nas

Le complexe Nas intervient dans l'étape initiale de la voie anabolique de l'assimilation de l'azote moléculaire. Deux classes de nitrate réductases assimilatrices sont identifiées dans plusieurs bactéries phototrophes et hétérotrophes. La classification se base sur la structure du cofacteur : Nas ferredoxine / flavodoxine dépendante et Nas NADH dépendante. Les deux types de Nas possèdent un MGD comme cofacteur et un centre fer-soufre en N-terminal.

La composition du complexe Nas varie selon les organismes. L'enzyme Nas NADH dépendante de *R. capsulatus* est un hétérodimère composé d'une sous-unité NasC contenant le cofacteur FAD et la sous-unité catalytique NasA comportant du MGD comme cofacteur et un centre [4Fe-4S] (Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999 ; Gonzalez, Correia et al. 2006).

La localisation cytoplasmique de l'enzyme Nas nécessite le transport du nitrate à l'intérieur de la cellule. Ce transport est assuré par NasFED qui est un transporteur de type ABC chez *R. capsulatus* (Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999). Le nitrite issu de la réduction du nitrate au niveau de NasA est exporté immédiatement au périplasme afin d'être réduit en ammonium NH_4^+ par la nitrite réductase (Gonzalez, Correia et al. 2006).

De même que l'opéron *nap*, les gènes qui codent pour *nas* sont groupés en opéron avec une composition génique différente selon les organismes. Chez *R. capsulatus*, l'opéron *nasRFEDCBA* est régulé positivement par le nitrate et le nitrite *via* le régulateur NasR et réprimé par la présence de l'ammonium (Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999 ; Gonzalez, Correia et al. 2006).

III-2.2.2.2- La nitrite réductase : Nir

La nitrite réductase catalyse la réduction du nitrite en oxyde nitrique (NO) (lors de la dénitrification) ou en ammonium et eau (au cours de l'ammonification). Chez les bactéries dénitrifiantes, il existe deux types d'enzymes respiratoires intervenant dans la réduction du nitrite lors de la dénitrification. Toutes deux sont périplasmiques et se distinguent par leur groupement prosthétique, un cytochrome cd_1 / des centres à cuivre (Figure 23). La réduction du nitrite au cours de l'ammonification est assurée par une nitrite réductase contenant de multiples hèmes de type c (cytochrome c NIR) (Richardson and Watmough 1999 ; Moura and Moura 2001).

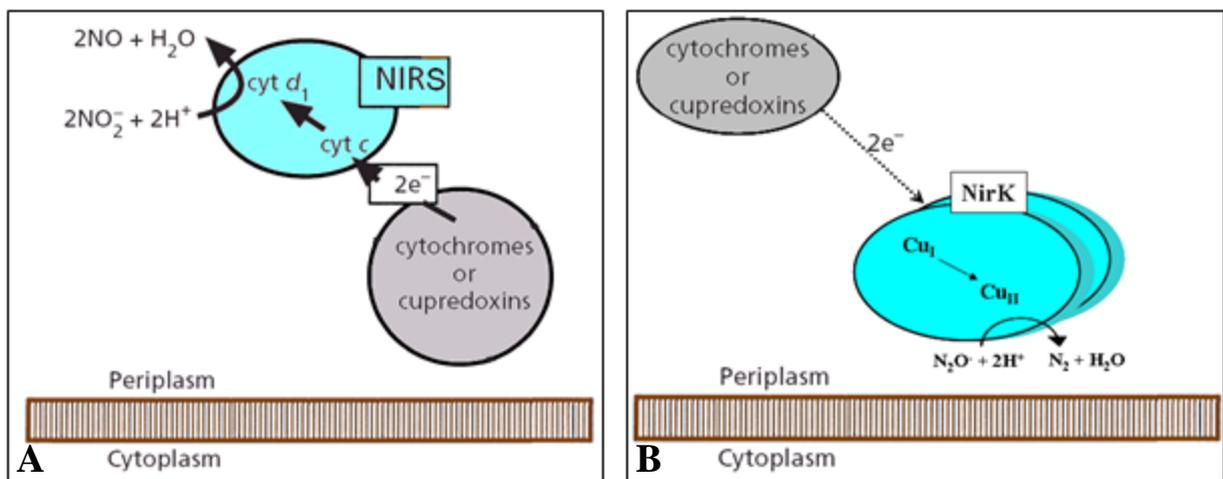


Figure 24 : Représentation schématique des nitrites réductases la cd_1 -NIR et la Cu-NIR.

- A – NIRS est la sous-unité catalytique de la cd_1 -NIR. Les cytochromes ou les cupredoxines fournies les électrons au cytochrome c de la NirS, la réduction du nitrite à lieu au niveau du cytochrome d_1 . (Schéma modifié de David J. Richardson 2000).

- B – NirK est la sous unité catalytique de la Cu-NIR renfermant deux centres à cuivre Cu(I) et Cu(II). Le site Cu(I) accepte les électrons à partir des cytochromes ou les cupredoxines. Les électrons sont par la suite transmissent au site Cu(II) où le nitrate est réduit (Schéma modifié de David J. Richardson 2000).

III-2.2.2.2.1- La nitrite réductase à cytochrome cd_1 : cd_1 NIR

C'est une protéine homodimérique, chaque monomère contient un hème c et un hème d_1 . Du fait que la cd_1 -NIR est capable de réduire l'oxygène en eau, elle a été initialement décrite comme une cytochrome oxydase chez *P. aeruginosa*. L'hème c est le donneur d'électron au site catalytique de l'hème d_1 (Ferguson 1998 ; Zumft 1997). Le gène qui code pour la NIR cytochrome cd_1 est le gène *nirS*. Ce gène a été étudié chez plusieurs espèces

bactériennes comme *P. stutzeri*. Chez cette dernière, l'expression de l'opéron *nirS* requiert la présence de nitrate ou de nitrite en anaérobie (Hartig and Zumft 1999).

III-2.2.2.2- La nitrite réductase à cuivre : CuNIR

La nitrite réductase à cuivre est la plus répandue chez les bactéries dénitrifiantes. C'est une enzyme homotrimérique contenant du cuivre dans deux sites distincts. L'un des deux contient trois cuivre de type I et constitue le centre redox qui accepte les électrons du donneur d'électron. L'autre centre est composé de trois cuivres de type II et constitue le site catalytique où a lieu la réduction du nitrite. Selon les propriétés spectroscopiques du centre à cuivre de type I, deux groupes ont été définis pour les CuNIR : les réductases ayant une absorbance à 590 nm procurent une couleur bleu intense alors que celles qui absorbent à 460 nm et 600 nm confèrent une couleur verte à la protéine (Moura and Moura 2001 ; Ferguson 1998 ; Zumft 1997).

La Cu-NIR est codé par le gène *nirK*. Chez *R. sphaeroides* 2.4.3 l'expression de *nirK* est maximale quand la concentration du milieu en oxygène devient faible (microaérobie) et que le nitrate ou nitrite est disponible (Tosques, Shi et al. 1996). Au contraire, chez *R. sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106, le nitrate n'induit pas l'expression de *nirK* mais l'inducteur réel est le produit de réduction de la nitrite réductase (Sabaty, Schwintner et al. 1999).

III-2.2.2.3- L'oxyde nitrique réductase : Nor

Le complexe Nor est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de deux électrons du NO en N₂O. Les Nor des bactéries sont des parents proches des oxydases respiratoires de type hème-cuivre (la cytochrome *c* oxydase *cbb₃*) (Castresana, Lubben et al. 1994). Il existe plusieurs types de réductase Nor chez les bactéries. La NO réductase bactérienne la plus commune est composée de deux sous-unités NorC et NorB. La petite sous-unité NorC contient un hème de type *c* et la grande sous-unité NorB contient deux hèmes de type *b* et un fer non hémique Fe_B. NorB présente des similitudes avec la sous-unité catalytique de l'oxydase *cbb₃*.

La différence principale entre ces deux dernières est la composition du centre dinucléaire qui contient le fer non hémique Fe_B plutôt que du cuivre Cu_B (Richardson 2000 ; Zumft 1997). L'entrée d'électron se fait par NorC, le donneur d'électrons est soit un cytochrome périplasmique le *c₅₅₀* soit une cuprédoxine (azurine ou pseudo-azurine). NorC

approvisionne la sous-unité catalytique NorB en électrons. Les gènes impliqués dans la structure, l'activité et l'assemblage de Nor sont organisés en opéron. L'organisation et le nombre des gènes qui codent pour Nor varient selon les bactéries dénitrifiantes. Chez *R. sphaeroides*, l'opéron est composé de quatre gènes *norCBQD*. Les gènes *norQD* auraient un rôle dans la formation d'un complexe Nor actif. L'expression de cet opéron est induite lorsque la concentration en oxygène est faible et le nitrate présent dans le milieu (Bartnikas, Tosques et al. 1997).

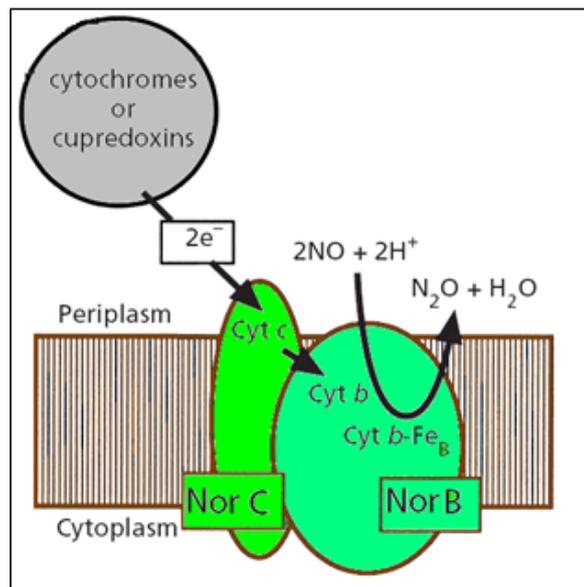


Figure 25 : Représentation schématique de la nitrique oxyde réductase (Nor).

La Nor est un complexe membranaire constitué de deux sous-unités NorC et NorB. NorC accepte les électrons *via* son cytochrome *c* à partir des cytochromes ou des cupredoxins. Les électrons sont ainsi transférés au cytochrome *b* de la sous-unité catalytique NorB puis au centre cytochrome *b*-Fe_B pour réduire le NO en N₂O (Schéma modifié de Richardson 2000).

III-2.2.2.4- L'oxyde nitreux réductase Nos

L'ultime étape de la dénitrification est catalysée par l'oxyde nitreux réductase (NosZ) qui réduit le N₂O en N₂. C'est une enzyme homodimérique localisée dans le périplasme, chaque dimère contient deux centres à cuivre. Un centre binucléaire de cuivre Cu_A et un centre tétranucléaire Cu_Z composé de quatre atomes de cuivre et un atome de soufre. Le centre binucléaire de cuivre Cu_A ressemble à celui des cytochromes *c* oxydases. Les électrons passent du centre Cu_A au centre catalytique Cu_Z (Zumft 1997 ; Moura and Moura 2001).

La nitrous oxyde réductase est codée par l'opéron *nosRZDFYL* chez *P. aeruginosa*. Les produits des gènes *nosDFY* sont impliqués dans le transport du soufre au sein de la N₂OR. Le gène *nosL* code pour une lipoprotéine de la membrane externe et semble être une chaperonne à cuivre. Elle délivrerait le cuivre à NosZ. Au final, *nosR* semble être un régulateur senseur du N₂O requis pour l'expression de l'opéron *nos*. Le promoteur de *nosR* est activé par le régulateur Dnr (homologue à Fnr) en présence de NO (Arai, Mizutani et al. 2003).

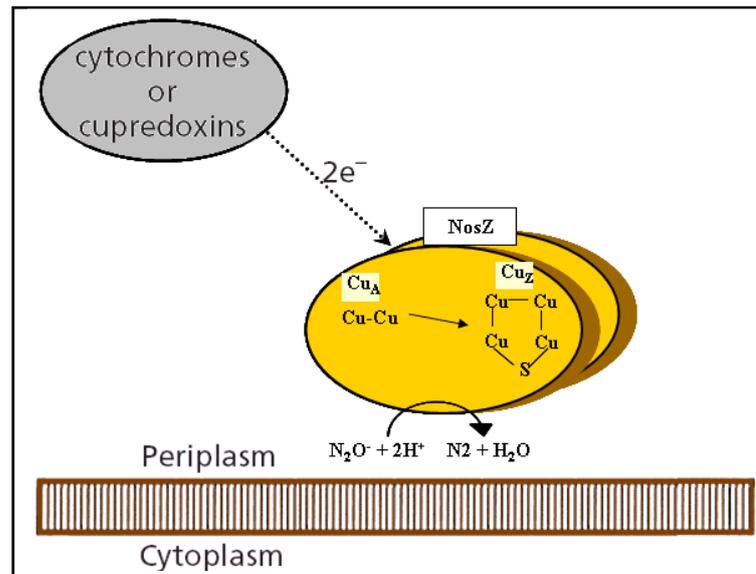


Figure 26 : Représentation schématique de la nitrous oxyde réductase (NosZ).

NosZ (la N₂O réductase) est une enzyme à cuivre périplasmique qui réduit le N₂O en N₂. C'est un homodimère constitué de deux sous-unités NosZ contenant un centre binucléaire à cuivre, Cu_A, et un centre tétranucléaire Cu_Z contenant quatre atomes de cuivre et un atome de soufre (de type Cu-S). Le centre Cu_A reçoit les électrons venant des cytochromes ou des cupredoxines pour les transférer vers le centre Cu-S, le site catalytique (Schéma modifié de Richardson 2000).

III-2.2.2.5- La chaîne de transport des électrons au cours de la dénitrification

Plusieurs études sur les différents complexes (Nar, Nir, Nor, Nos) impliqués dans la dénitrification sont disponibles. Le transport d'électrons à travers ces complexes fait intervenir une déshydrogénase comme donneur d'électrons. En anaérobiose, *E. coli* peut utiliser plusieurs composés comme donneur d'électrons tels que le formate, l'hydrogène, le NADH, le lactate, etc... (Richardson 2000 ; Zumft 1997)

En absence d'oxygène, le cofacteur liposoluble habituellement impliqué dans le transfert d'électrons entre les déshydrogénases et les réductases est la ménaquinone (MQ). En effet, chez la majorité des bactéries, l'ubiquinone (Q) prédomine en aérobie alors que la MQ prime en anaérobie quand l'état des cellules est plus réduit (Simon, van Spanning et al. 2008).

Cependant quelques exceptions existent où l'ubiquinone est utilisée à la place de la MQ, c'est le cas de la NADH déshydrogénase.

En présence de formate et de nitrate, *E. coli* induit l'expression de la formate déshydrogénase-N (Fdh-N) pour oxyder le formate en dioxyde de carbone. A cette oxydation est couplé le transfert d'électrons au pool de ménaquinones (MQ) membranaires. En parallèle, la Fdh-N participe à la translocation à travers la membrane de deux protons dans le cytoplasme. Les ménaquinones fournissent la nitrate réductase (Nar) en électrons afin de catalyser la réduction du nitrate en nitrite. La réduction du nitrate se fait au niveau de la sous-unité catalytique NarG du côté cytoplasmique nécessitant ainsi l'import du nitrate dans ce compartiment par les transporteurs NarK1/NarK2.

Les deux complexes membranaires (Fdh-N et Nar) coopèrent ainsi pour produire une force motrice de protons (PMF) (Jormakka, Byrne et al. 2003). Le nitrite est ensuite réduit par la nitrite réductase périplasmique (Cu-NIR ou *cd₁*-NIR) en oxyde nitrique (NO). Le donneur préféré d'électrons pour la Cu-NIR est une cuprédoxine, c'est une protéine d'oxydoréduction contenant du cuivre telle que l'azurine et la pseudo-azurine (Pearson, Page et al. 2003). Alors que la *cd₁*-NIR est plutôt réduite par les cytochromes *c₅₅₁* (Zumft 1997 ; Cabello, Roldan et al. 2004). La cuprédoxine et les cytochromes *c₅₅₁* sont réduits par le complexe *bc₁*.

Le complexe membranaire NO réductase (NOR) reçoit les électrons des cytochromes *c* réduits provenant du complexe *bc₁* pour réduire le NO en oxyde nitreux (N₂O). Ce dernier est à son tour réduit en diazote par la N₂O réductase (NosZ) en utilisant les électrons provenant des cytochromes *c* ou de cuprédoxines réduites préalablement par le complexe *bc₁*. L'activité des différents complexes de la voie de dénitrification permet de générer un gradient transmembranaire de protons *via* la déshydrogénase et le complexe *bc₁* qui fournissent les électrons nécessaires pour la catalyse des différentes réactions de dénitrification (Zumft 1997) (Figure 26).

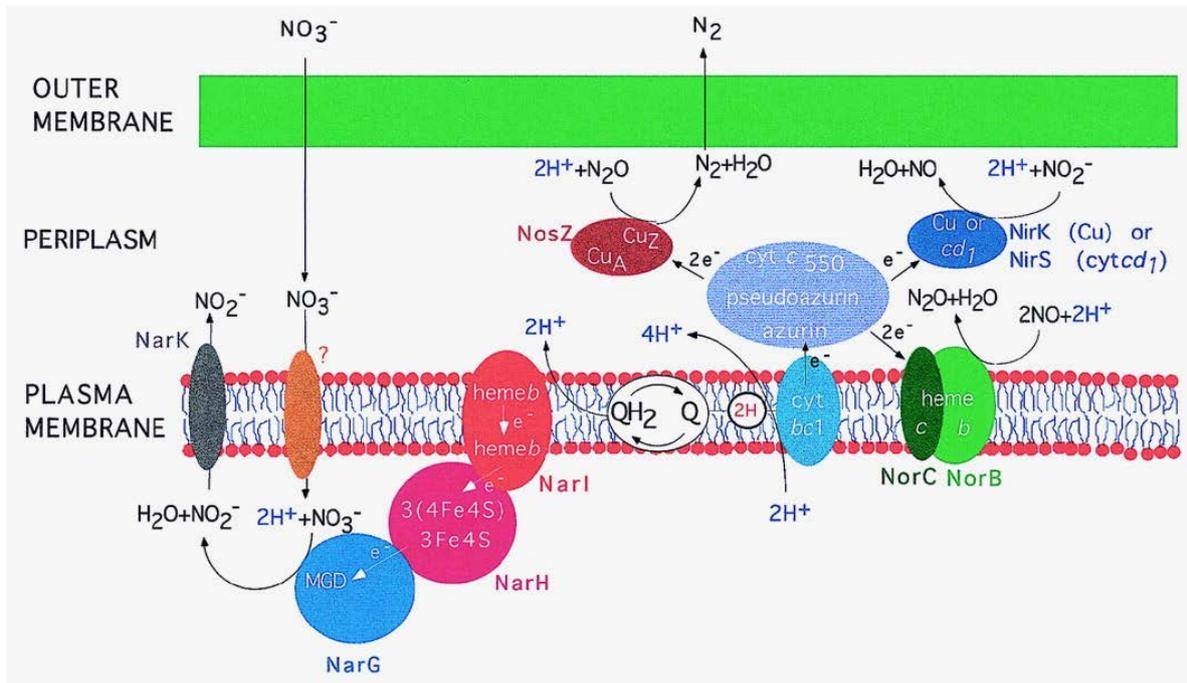


Figure 27 : La chaîne de transport des électrons au cours de la dénitrification.

La nitrate réductase membranaire Nar est constituée de trois sous-unités structurales NarGHI. Les électrons issus de l'oxydation des quinols (QH₂) au niveau de NarI (en rouge) sont transférés *via* NarH (en rose) jusqu'à la sous-unité catalytique NarG (en bleu claire) où le nitrate est réduit en nitrite. Les transporteurs NarK1 et NarK2 (noir et orange) assure le transport du nitrate et du nitrite à travers la membrane. Le nitrite est ensuite réduit par l'une des deux nitrites réductases périplasmiques (Cu-NIR ou *cd*₁-NIR) (en bleu marine) en oxyde nitrique (NO). Le donneur d'électrons pour la Cu-NIR est l'azurine ou la pseudo-azurine. La *cd*₁-NIR est réduite par les cytochromes *c*₅₅₁. Ces transporteurs d'électrons (en bleu) sont réduits par le complexe *bc*₁. La sous-unité NorC (vert foncé) de la Nor obtient les électrons *via* son cytochrome *c* à partir des cytochromes ou des cuprodoxines. Les électrons sont ainsi transférés au cytochrome *b* de la sous-unité catalytique NorB (vert claire) puis au centre cytochrome *b*-Fe_B pour réduire le NO en N₂O. Le centre Cu_A de NosZ reçoit les électrons venant des cytochromes ou des cuprodoxines pour les transférer vers le centre Cu-S, le site catalytique réduisant le N₂O en diazote (Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999).

III-3- La régulation des métabolismes énergétiques :

Les bactéries pourpres ont la capacité à s'adapter rapidement aux variations environnementales (en oxygène et lumière). En effet, les bactéries en général détectent les variations des conditions de leur environnement et s'adaptent à ces variations. En particulier, les bactéries pourpres détectent les variations de l'oxygène et de la lumière en mettant en place les complexes nécessaires à leur croissance soit en photosynthèse soit en respiration.

En présence de lumière et en anaérobie, ces bactéries vont synthétiser les complexes photosynthétiques qui vont assurer leur croissance *via* la photosynthèse. Par contre en aérobie,

la présence de l'oxygène favorise le métabolisme respiratoire chez ces microorganismes qui mettent en place dans la membrane les différents complexes de la chaîne respiratoire. Enfin, en anaérobie et obscurité, les bactéries en présence d'oxyde d'azote (Nitrate/Nitrite) ou de DMSO mettent en place les réductases respiratoires de la dénitrification ou la DMSO réductase. Ces métabolismes nécessitent alors une régulation étroite afin d'assurer la synthèse des complexes requis pour chaque mode de croissance. D'autre part, la présence simultanée de l'oxygène et de la lumière peut générer un stress photooxydatif nocif pour la cellule.

Afin d'éviter ce stress, les bactéries épuisent l'oxygène du milieu avant la mise en place des complexes photosynthétiques et le passage à la photosynthèse (Hassani, Steunou et al. 2010). Ceci implique plusieurs voies de régulation transcriptionnelle faisant intervenir plusieurs protéines capables de détecter les changements extérieurs tels que la modification de la teneur en O₂ ou encore de l'intensité et la qualité de la lumière. Les protéines sont ensuite capables d'activer et/ou de réprimer les gènes cibles. Tant que l'O₂ est présent dans le milieu, les bactéries induisent l'expression des oxydases terminales et répriment les gènes de la photosynthèse. Peu de choses sont connues sur la régulation des gènes par la lumière contrairement aux régulations induites par l'oxygène. Ces dernières sont bien étudiées chez *R. sphaeroides* et *R. capsulatus*. Les trois systèmes majeurs de régulation par l'oxygène ont été caractérisés chez ces bactéries : les systèmes FnrL, PpsR/AppA et RegA/RegB. Jusqu'à présent, le laboratoire a identifié chez *R. gelatinosus* deux facteurs sensibles à la concentration en O₂ dans le milieu : FnrL et PpsR.

III-3.1- Le facteur FnrL

Le régulateur FnrL, présent chez la majorité des protéobactéries, est l'analogue du régulateur Fnr (Fumarate and nitrate regulator) d'*E. coli*. Chez ces bactéries, FnrL est un facteur transcriptionnel qui, en réponse à une faible concentration en oxygène, contrôle l'expression d'un ensemble de gènes impliqué dans les processus microaérobie ou anérobie comme la respiration. La protéine FnrL présente en N-terminal 4 cystéines participant à la formation d'un centre [4Fe-4S], un domaine central de dimérisation et en C-terminal un domaine hélice-tour-hélice caractéristique des protéines se fixant à l'ADN. Ce facteur est capable de détecter l'oxygène présent dans le milieu grâce à son cluster [4Fe-4S] labile. En absence d'oxygène, FnrL sous forme de dimère induit l'expression des gènes cibles. En présence d'oxygène, le cluster [4Fe-4S] se transforme en [2Fe-2S] empêchant la dimérisation

de la protéine, la rendant ainsi inactive (Figure 27). Par ce biais de réduction du cluster [4Fe-4S] et de dimérisation de la protéine, FnrL détecte indirectement l'oxygène du milieu et induit la réponse requise (Moore and Kiley 2001 ; Zeilstra-Ryalls and Kaplan 2004).

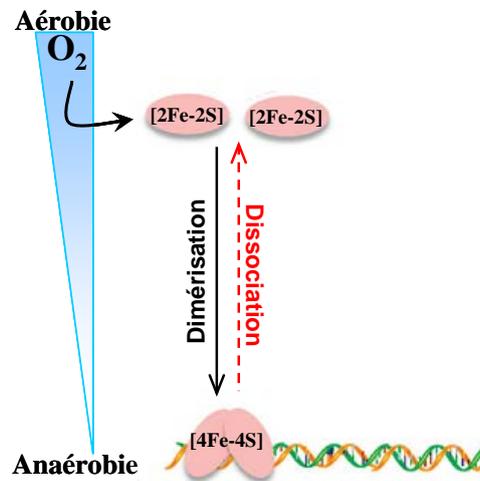


Figure 28 : Représentation schématique de la régulation par FnrL.

En anaérobiose, la formation d'un cluster [4Fe-4S] permet la dimérisation de FnrL ce qui induit l'expression des gènes cibles. En aérobiose, le cluster [4Fe-4S] se transforme en [2Fe-2S] empêchant la dimérisation de la protéine, la rendant ainsi inactive (Moore and Kiley 2001).

C'est sous forme de dimère que cette protéine se fixe sur les promoteurs au niveau d'une séquence consensus palindromique TTGA-N₆-TCAA. Chez *R. gelatinosus*, ce palindrome est présent en amont d'un certain nombre de gènes notamment *bchE* et *hemN* activant leur transcription en condition de faible oxygénation, mais on le trouve aussi en amont de quelques opérons impliqués dans le métabolisme respiratoire comme par exemple *ccoNOQP*, codant pour l'oxydase *cbb₃* (Ouchane, Picaud et al. 2007).

Chez *R. gelatinosus* comme chez *R. sphaeroides* et *R. capsulatus*, FnrL a un rôle important dans la mise en place de la respiration en micro-aérobiose et de la photosynthèse. Le facteur FnrL est un activateur des gènes impliqués dans la biosynthèse des porphyrines (hèmes et BChls) (Zeilstra-Ryalls and Kaplan 1995 ; Zeilstra-Ryalls, Gomelsky et al. 1998).

Chez les bactéries, le gène qui code pour FnrL est localisé en amont de l'opéron qui code pour l'oxydase *cbb₃* (opéron *ccoNOQP*) (Koch, Hwang et al. 1998 ; Ouchane, Picaud et al. 2007).

III-3.2- Le régulateur transcriptionnel PpsR

Le facteur PpsR régule les gènes photosynthétiques en présence d'oxygène. Selon les bactéries, il est généralement un répresseur et dans certains cas il peut jouer le rôle d'activateur de ces gènes.

La protéine PpsR possède un domaine hélice-tour-hélice (HTH) en C-terminal et appartient à la superfamille des protéines à domaines PAS. Ces domaines PAS interviennent dans la détection de divers signaux (état redox, lumière, etc). PpsR possède également deux cystéines très conservées, une localisée dans le domaine HTH et l'autre entre les deux domaines PAS. Chez *R. capsulatus*, il a été montré que ces cystéines jouent un rôle important dans l'activation de PpsR. En présence d'oxygène, ils forment un pont disulfure et augmente ainsi l'affinité de PpsR pour ses promoteurs cibles réprimant ainsi l'expression de ces gènes (Masuda and Bauer 2002) (Figure 28).

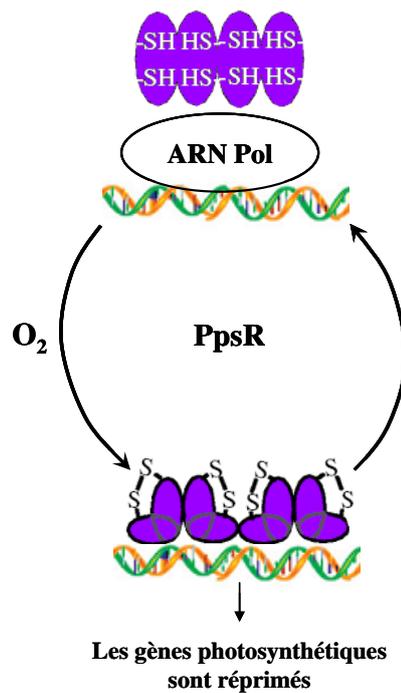


Figure 29 : Contrôle de l'activité de PpsR par la formation d'un pont disulfure.

En aérobic, les cystéines forment un pont disulfure ce qui augmente l'affinité de PpsR pour ses promoteurs cibles réprimant ainsi l'expression des gènes photosynthétiques. En anaérobic, les ponts disulfures sont réduits générant ainsi une levée d'inhibition au niveau des promoteurs notamment ceux des gènes photosynthétiques (Schéma modifié à partir Masuda and Bauer 2002)

Le facteur transcriptionnel PpsR est capable de se fixer à l'ADN au niveau de deux sites palindromiques consensus (TGT-N₁₂-ACA). Des études effectuées chez *R. sphaeroides* et *R. capsulatus* ont montré que PpsR est un répresseur des gènes photosynthétiques en présence

d'oxygène et que deux palindromes sont nécessaires pour une répression efficace (Moskvin, Gomelsky et al. 2005). PpsR agit sous forme de tétramère. Deux monomères se fixent sur chaque palindrome. La fixation de PpsR sur les palindromes se fait de façon coopérative (Elsen, Ponnampalam et al. 1998). Chez *R. sphaeroides*, l'activité de PpsR est contrôlée par la protéine AppA qui répond à deux stimuli, l'oxygène et la lumière (Gomelsky and Kaplan 1997).

Bradyrhizobium ORS278, possède deux protéines PpsR : PpsR1 est un activateur tandis que PpsR2 est un répresseur. Les deux protéines reconnaissent les mêmes motifs TGT-N₁₂-ACA au niveau des promoteurs *crt* et *bch* (codant des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et des bactériochlorophylles, respectivement). L'interaction de PpsR1 avec l'ADN est indépendante de l'état redox du milieu, alors que PpsR2 se fixe plus fortement en milieu réduit qu'en milieu oxydé (Giraud, Pignol et al. 2003).

Chez *R. gelatinosus*, il a été montré que PpsR est à la fois répresseur et activateur. En semi-aérobie, il réprime le gène *crtI* (gène impliqué dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes) et active les gènes *pucBA* (gènes codant pour l'antenne collectrice de lumière LH2) (Steunou, Astier et al. 2004). L'étude de la région promotrice des gènes *crtI* et *pucBA* a permis d'identifier la présence de deux sites palindromiques nécessaires à la fixation de PpsR. Ces séquences possèdent quelques différences avec la séquence consensus connue TGT-N₁₂-ACA-N_x-TGT-N₁₂-ACA (Steunou, Astier et al. 2004).

En dehors des gènes photosynthétiques, PpsR joue un rôle dans la régulation d'autres gènes. Il a été montré chez *R. capsulatus* que PpsR réprime l'expression de l'ubiquinol oxydase en présence de forte oxygénation (Swem, Elsen et al. 2001; Swem and Bauer 2002).

Chez *R. gelatinosus*, il a été également suggéré que PpsR serait également impliqué dans la régulation de l'oxydase *bd* en aérobie. En effet, il a été observé que le mutant *cbb₃⁻-ppsR⁻* pousse en photosynthèse, mais contrairement au simple mutant *cbb₃⁻*, ce double mutant ne pousse pas en respiration (ni en microaérobie ni en aérobie), ce qui suggère que l'oxydase *bd* n'est plus fonctionnelle et que PpsR régulerait positivement l'oxydase *bd* en aérobie soit directement ou indirectement (Steunou et al. Résultat non publié).

III-3.3- Le système RegA/RegB

Ce système à double composants senseur du signal RegB / régulateur RegA est identifié chez de nombreuses bactéries photosynthétiques et non photosynthétiques comme *R. capsulatus* et *B. japonicum*. En absence d'oxygène, l'histidine kinase membranaire RegB s'autophosphoryle. La protéine RegB transfère le groupement phosphate à RegA qui va se fixer sur l'ADN sous forme de dimère (Bauer C, Elsen S *et al.*, 2002). RegB est capable de réguler plusieurs gènes en dehors des gènes photosynthétiques. Des études ont révélé que l'activité de RegB serait régulée par l'état redox du pool de quinones membranaires (Swem, Swem *et al.* 2005). En effet, dans le domaine transmembranaire de RegB un site de fixation de la quinone fortement conservé a été identifié, ceci indique que cette région joue un rôle de senseur redox (Swem, Swem *et al.* 2005). Ce domaine transmembranaire est suivi d'un domaine cytosolique contenant le domaine d'autophosphorylation et une cystéine sensible à l'état redox. Cette cystéine est capable de réguler l'activité de la kinase RegB en formant un pont disulfure intermoléculaire en réponse à l'état redox (Swem, Kraft *et al.* 2003). Le système RegA/RegB régule plusieurs voies métaboliques aussi bien aérobie qu'anaérobie. Il induirait l'expression de la nitrate réductase à cuivre CuNIR lors de la dénitrification chez *R. sphaeroides* (Laratta, Choi *et al.* 2002). Chez *R. capsulatus*, RegA interviendrait dans la régulation positive des oxydases terminales *cbb₃* et *bd* (Swem, Elsen *et al.* 2001). RegA/RegB est un régulateur global non spécifique de la photosynthèse (Wu J and Bauer CE 2008). Par ailleurs, ce régulateur n'est pas présent chez *R. gelatinosus*.

Objectif de la thèse

Rubrivivax gelatinosus est une β -protéobactérie. Cette bactérie est dotée de deux métabolismes énergétiques lui permettant de se développer dans deux conditions environnementales différentes en oxygène et en lumière. En présence de lumière et en anaérobiose, elle effectue la photosynthèse. A l'obscurité et en micro-aérobiose, elle respire grâce à la mise en place dans la membrane des complexes respiratoires notamment l'oxydase terminale de type hème-cuivre *cbb₃*. Cette dernière est l'accepteur final d'électrons et assure la réduction de l'oxygène en eau au niveau de son centre binucléaire composé d'hème *b₃* et de cuivre Cu_B localisé dans la sous-unité catalytique CcoN. Dernièrement, le laboratoire s'est intéressé à la biogenèse des cytochromes *c* oxydases chez cette bactérie et plus particulièrement à la mise en place du cuivre dans ces complexes. Dans ce contexte, une ATPase de type CPx CtpA homologue à des transporteurs de cuivre membranaire impliqués dans les systèmes d'homéostasie du cuivre a été identifiée (Hassani, Astier et al. 2010).

Des études menées sur le mutant *ctpA*⁻ ont montré que cette bactérie tolère une forte concentration en cuivre. Les résultats de ce travail ont montré que CtpA n'a pas de rôle dans cette tolérance au cuivre et ont suggéré la présence d'une autre ATPase de type CPx nécessaire à la tolérance au cuivre. Ce travail a également permis l'identification de l'enzyme NosZ qui catalyse la dernière étape de la voie de dénitrification en réduisant l'oxyde nitreux (N₂O) en diazote N₂ suggérant pour la première fois l'existence de la voie de dénitrification dans cette bactérie (Hassani, Astier et al. 2010).

Dans ce contexte, mon projet de thèse s'est organisé autour de deux axes de recherche. Le premier axe de recherche porte sur l'homéostasie du cuivre et l'identification des composants du système de tolérance au cuivre chez *Rubrivivax*. Le deuxième axe consiste à caractériser les différents acteurs qui pourraient jouer un rôle dans la respiration anaérobie *via* la dénitrification chez cette bactérie. L'ensemble de données obtenues au cours de ma thèse est présenté sous forme de deux chapitres dans la partie Résultats.

Chapitre I : Dans le premier volet de cette étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du système de tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus* et à la caractérisation d'une deuxième Cu⁺-ATPase, CopA homologue à CtpA.

Dans la deuxième partie de cette étude, je présente l'identification de CopI et CopJ protéines potentiellement partenaires de CopA et susceptibles d'être impliquées dans la tolérance au cuivre.

Chapitre II : Dans ce chapitre je présente des résultats sur la caractérisation de la voie de dénitrification chez *R. gelatinosus*.

RESULTATS

Chapitre I : l'homéostasie du cuivre

Etat de l'art à mon arrivée au Laboratoire :

Comme souligné dans l'introduction, des études menées au laboratoire par Bahia Khalfaoui au cours de sa thèse ont mis en évidence le rôle d'un transporteur ATPasique de cuivre (CtpA) dans la biogenèse et l'activité des cupro-enzymes (oxydases type hème-cuivre *cbb₃*, l'oxydase *caa₃*, NosZ) chez la protéobactérie *R. gelatinosus*. En revanche, CtpA n'est pas nécessaire pour la croissance de *R. gelatinosus* sur un milieu à forte concentration en cuivre (Hassani, Astier et al. 2010) malgré les homologies de séquence entre CtpA de *R. gelatinosus* et l'ATPase d'efflux CopA impliquée dans la tolérance au cuivre chez plusieurs bactéries (Rensing, Fan et al. 2000 ; Odermatt, Suter et al. 1993). Ces résultats ont suggéré l'existence d'un système indépendant de CtpA ayant un rôle dans l'efflux du cuivre chez *R. gelatinosus*. Au cours de ma thèse j'ai donc poursuivi l'étude initiée par Bahia Khalfaoui et étudié l'homéostasie du cuivre chez *R. gelatinosus*. Cette recherche a aboutit à l'identification de plusieurs gènes impliqués dans la tolérance au cuivre chez cette bactérie, et à l'identification de certaines cibles de l'excès de cuivre qui pourraient expliquer sa toxicité dans le mutant *copA*⁻. Le premier chapitre décrit donc l'identification de l'ATPase CopA de *R. gelatinosus* et son rôle dans la tolérance au cuivre. La sélection du mutant *copA*⁻ m'a permis d'aborder la question de l'effet du cuivre sur la respiration et la photosynthèse dans un mutant incapable d'éliminer l'excès de cuivre. Ce chapitre a fait l'objet de l'article 1. Dans la seconde partie, je décris l'identification et le rôle de deux autres gènes codant des protéines solubles périplasmiques jusqu'ici inconnues. En particulier, je présente les études qui nous ont permis d'assigner à CopI un rôle important dans la tolérance au cuivre.

Partie I : Identification d'une deuxième ATPase à cuivre impliquée dans la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus* et effet du cuivre excédentaire sur les métabolismes énergétiques, respiration et photosynthèse

I-1-Résumé de l'Article I : Coproporphyrin III excretion identifies the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN as a copper target in the Cu⁺-ATPase mutant *copA*⁻ of *Rubrivivax gelatinosus*

La sécrétion de la coproporphyrine III en anaérobie indique que coproporphyrinogène III oxydase (HemN) est la cible du cuivre dans le mutant *copA*⁻ chez *Rubrivivax gelatinosus*.

I-1.1- Identification des gènes *copA/R/H/I/J* codant une 2ème ATPase à cuivre chez *R. gelatinosus*

L'article présente dans un premier temps l'identification des gènes impliqués dans la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus* par transposition. Dans des conditions de respiration ou de photosynthèse anaérobie, la souche sauvage de *R. gelatinosus* tolère jusqu'à 1,8 mM de CuSO₄. L'inactivation de gènes impliqués dans l'efflux du cuivre dans la souche sauvage par le transposon Tn5 a engendré des souches avec une capacité réduite de croître sur des milieux supplémentés en cuivre. L'analyse du site d'insertion du transposon dans ces mutants sensibles au cuivre a permis l'identification des gènes *copA/R/H/I/J*. Le gène *copA* code pour une ATPase de type CPx qui transporterait le Cu(I) à travers la membrane cytoplasmique et présente une homologie de 57% (28,4% d'identité, 28,6% de similitude) avec CtpA de *R. gelatinosus*. Le second gène *copR* code pour un régulateur transcriptionnel de la famille MerR qui serait sensible au Cu. Les gènes *copH*, *copI* et *copJ* codent pour des protéines prédites solubles et périplasmiques de fonctions inconnues.

I-1.2- Rôle de CopA dans la tolérance au cuivre

Pour vérifier et confirmer le rôle de CopA dans la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus*, nous avons inactivé le gène *copA* par insertion de cassettes de résistance à des antibiotiques dans la souche sauvage et dans le mutant *ctpA*⁻.

L'analyse des mutants simples *ctpA*⁻, *copA*⁻ et du double mutant *ctpA*⁻*copA*⁻ comparés au sauvage (wt) en présence de concentrations croissantes en cuivre montre que ce mutant *copA*⁻ ne pousse pas au-delà de 100 µM de CuSO₄ en photosynthèse

anaérobie, contrairement au wt et au mutant *ctpA*⁻ qui poussent jusqu'à 1,8 mM de CuSO₄. De la même façon en respiration, la croissance du mutant *copA*⁻ s'arrête à 200 µM de cuivre comparé au wt et au mutant *ctpA*⁻ qui continuent à croître en présence de 1,8 mM de CuSO₄.

Nous avons également étudié l'expression du gène *copA* en réponse à des concentrations croissantes en cuivre aussi bien au niveau des transcrits par RT-PCR qu'au niveau protéique en générant une souche exprimant une forme étiquetée de CopA (CopA-His₆). Les résultats obtenus montrent que l'expression de *copA* est induite en présence de cuivre.

I-1.3- Régulation de l'expression de *copA* par le régulateur transcriptionnel CopR

Un régulateur transcriptionnel codé par le gène *copR* localisé en aval du gène *copA* chez *R. gelatinosus* présente une forte homologie avec le régulateur CueR responsable de l'induction de l'expression de *copA* chez *E. coli* (Petersen and Moller 2000). CopR nous semblait donc être un bon candidat pour induire l'expression de *copA* dans *R. gelatinosus*. L'analyse du mutant *copR*⁻ en présence d'excès de cuivre indique que ce mutant est effectivement sensible au cuivre comparé au sauvage. Cependant, ce mutant présente une tolérance au cuivre plus importante par rapport au mutant *copA*⁻ suggérant ainsi que CopA peut s'exprimer en absence de CopR. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus lors de l'analyse de l'expression de CopA-H₆ dans une souche dans laquelle le gène *copR* a été inactivé. En effet, les résultats ont révélé que dans un fond génétique *copR*⁻, CopA est toujours exprimée et son expression est légèrement induite en présence de 200 µM de cuivre en photosynthèse.

I-1.4-Toxicité du cuivre en excès sur les métabolismes respiratoire et photosynthétique de *R. gelatinosus*

Nous avons constaté qu'en absence de CopA, la toxicité du cuivre est plus importante dans les conditions de croissance de microaérobie ou de photosynthèse anaérobie comparée à des conditions de forte oxygénation (aérobie). Cette toxicité se manifeste par un retard de croissance et la sécrétion de pigment dans le milieu.

Les analyses indiquent que le mutant *copA*⁻ présente une diminution de l'activité de l'oxydase terminale *cbb₃* et une diminution du photosystème en conditions de microaérobie. Cette

diminution est accompagnée d'une sécrétion d'un pigment rouge UV-fluorescent dans le milieu de culture.

L'analyse de ce pigment par fluorescence et par spectroscopie de masse révèle que le mutant *copA*⁻ excrète dans le milieu de la coproporphyrine III, un intermédiaire de la voie de biosynthèse des porphyrines. L'accumulation de la coproporphyrine III suggère que cette voie est altérée au niveau de l'étape d'oxydation de la coproporphyrinogène III en protoporphyrinogène IX par l'oxydase HemN. Nous avons proposé alors que le cuivre affecte la coproporphyrinogène III oxydase HemN, qui est une oxydase à cluster [4Fe-4S] active seulement en microaérobic/anaérobic. Le cuivre en excès déstabiliserait probablement le cluster [4Fe-4S] de HemN en accord avec les résultats de Macomber (Macomber and Imlay 2009), qui a montré que le cuivre affecte la stabilité des clusters [4Fe-4S] des déshydratases de la voie de biosynthèse des acides aminés à chaînes branchés chez *E. coli*. Par ailleurs, une deuxième cible potentielle du cuivre dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle pourrait être la Mg-PMe cyclase (BchE). Il s'agit également d'une enzyme à centre [4Fe-4S], active uniquement en microaérobic et en photosynthèse (Ouchane, Steunou et al. 2004). BchE est indispensable pour la production de la chlorophylle nécessaire pour la mise en place du photosystème. Le cuivre pourrait aussi affecter cette protéine expliquant ainsi le phénotype du mutant *copA*⁻ en photosynthèse.

I-2-Résultats supplémentaires

I-2.1- CopA spécifique au cuivre

Chez plusieurs bactéries, il a été démontré que l'ATPase CopA est impliquée dans l'efflux du cuivre. Par ailleurs, des études montrent également que CopA contribuerait aussi à la tolérance à d'autres métaux comme l'Argent (Outten, Huffman et al. 2001 ; Rensing, Fan et al. 2000 ; Stoyanov and Brown 2003). Nous avons cherché à savoir si l'inactivation du gène *copA* de *R. gelatinosus* aurait un effet direct ou indirect sur la tolérance de la bactérie à d'autres métaux comme le Zinc (Zn), le nickel (Ni), le cobalt (Co) et le cadmium (Cd).

Pour évaluer l'effet de concentrations croissantes en Zn, Ni, Co et Cd sur la croissance de la souche sauvage et mutante *copA*⁻ de *R. gelatinosus*, les cellules ont été cultivées sur des milieux solides contenant différentes concentrations de ces métaux. Leur capacité de croître en présence de ces métaux a été évaluée, nous avons utilisée des concentrations différentes

entre photosynthèse et respiration. La tolérance aux métaux diffère selon les conditions d'oxygénation. (Figure 29).

Contrairement aux résultats obtenus sur le cuivre, le mutant *copA*⁻ présente une tolérance pour le nickel, le zinc, le cobalt ou le cadmium similaire à celle de la souche sauvage de *R. gelatinosus*. Ceci indique que CopA n'est pas nécessaire pour la tolérance à d'autres métaux mais elle est principalement requise pour la tolérance au cuivre. Nous avons également constaté qu'aucune croissance n'a été observée pour la souche sauvage en présence de cobalt en respiration.

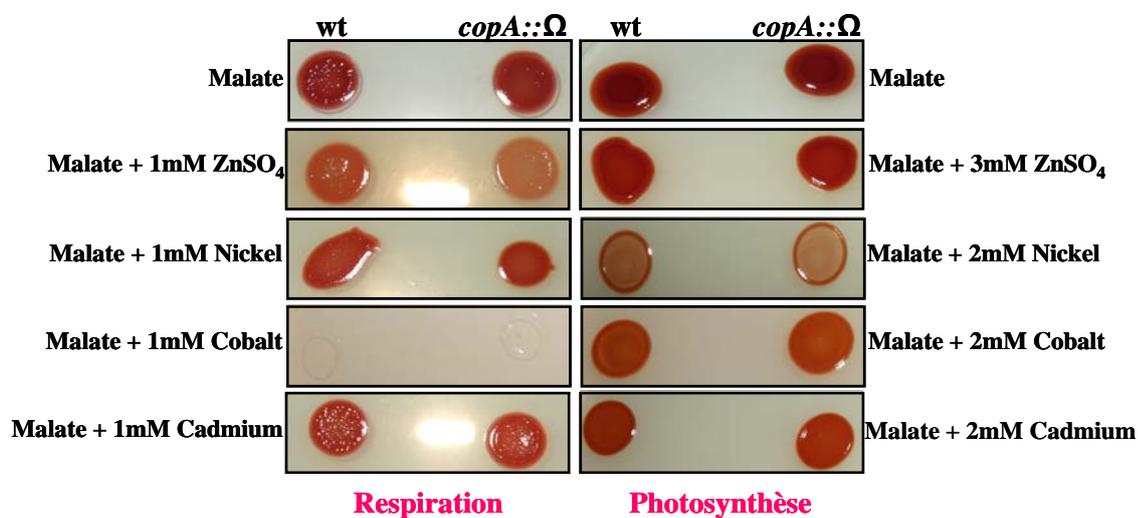


Figure 30 : Effet de différents métaux sur la croissance du mutant *copA*⁻.

Phénotype de croissance et de viabilité des cellules de la souche sauvage wt et des mutants *copA*⁻ sur des boîtes de milieu malate supplémentées en métaux (1 mM ou 2 mM). 10 µL de pré-cultures de ces souches diluées à une DO₆₈₀=0,02 sont déposés sur boîtes. Après incubation de 48h des boîtes (respiration aérobie à l'obscurité ou en photosynthèse anaérobie), les boîtes sont prises en photos.

I.2.2- Régulation et expression du gène *copA*

D'une manière générale, l'expression des gènes impliqués dans le système d'homéostasie d'un métal donné est induite ou réprimée par l'excès de ce métal (Pontel, Audero et al. 2007 ; Rensing and Grass 2003). L'identification chez *R. gelatinosus* de deux ATPases à cuivre CtpA et CopA impliquées dans le transport du cuivre laisse supposer que l'expression de ces protéines serait induite par le cuivre. Le profil d'expression des gènes *copA* et *ctpA* a été analysé par RT-PCR dans la souche sauvage cultivée dans un milieu

Malate (1,6 μM CuSO_4) et dans un milieu additionné de 20 μM de CuSO_4 . Les résultats montrent une expression constitutive de *ctpA* alors que l'expression de *copA* est induite en présence d'excès de cuivre (Figure 30).

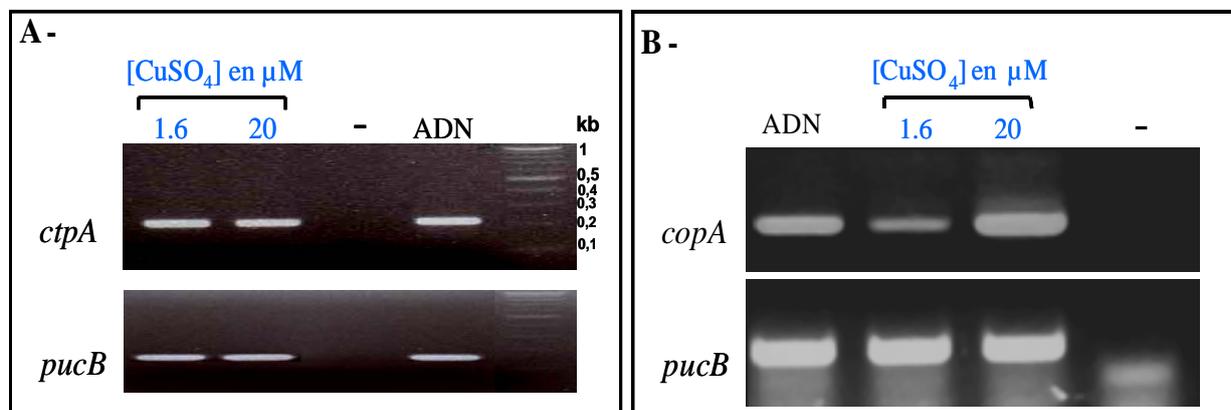


Figure 31 : Expression de *ctpA* et *copA* en réponse au cuivre

Suivi de l'expression de *ctpA* (Figure A) et *copA* (Figure B) par RT-PCR réalisées sur des ARN extraits à partir des cellules de la souche sauvage cultivées en photosynthèse anaérobie en présence de cuivre. Le gène *pucB* est utilisé comme gène de référence dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions étudiées. ADN : contrôle positif où la taille d'amplification obtenue pour *ctpA* est de 0,2 kb et pour *copA* est de 0,3 kb similaire à celles observées par la RT-PCR. L'eau (-) est le contrôle négatif où aucun acide nucléique (ARN/ADN) n'a été ajouté dans le tampon de la réaction.

Le produit du gène *copR* localisé en aval de *copA* présente une forte homologie (76%) (38% d'identité, 38% de similitude) avec le régulateur transcriptionnel CueR d'*E. coli* K12 (Figure 31). C'est un régulateur de 147 résidus appartenant à la famille des régulateurs de type MerR présentant en N-terminal un motif hélice-tour-hélice permettant la fixation à l'ADN et en C-terminal le site spécifique de fixation du cuivre CxxxxxxxC. Chez *E. coli*, ce régulateur est impliqué dans l'induction de l'expression de l'ATPase CopA en fonction de la disponibilité du cuivre dans le milieu (Outten, Outten et al. 2000 ; Stoyanov, Hobman et al. 2001) en se fixant sur une séquence répétée inversée ACCTTCNNNNNNNGGAAGGT au niveau de la région promotrice du gène *copA*. L'analyse de la région promotrice de *copA* de *R. gelatinosus* révèle la présence de motif dégénéré de fixation pour ce régulateur ⁶¹TGGAACGGTAGCACCGTTCCA⁻⁴⁰. Ceci suggère que CopR régule l'expression de *copA*

en se fixant à cette séquence. Cependant des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier la fixation de CopR au niveau du promoteur de *copA*.

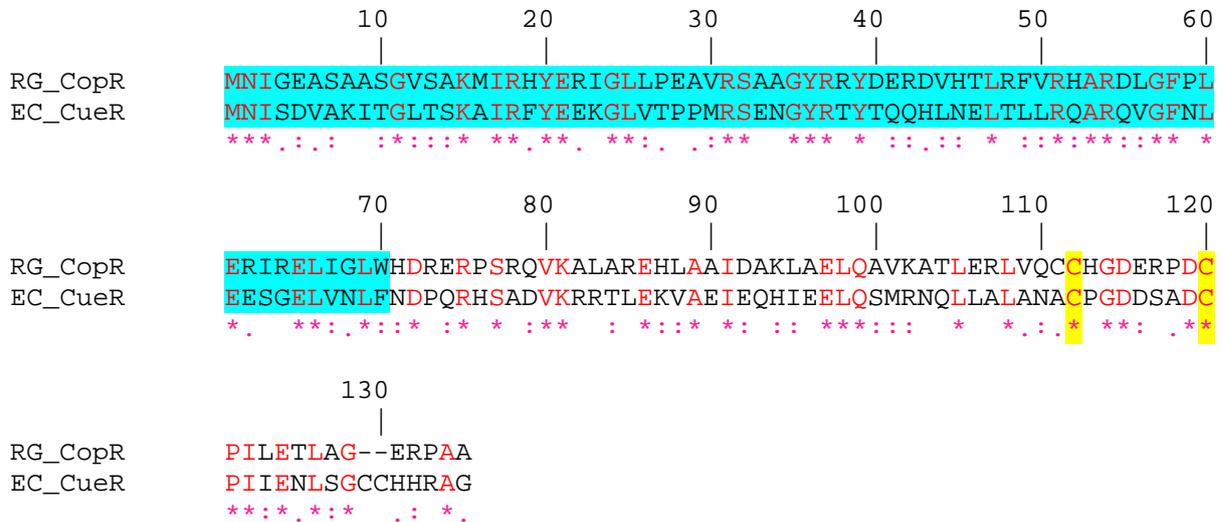


Figure 32 : Alignement de séquence de CopR de *R. gelatinosus* avec CueR d'*E. coli*.

En jaune les cystéines impliquées dans la fixation du métal. En bleu, le motif hélice-tour-hélice impliqué dans la fixation à l'ADN. Les résidus marqués en rouge et avec des étoiles (*) sont les résidus conservés entre les séquences. Les résidus indiqués avec (:) présentent une forte similitude et (.) une faible similitude.

L'analyse du mutant *copR* a montré que CopR n'est pas l'unique régulateur de l'expression de CopA. En effet, une induction de l'expression de CopA est observée dans ce mutant en conditions d'excès de cuivre suggérant l'implication d'un autre régulateur.

La recherche d'un gène codant pour un régulateur de type MerR dans les séquences génomiques de *R. gelatinosus* révèle la présence d'un candidat potentiel intéressant. Il s'agit du régulateur CadR. Le régulateur CadR présente les motifs caractéristiques des régulateurs de type MerR. En plus du motif hélice-tour-hélice à l'extrémité N-terminal, il présente en C-terminal un motif de fixation du métal CxxxxxxxC. CadR présente une homologie de 68% (33% d'identité, 35% de similitude) avec CopR (Figure 32).

Le gène *cadR* interviendrait probablement dans la régulation de l'efflux du cadmium en contrôlant l'expression de l'ATPase *cadA* impliquée dans le transport du Cd.

capacité du cuivre d'endommager directement le groupe fer-soufre des deux oxydases anaérobies HemN et BchE (la Mg-protoporphyrine IX monométhyl ester cyclase).

Nous avons exprimé des formes étiquetées des protéines HemN-H₆ et BchE-H₆ *E. coli* dans les corps d'inclusion chez *E. coli*. Après solubilisation par traitement de ces corps d'inclusion avec de l'urée et incubation en l'absence et en présence de 20 μM, 200 μM ou 2 mM de CuSO₄, nous avons vérifié la présence des clusters [4Fe-4S] dans ces protéines en suivant l'absorption dans l'UV/visible à des longueurs d'ondes spécifiques des groupements fer-soufre de HemN-H₆ et BchE-H₆ sur des échantillons traités et non traités avec du cuivre. Nous avons observé que, aussi bien pour HemN que BchE (Figure 33A, 33B), les protéines solubilisées par urée renferment un cluster [4Fe-4S] comme l'indique l'absorption spécifique entre 350 et 450 nm dans le spectre d'UV/visible, avec un pic d'absorption à 414 nm. Les résultats obtenus montrent clairement une diminution de l'amplitude du pic d'absorption proportionnel à la concentration du cuivre utilisée lors des traitements aussi bien pour HemN-H₆ qu BchE-H₆.

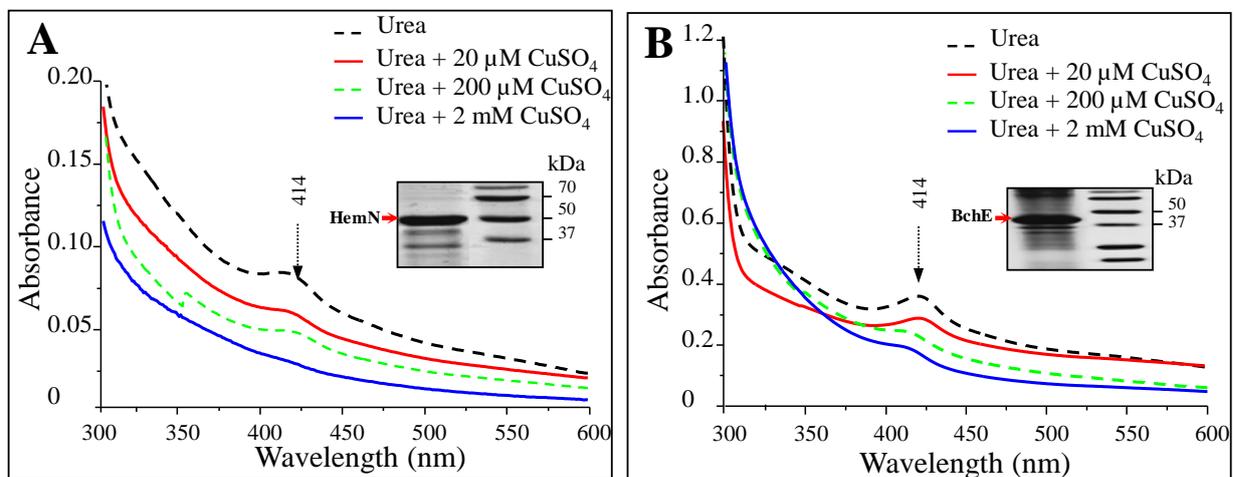


Figure 34 : Effet de cuivre sur le cluster [4Fe-4S] de HemN-H₆ et BchE-H₆ de *R. gelatinosus*.

Spectres d'absorption dans l'UV-visible réalisé sur les corps d'inclusion solubilisés à l'urée contenant les protéines recombinantes HemN-H₆ (A) ou BchE-H₆ (B) avec des concentrations croissantes en cuivre (0, 20, 200 et 2000 μM CuSO₄). Encarts : analyse sur SDS-PAGE des protéines des corps d'inclusions d'*E. coli* BL21 exprimant HemN-H₆ (A) ou BchE-H₆ (B).

L'ajout du dithionite de sodium a eu comme conséquence un décalage de l'absorbance dans la région visible du spectre (de 414 à 425 nm), démontrant que les groupes fer-soufre étaient redox-actifs dans ces échantillons (Figure 34)

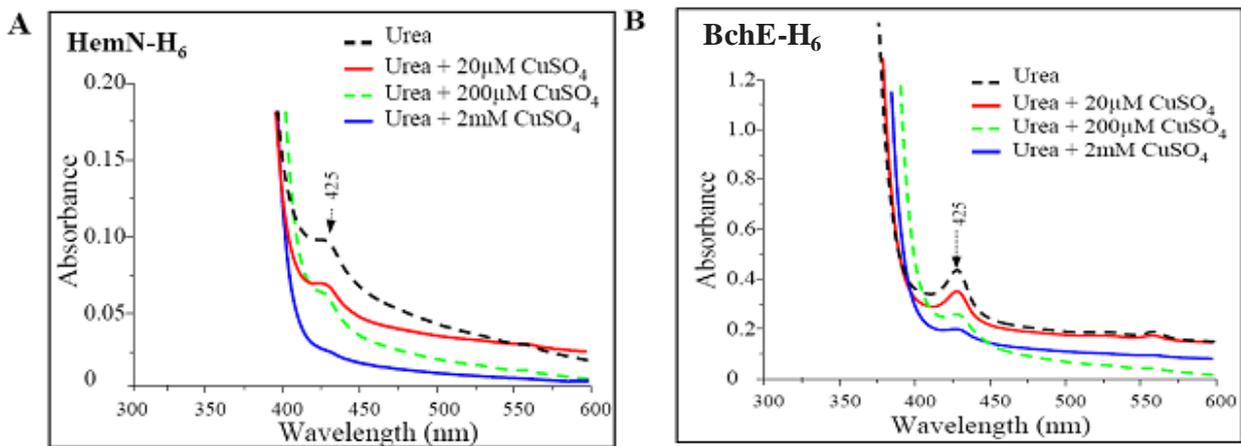


Figure 35 : Spectres l'absorption dans UV-visible après l'ajout du dithionite de sodium.

Spectres réalisés sur corps d'inclusion solubilisés à l'urée contenant la protéine recombinante HemN-H6/ BchE-H6 après l'ajout du dithionite de sodium qui réduit les clusters [4Fe-4S] existants dans ces échantillons. Les échantillons de HemN-H6 (A) ou BchE- H6 (B) sont traités avec des concentrations croissantes en cuivre (0, 20, 200 et 2000 μM CuSO_4).

Pour les deux protéines, l'ajout de 20 μM , 200 μM ou de 2 mM de cuivre dans la solution de solubilisation a eu comme conséquence la perte progressive du signal [4Fe-4S] suggérant que le cuivre affecte la stabilité [4Fe-4S] dans ces protéines. Les données génétiques et biochimiques soutiennent la constatation qu'en absence de *copA*, la cible du cuivre excédentaire est les clusters [4Fe-4S] des protéines impliquées dans la biosynthèse de tétrapyrroles en condition limitée en oxygène ou en anaérobie.

I-3- Discussion de l'article I

Pour assurer le maintien en équilibre de la balance cellulaire interne en métaux, les bactéries disposent de systèmes d'import pour fournir aux enzymes le cofacteur métallique

requis et de systèmes d'efflux ou de stockage pour éliminer tout excès en métal qui pourrait être néfaste pour les cellules.

Les ATPases à Cu^+ de type CPX jouent un rôle clé dans le système d'homéostasie du cuivre chez les bactéries, soit en participant à la détoxification du cuivre en excès soit pour permettre d'acheminer le cuivre et l'assemblage des cuproprotéines. Ces ATPases à cuivre présentent des homologues de structures (conservation des domaines caractéristiques des ATPases CPx : domaine d'activation, de phosphorylation, MBD...) et de séquence, mais elles assurent deux fonctions physiologiques différentes dans la cellule comme cela avait été suggéré dans la thèse de Bahia Khalfaoui et démontré dans ce travail.

I-3.1- CtpA : rôle dans la biogenèse des cuproprotéines, CopA : requise pour la tolérance au cuivre

Chez *R. gelatinosus*, une première ATPase P1B CtpA a été identifiée comme étant impliquée dans la biogenèse de différents cupro-protéines (oxydases *cbb₃/caa₃*, N_2O réductase) en leur procurant le cuivre requis. Des homologues à CtpA annotée FixI ou CcoI ont été également caractérisés chez *B. japonicum* et *R. capsulatus* mais chez les bactéries leur fonction est seulement spécifique à l'assemblage de l'oxydase *cbb₃* (Preisig, Zufferey et al. 1996 ; Koch, Winterstein et al. 2000).

Dans ce travail, nous avons identifié une deuxième ATPase à cuivre, CopA, et montré que son rôle est exclusivement requis pour la tolérance au cuivre. Des travaux similaires menés par González-Guerrero chez *P. aeruginosa* ont aussi confirmé cette hypothèse. Deux rôles fonctionnels distincts ont été assignés à CopA1 et à CopA2, homologues respectivement à CopA et CtpA de *R. gelatinosus* (Gonzalez-Guerrero, Raimunda et al. 2010).

Dans les deux cas, ces deux ATPases transporteraient le cuivre du cytoplasme vers le périplasme. Le cuivre transporté par CtpA serait adressé aux cupro-protéines membranaires. Quant au cuivre transloqué par CopA, il devrait être soit éliminé de la cellule *via* des systèmes d'efflux de la membrane externe comme le système CusCFBA d'*E. coli*, soit séquestré au niveau du périplasme en absence du système Cus. La spécificité de chacune de ces ATPases à cuivre serait liée à la nature de leurs chaperonnes respectives.

I-3.2- Effet du cuivre sur les protéines à cluster Fe-S

L'effet du cuivre a été étudié chez d'autres organismes photosynthétiques tels que l'algue verte *chlamydomonas* ainsi que quelques plantes comme *Arabidopsis (A.) thaliana* (Palmer and Guerinot 2009 ; Merchant, Allen et al. 2006). Cependant, ces études n'ont pas été réalisées en absence du système d'efflux du cuivre mais dans un fond génétique sauvage. En effet la présence d'un système d'efflux actif procure à la cellule la possibilité d'éliminer le cuivre excédentaire et d'éviter ainsi l'effet toxique lié au métal en excès.

Dans cette étude, j'ai pu mesurer l'effet du cuivre excédentaire sur la respiration et la photosynthèse de *R. gelatinosus* dans un fond génétique *copA*⁻ dépourvu du seul système d'efflux du cuivre de la membrane interne. Dans un milieu oxygéné, le cuivre semble être toxique pour les bactéries en générant des espèces réactives de l'oxygène (Macomber, Rensing et al. 2007 ; Macomber and Imlay 2009). En absence d'oxygène, il a été suggéré que la toxicité du cuivre devient beaucoup plus importante car le cuivre sous sa forme réduite Cu(I) diffuse facilement à travers la membrane cytoplasmique (Rensing and Grass 2003 ; Macomber and Imlay 2009). Cependant, les mécanismes moléculaires de la toxicité du cuivre dans des conditions anaérobies sont restés inconnus jusqu'à ce que Macomber et Imlay montrent que les clusters 4Fe-4S des déshydratases sont les cibles du cuivre en anaérobiose dans *E. coli* (Macomber and Imlay 2009). En accord avec les résultats publiés par Macomber et Imlay, nous avons identifié chez *R. gelatinosus* deux protéines (HemN et BchE) à cluster [4Fe-4S] appartenant à la famille des radical-SAM comme étant les premières cibles du cuivre en condition de micro-aérobiose et anaérobiose. Ces protéines comme les déshydratases ont le cluster [4Fe-4S] coordonné avec trois résidus cystéines alors que le quatrième atome de fer du cluster [4Fe-4S] qui est exposé et coordonné avec le SAM (Imlay 2006 ; Layer, Moser et al. 2003). Cet atome de Fer peut ainsi être accessible au cuivre.

Selon la structure de HemN, le cluster [4Fe-4S] est enfoui dans la protéine. Cependant, une grande fente laisse la coproporphyrinogène III entrer dans le site actif (Layer, Moser et al. 2003) et peut également permettre l'accès aux ions métalliques entraînant la destruction du [4Fe-4S].

La coproporphyrinogène III oxydase (HemN) et la Mg-protoporphyrine IX monométhyl ester cyclase (BchE) sont des enzymes à cluster [4Fe-4S] actives uniquement en

microaérobie et en photosynthèse (Ouchane, Steunou et al. 2004). Ceci explique que le phénotype « sécrétion coproporphyrine III » n'est observé qu'en conditions de microaérobie et en anaérobie photosynthèse. Par contre, en condition d'aérobie (forte aération), l'effet toxique du cuivre sur les tétrapyrrolles n'est pas observé car la conversion de la coproporphyrinogène III en protoporphyrinogène IX est assurée par HemF alors que la transformation de la Mg-monométhyle protoporphyrine IX en Mg-divinyl-protochlorophylide a est catalysé par AscF. Ces deux enzymes ne sont pas des protéines à cluster [4Fe-4S] mais des enzymes à centre bimétallique notamment un cluster [Fe-Fe] pour AscF beaucoup plus stable que le centre [4Fe-4S] labile en présence d'oxygène et sensible à l'excès de cuivre (Narita, Taketani et al. 1999 ; Ouchane, Steunou et al. 2004).

Du fait que les centres [Fe-Fe] sont plus stables en condition d'oxygénation que les clusters [4Fe-4S], plusieurs études ont suggéré que l'apparition de l'oxygène sur la terre a été la force motrice pour l'apparition des enzymes à cluster [Fe-Fe] chez les bactéries au cours de l'évolution (Imlay 2006). Ces nouvelles enzymes de fait de leur stabilité ont permis de maintenir des réactions et des voies métaboliques jusqu'alors strictement anaérobies. C'est le cas à titre d'exemple de la NrdG (ribonucleotide reductase subunit), HemN ou BchE qui sont remplacées par des enzymes à cluster [Fe-Fe], NrdB, HemF et AcsF (Ollagnier, Mulliez et al. 1996 ; Poole, Logan et al. 2002 ; Layer, Verfurth et al. 2002 ; Troup, Hungerer et al. 1995 ; Pinta, Picaud et al. 2002 ; Ouchane, Steunou et al. 2004).

Il est maintenant admis que des métaux, notamment le cuivre, le cobalt ou le cadmium, peuvent attaquer ces clusters [4Fe-4S] comme il a été montré par Imlay et par notre étude. Il est donc tout à fait légitime de considérer les métaux dans l'évolution des enzymes à cluster [Fe-Fe]. Nous pouvons ainsi suggéré que les microorganismes auraient acquis des enzymes à clusters [Fe-Fe] bien avant l'apparition de l'oxygène sur la terre afin de s'adapter à la présence de certains métaux dans l'environnement.

I-3.3- Rôles des partenaires chaperonnes des ATPases à cuivre dans la détermination de leurs fonctions physiologiques

Nous avons prouvé que malgré les homologies de séquences entre ces deux ATPases et la conservation des domaines impliqués dans le transport du cuivre, CtpA et CopA

remplissent deux fonctions physiologiques distinctes. Ces différences peuvent être liées au fait que l'ATPase CtpA n'est pas induite par le cuivre alors que l'expression de l'ATPase CopA augmente en réponse aux variations environnementales en cuivre. Il a été également proposé par González-Guerrero que les fonctions cellulaires distinctes de ces ATPases pourraient être basées sur des différences dans la cinétique de transport du cuivre entre CopA1 et CopA2 chez *P. aeruginosa*. CopA1 (CopA) intervenant dans la détoxification aurait une efficacité de transport du cuivre rapide contrairement à CopA2 (CtpA) qui aurait une affinité élevée pour le cuivre mais une activité de transport lente (Gonzalez-Guerrero, Raimunda et al. 2010).

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer cette différence de fonctions est que ces ATPases doivent avoir probablement des protéines partenaires distinctes auxquelles elles délivrent le cuivre dans l'espace périplasmique. Cette hypothèse a d'ailleurs été proposée par Bahia Khalfaoui (Hassani, Astier et al. 2010) avant d'être reprise par Gonzalez-Guerrero (Gonzalez-Guerrero, Raimunda et al. 2010) suite aux résultats obtenus sur CopA1/CopA2 chez *P. aeruginosa*.

En effet, CtpA impliquée dans la biogenèse de *cbb₃* pourrait avoir comme partenaire les protéines chaperonnes Sco1 et Cox11 pour récupérer le cuivre. D'ailleurs, Bahia Khalfaoui a montré que Sco1 est importante pour la biogenèse de l'oxydase *cbb₃* (non publiés, thèse de Bahia Khalfaoui). Récemment chez *R. sphaeroides* et *R. capsulatus*, il a été montré que Sco1 (PrnC/SenC) est impliqué dans la mise en place du cuivre (Cu_B) au sein de l'oxydase *cbb₃* (Thompson, Gray et al. 2012 ; Lohmeyer, Schroder et al. 2012).

Quant à CopA impliquée dans l'efflux du cuivre, elle pourrait interagir et délivrer le cuivre à d'autres protéines périplasmiques. En effet, chez *E. coli* le cuivre transporté vers le périplasme par CopA est pris en charge par les protéines périplasmique CueO et CusF afin d'oxyder le cuivre en Cu(II) et de l'excréter vers le milieu extracellulaire *via* le système CusCBA (Rensing and Grass 2003). Dans le cas d'autres bactéries telles que *Salmonella*, le cuivre transloqué par CopA serait séquestré par la protéine périplasmique CueP afin de protéger ce compartiment de la toxicité du cuivre libre (Osman, Waldron et al. 2010). Par ailleurs, il a été montré que CueP aurait un rôle supplémentaire dans la cellule en acheminant le cuivre nécessaire pour l'activité de la superoxyde dismutase Cu,Zn-SOD (Osman, Patterson et al. 2012).

Article I

Coproporphyrin III excretion identifies the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN as a copper target in the Cu^+ -ATPase mutant *copA*⁻ of *Rubrivivax gelatinosus*.

Asma Azzouzi, Anne-Soisig Steunou, Anne Durand, Bahia Khalfaoui-Hassani, Marie-line Bourbon, Chantal Astier, David W. Bollivar and Soufian Ouchane

Molecular Microbiology (2013)

Coproporphyrin III excretion identifies the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN as a copper target in the Cu⁺-ATPase mutant *copA*⁻ of *Rubrivivax gelatinosus*

Asma Azzouzi,¹ Anne-Soisig Steunou,¹
Anne Durand,¹ Bahia Khalfaoui-Hassani,^{1†}
Marie-line Bourbon,¹ Chantal Astier,¹
David W. Bollivar² and Soufian Ouchane^{1*}

¹CNRS, CGM, UPR 3404. Université Paris Sud. 1 Ave. de la Terrasse Gif sur Yvette, F-91198 France.

²Department of Biology, Illinois Wesleyan University, Bloomington, IL 61702, USA.

Summary

Two genes encoding structurally similar Copper P_{1B}-type ATPases can be identified in several genomes. Notwithstanding the high sequence and structural similarities these ATPases held, it has been suggested that they fulfil distinct physiological roles. In deed, we have shown that the Cu⁺-ATPase CtpA is required only for the activity of cuproproteins in the purple bacterium *Rubrivivax gelatinosus*; herein, we show that CopA is not directly required for cytochrome *c* oxidase but is vital for copper tolerance. Interestingly, excess copper in the *copA*⁻ mutant resulted in a substantial decrease of the cytochrome *c* oxidase and the photosystem under microaerobic and anaerobic conditions together with the extrusion of coproporphyrin III. The data indicated that copper targeted the tetrapyrrole biosynthesis pathway at the level of the coproporphyrinogen III oxidase HemN and thereby affects the oxidase and the photosystem. This is the first *in vivo* demonstration that copper, like oxygen, affects tetrapyrrole biosynthesis presumably at the level of the SAM and [4Fe-4S] containing HemN enzyme. In light of these results and similar findings in *Escherichia coli*, the potential role of copper ions in the evolution of [4Fe-4S] enzymes and the Cu⁺-ATPases is discussed.

Introduction

Metal ions are essential cellular components required for a broad range of enzymes involved in different metabolic pathways. Depletion or excess of most metals usually have dramatic consequences on cell survival or growth. Therefore, maintenance of metal homeostasis is critical and requires a variety of membrane transporters, chaperones and regulators (Osman and Cavet, 2008; Dupont *et al.*, 2011; Raimunda *et al.*, 2011). In particular, copper is an essential cation required as an enzyme redox cofactor for vital processes such as respiration, photosynthesis, denitrification, free radical scavenging and signalling. Nevertheless, free copper is highly toxic in the cytoplasm, even at low concentrations, and can promote oxidative damage. Most free living bacteria possess homeostasis system to deal with excess copper (Solioz *et al.*, 2010; Dupont *et al.*, 2011). In the last two decades, the mechanisms involved in copper efflux in bacteria have been extensively studied in *Escherichia coli* (Rensing and Grass, 2003) and in the Gram⁺ bacterium *Enterococcus hirae* (Solioz *et al.*, 2010). More recently, genes involved in copper efflux were also identified and studied in other species (Osman and Cavet, 2008; von Rozycki and Nies, 2009; Raimunda *et al.*, 2011). The central component in copper homeostasis in bacteria is the Cu⁺-ATPase CopA. This protein belongs to the P_{1B}-type ATPases subgroup of the P-type ATPases superfamily. They are characterized by conserved motifs including one to six CxxC motif metal binding domains at their N-termini, the DKTGT motif, the ATP-binding domain and a conserved intramembranous CPC motif involved in copper transport. The crystal structure of CopA from *Legionella pneumophila* is now available and suggests a three stage transport pathway involving some conserved residues in the P_{1B}-type Cu⁺-ATPases (Gourdon *et al.*, 2011). In all cases, it was demonstrated that CopA is required for removing excess Cu⁺ from the cytoplasm; except in *E. hirae* where a second CopA seems to be involved in copper uptake under copper limitation conditions (Solioz *et al.*, 2010). Nevertheless, expression of *E. hirae* CopA in *E. coli* suggests that *E. hirae* CopA may also drives Cu⁺ efflux from the cytoplasm (Raimunda *et al.*, 2011).

Accepted 16 February, 2013. *For correspondence. E-mail soufian.ouchane@cgm.cnrs-gif.fr; Tel. (+33) 169823165; Fax (+33) 169823230. †Present address: Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA.

Many bacterial genomes encode more than one P_{1B}-type ATPase that may be involved in copper trafficking (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010; Raimunda *et al.*, 2011). Very often, those proteins display structural similarities and share identical conserved motifs suggesting that they fulfil the same role and drive excess copper extrusion outside the cell when intracellular copper reaches alarming levels. However, it has been suggested that the 'outlet' or 'destination' of copper transported by these homologous Cu⁺-ATPases might vary (Koch *et al.*, 2000; Tottey *et al.*, 2001; Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010b; Raimunda *et al.*, 2011). In the purple non-sulphur photosynthetic bacterium *Rubrivivax gelatinosus*, we have suggested that the physiological role of the copper P_{1B}-type transporter CtpA, though homologous to CopA, differs from that of the efflux ATPase CopA. Because CtpA is dispensable for copper tolerance; we have suggested that its role may be restricted to the acquisition and delivery of copper to the copper-requiring enzymes within the membrane and the periplasm and that a 'CopA' similar P_{1B}-type ATPase may be required specifically for excess copper extrusion and tolerance (Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010b). These assumptions were recently tested and confirmed by Arguello and coworkers in *Pseudomonas aeruginosa* (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010). In this pathogenic bacterium, two Cu⁺-ATPase(s) were identified; CopA1 is required for tolerance to copper, while CopA2 the homologue to CtpA is not required for copper tolerance but is involved in copper delivery to the *cbb*₃ cytochrome *c* oxidase (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010). Likewise, photosynthetic bacterial genomes contain also multicopy genes coding for copper trafficking P-type ATPases. In *Synechocystis PCC6803* at least two Cu⁺-ATPases PacS and CtaA were identified (Tottey *et al.*, 2001). Both are involved in copper delivery to thylakoids and cytoplasmic membranes respectively. In the purple photosynthetic α -proteobacteria, *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*, Ccol and RdxI are two Cu⁺-ATPases that are required for the cytochrome *cbb*₃ oxidase (Koch *et al.*, 2000; Roh and Kaplan, 2000). A blast search against the genome sequences of both species revealed the presence of two putative copper-translocating P-type ATPases homologous to CopA, RSP_2890 in *R. sphaeroides* and CopA2 in *R. capsulatus*. So far, the role of these proteins in copper homeostasis has not been investigated.

In the present work, we have identified the second P_{1B}-type ATPase in *R. gelatinosus* and showed, in agreement with our previous assumption that CopA is in fact not required for the activity of *cbb*₃ cytochrome *c* oxidase but is involved in copper tolerance in *R. gelatinosus*. The impact of copper on photosynthesis has mainly studied in organisms such as *Chlamydomonas reinhardtii* and plants (Abdel-Ghany *et al.*, 2005; Abdel-Ghany, 2009; Page *et al.*, 2009; Castruita *et al.*, 2011). Copper and other

metals were shown to target the photosystems; nevertheless, the molecular details of this effect are still poorly investigated. In addition, because of the robustness of the copper efflux systems, assessing the effect of excess metal on metabolism in wild type (WT) backgrounds might be biased. Efflux systems are rapidly induced to safeguard the cell and excrete the surplus copper, rendering the analysis of the metal excess effect underestimated. We therefore took advantage of the *copA*⁻ mutant, devoid of copper efflux ATPase, to measure the effect of cytoplasmic excess copper on photosynthesis and respiration. In the absence of CopA a decrease in the photosystem and the cytochrome *c* oxidase *cbb*₃ amounts were observed under excess copper. We demonstrated that the *copA*⁻ mutant accumulated coproporphyrin III (oxidized coproporphyrinogen III) and concluded that excess copper affects the synthesis of tetrapyrroles, affecting thereby these haem and chlorophyll containing complexes. Characterization of *copA*⁻ mutant shows HemN (a radical SAM and iron-sulfur containing protein) as a target enzyme in the pathway, confirming *in vivo* the sensitivity of [4Fe-4S] enzymes to copper even in the absence of oxygen (Macomber and Imlay, 2009) and suggesting that members of the radical SAM enzyme family may also be copper sensitive.

Results

Transposon mutagenesis reveals copper tolerance determinants in R. gelatinosus: cop locus analyses

Rubrivivax gelatinosus can tolerate up to 1.8 mM CuSO₄ under respiratory and anaerobic photosynthetic conditions (Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010b). To identify the copper tolerance determinants in *R. gelatinosus*, large-scale transposon mutagenesis was used. Inactivation of genes involved in copper efflux in *R. gelatinosus*, would lead to strains with reduced ability to grow on copper supplemented medium. To that aim, a Tn5-transposon insertion library was created using the WT strain and screened for copper sensitivity. Colonies exhibiting low copper tolerance were identified and the genomic regions flanking the transposon insertion sites were determined by sequencing. Among the mutants sensitive to 500 μ M CuSO₄, the transposon was mapped 814 bp after the putative start codon of a gene (2415 nt) henceforth named *copA* encoding a putative copper P_{1B}-type ATPase. Sequencing of the flanking regions of *copA* revealed the presence of other putative copper tolerance involved genes. These include: *copR*, encoding a putative Cu⁺-dependent MerR family transcriptional regulator that may regulate the expression of *copA* in response to variation in copper concentration, and three open reading frames of unknown function annotated *copH* (360 nt), *copI* (498 nt) and *copJ* (456 nt) (Fig. 1A). These open reading frames (ORFs) are indeed involved in copper tolerance (A. Azzouzi *et al.*, in prepara-

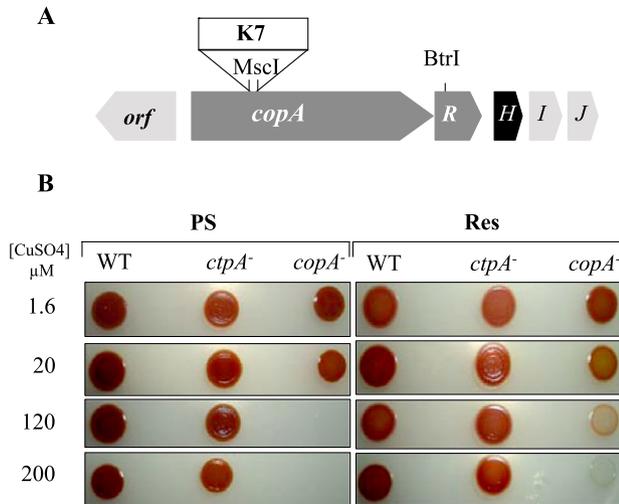


Fig. 1. A. Genetic organization of the *cop* locus in *R. gelatinosus*. To inactivate *copA* the *MscI* fragment was replaced by antibiotic resistance cassette (Ω or *Tp* cassette). B. Growth phenotype and cell viability of the WT, *ctpA*⁻ (*ctpA::km*) and *copA*⁻ (*copA::\Omega*) mutants in increasing copper concentrations (1.6–200 μ M CuSO₄). Cells were grown anaerobically by photosynthesis (PS) or by aerobic respiration (Res) in the dark for 48 h at 28°C prior to photography.

tion) and were also found in other species such as *Methylobium (M.) petroleiphilum* and *Cupriavidus metallidurans*. No additional copper P_{1B}-type ATPase was identified in the *R. gelatinosus* genomes (unpublished S1 genome) and in IL144 strain (Nagashima *et al.*, 2012).

Rubrivivax gelatinosus copA encodes an 804 amino acid protein of 82.5 kDa. It is homologous to CopF (Mpe_A1640) from *M. petroleiphilum* (69% identity) and to CtpA from *R. gelatinosus* (35% amino acid identity). Protein hydropathy analyses suggest eight putative transmembrane spanning helices with a full conservation of the amino acids (Met148, Glu205 and Asp337) in the entry site of copper, the CPC, YN and MxxSS motifs in the sixth, seventh and eighth helices of the protein respectively according to the *L. pneumophila* CopA crystal structure (Gourdon *et al.*, 2011) (Fig. S1).

Copper sensitivity of *copA* and *ctpA* mutants

Despite the conservation of several key residues and the high structural homologies between CopA and CtpA, we have suggested that CopA and CtpA fulfil different physiological roles in *R. gelatinosus* and in other bacteria (Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010b). To test this prediction, we deleted the *copA* gene in the WT and *ctpA*⁻ backgrounds to confirm its requirement for copper tolerance as suggested by the isolated Tn5 mutant (*copA::Tn5*). Two different antibiotic cassettes (*Tp* and Ω) were used to disrupt *copA* gene. Single mutants *copA::Tp* and *copA::\Omega* and double mutants *ctpA::km-copA::Tp* and *ctpA::km-copA::\Omega* were selected under aerobic conditions on

malate medium containing 1.6 μ M copper, and their growth on copper supplemented medium was tested in comparison with the WT and the *ctpA::km* single mutant.

On malate medium (1.6 μ M CuSO₄) the *copA*⁻ single mutants (*copA::Tn5*, *copA::Tp* or *copA::\Omega*) had a comparable growth rate to the WT under respiratory conditions (data not shown). However, under anaerobic photosynthesis, the *copA*⁻ and *ctpA-copA*⁻ mutants showed a slightly slower growth rate (doubling time: 4 h compared with the 2.5 h for the WT).

To check the effect of excess CuSO₄ on growth of *R. gelatinosus* mutants *copA*⁻, *ctpA*⁻, *ctpA-copA*⁻ and the WT, cells were grown in liquid and on agar plate medium supplemented with CuSO₄. Their ability to grow in the presence of increasing concentrations of CuSO₄ was evaluated under both anaerobic photosynthesis and aerobic respiration (Fig. 1B). Both the WT and *ctpA*⁻ mutant were not sensitive to the increasing copper concentrations (1.6–200 μ M CuSO₄) under these conditions (Fig. 1B). In contrast, all the *copA*⁻ disrupted strains exhibited decreased tolerance to copper. The *copA*⁻ mutants could not grow beyond 120 μ M CuSO₄ under anaerobic photosynthesis and beyond 200 μ M CuSO₄ under aerobic respiration (Fig. 1B). The tolerance was restored when the *copA* gene was expressed *in trans* on the replicative plasmid pBRCopA (data not shown). These data indicated that CopA is required for copper tolerance in *R. gelatinosus* and confirmed that, in contrast to CopA, CtpA protein is dispensable for copper tolerance. The *copA::\Omega* mutant strain was used for the subsequent experiments described in this paper. The tolerance or sensitivity of *copA*⁻ disrupted strain towards nickel, zinc, cobalt or cadmium was also assayed. Disruption of *copA* gene did not show any significant increase of the strain sensitivity to these metals (data not shown), indicating that CopA is mainly required for copper resistance.

Induction of *copA* in response to excess copper

Several previous studies indicated that genes encoding copper homeostasis proteins modulate their expression level in response to copper exposure (Rensing and Grass, 2003; Osman and Cavet, 2008). To have insight into the expression profile of *copA* in response to copper, we first analysed the expression of *copA* in the WT cells grown under anaerobic photosynthesis conditions using RT-PCR. This experiment showed that *copA* is expressed in malate medium at low copper concentration (1.6 μ M). This expression corresponds likely to the basal level of CopA in cells. Addition of 20 μ M copper to the medium resulted in a significant increase of *copA* transcript (Fig. 2A). This result demonstrated that CopA is induced by copper under anaerobic photosynthetic conditions and is consistent with the data reported for other bacteria

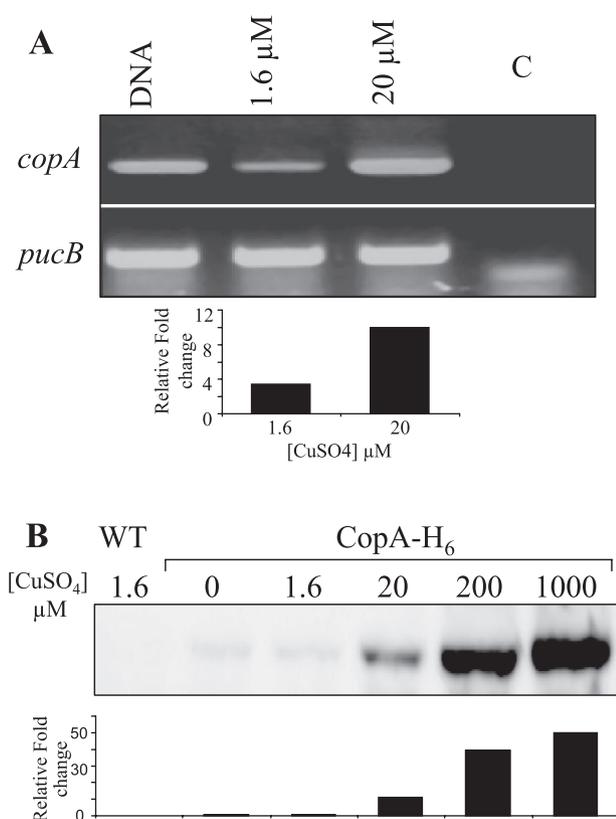


Fig. 2. Expression profile of CopA in response to copper. **A.** *copA* gene expression level was monitored by RT-PCR on RNA extracted from cells grown under anaerobic photosynthesis conditions in the presence of CuSO₄. *pucB* gene was used as a positive control, **C:** negative control. **B.** Expression of CopA protein in *R. gelatinosus* WT and CopA-H₆ membranes. Same amounts of membrane were separated on 12% SDS-PAGE and the CopA-H₆ protein was revealed on the Western blot using the HRP-HisProbe (Pierce).

(Rensing *et al.*, 2000; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010). In contrast, the expression level of *ctpA* was constant irrespective of copper concentration (Fig. S2). To check the expression of *copA* at the protein level, we generated a strain (CopA-H₆) where six His residues were fused with the C-terminus of CopA. The resulting *copA-His₆* construct was integrated into the chromosome. In this construct, transcription of *copA-H₆* is under the control of its endogenous putative copper-regulated promoter to assess changes in the CopA expression in response to copper availability. WT and CopA-H₆ strains were grown anaerobically by photosynthesis under different copper concentrations and membranes were probed for the presence of CopA-H₆ using the HRP-HisProbe. As shown in Fig. 2B, in the CopA-H₆ membranes traces of CopA-H₆ could be observed at 1.6 μM CuSO₄ or even in a CuSO₄-depleted medium, this is probably due to the presence of copper traces in the different constituents of the medium or to a constitutive basal expression level of CopA-H₆.

Addition of 20 μM, 200 μM or 1 mM CuSO₄ resulted in a significant increase in the amount of CopA-H₆ within the membranes. In the control (WT grown in 1.6 μM CuSO₄) no band could be detected in the membranes (Fig. 2B). These results support the RT-PCR data and demonstrate that the amount of CopA in the membranes is induced by copper as it was previously reported for other species (Rensing *et al.*, 2000; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010).

CopR a MerR-type transcriptional regulator involved in tolerance only at high copper concentrations

It has been reported that the transcription activator CueR recognizes a palindromic sequence in the promoter region of *copA* genes (Outten *et al.*, 2000). A sequence with an inverted repeat sequence (⁻⁶⁵-CTTGACCTTGCCATC GTGGCAAGGTC-⁻³⁷) which might be the upstream activating sequence was identified in the promoter region of *R. gelatinosus copA* and may serve for the binding of regulatory proteins. The *copR* gene is located downstream of *copA* and codes for a putative protein (133 amino acids) with high sequence similarity to proteins from the MerR family, including the copper efflux regulator CueR from *E. coli*. CopR contains a putative copper binding site (Cys₁₁₂-Cys₁₂₀) in the C-terminus of the protein and contains an N-terminal helix-turn-helix domain as in CueR (Outten *et al.*, 2000; Changela *et al.*, 2003), suggesting its involvement in gene regulation. To assess the role of *R. gelatinosus copR* in copper tolerance, the gene was inactivated and the resulting *copR*⁻ strain was tested for sensitivity to high levels of copper in comparison with the WT and *copA*⁻ mutant (Fig. 3). Under both aerobic and anaerobic conditions, the *copR*⁻ mutant was less sensitive to CuSO₄ than the *copA*⁻ mutant. Growth of the *copR*⁻ mutant was inhibited only at 500 μM and 800 μM CuSO₄ under anaerobic and aerobic conditions respectively (Figs 3A and S3). Since *copA*⁻ mutant could not grow beyond 100 μM and 200 μM CuSO₄ under anaerobic photosynthesis and under aerobiosis respectively, this demonstrates that *copA* is expressed in the absence of *copR* and suggests that other putative metal binding MerR family transcriptional regulators may induce the expression of *copA* under copper stress in the absence of *copR* or that a basal level of CopA is present even in the absence of CopR. To test these hypotheses, we checked the expression levels of CopA-H₆ in membranes of the CopA-H₆ and in the CopA-H₆-*copR*⁻ strains. Cells were grown under photosynthesis in the presence of different copper concentrations and membranes were analysed for the presence of CopA-H₆. The Western blot confirmed that CopA-H₆ is expressed even in the absence of CopR in the CopA-H₆-*copR*⁻ strain and its expression is induced by excess copper (Fig. 3B). This expression would account for the ability of the *copR*⁻ strain mutant to tolerate relatively

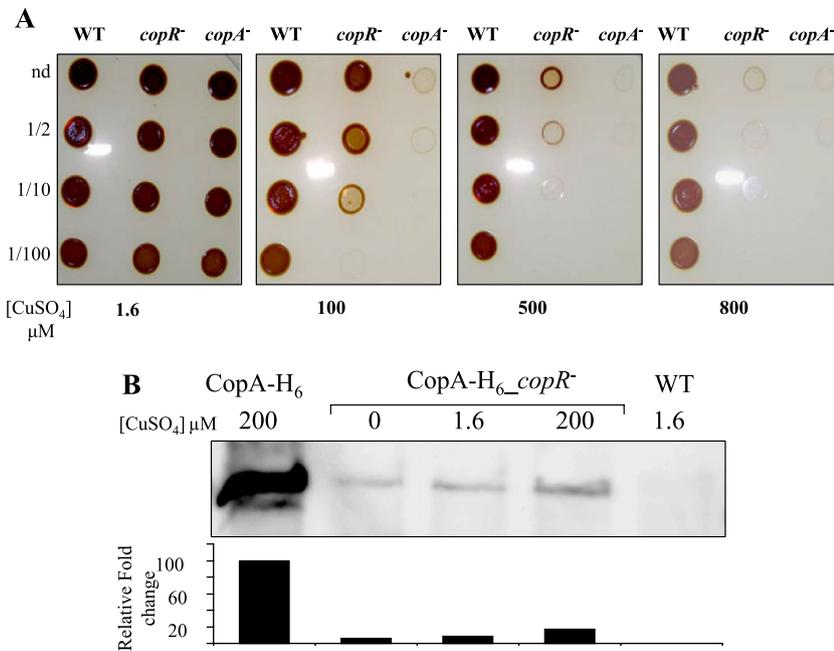


Fig. 3. A. Growth phenotype and cell viability of the WT, *copR*⁻ (*copR*::*Tp*) and *copA*⁻ (*copA*:: Ω) mutants in the presence of increasing copper concentrations (1.6–800 μ M CuSO₄). Cells were grown anaerobically by photosynthesis (PS) for 48 h at 28°C prior to photography. Aerobic growth and UV fluorescence are shown in Fig. S3. B. Expression level of CopA-H₆ protein in *R. gelatinosus* CopA-H₆ and CopA-H₆*copR*⁻ membranes. Same amounts of membrane proteins were analysed by Western blot using the HRP-HisProbe. The WT membranes were used as a negative control.

high copper concentrations compared with *copA*⁻ strain (Fig. 3A).

Importance of CopA for respiration and photosynthesis under copper stress

Given that CopA displaces copper from the cytoplasm to the membrane space in many species, we also questioned whether it could be involved in the assembly and activity of the haem-copper containing *cbb*₃ cytochrome *c* oxidase as it was shown for CtpA and homologues (Preisig *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 2000; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010; Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010b). To test this hypothesis, we checked the ability of the *copA*⁻ and *ctpA-copA*⁻ strains to assemble an active *cbb*₃ oxidase in comparison with the WT and *ctpA*⁻ mutant grown under microaerobic conditions by in-gel Cox activity assay on BN-PAGE (blue-native polyacrylamide gel electrophoresis). As shown in Fig. 4A comparable DAB-positive bands that corresponds to *cbb*₃ oxidase were revealed in the WT and the *copA*⁻ native membranes grown in malate medium (1.6 μ M CuSO₄). In the *ctpA*⁻ and the *ctpA-copA*⁻ mutant strains, no *cbb*₃ active band could be detected as previously described (Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010b). These results show that in contrast to CtpA, CopA is not required for the assembly of an active *cbb*₃ complex in the membranes under low copper concentrations. Nevertheless, under excess copper (20 μ M), while the *cbb*₃ oxidase activity could be partially restored in the *ctpA*⁻ mutant, this activity could not be restored in the double mutant *ctpA-copA*⁻. Intriguingly, under excess copper, a significant decrease in the *cbb*₃ oxidase activity was observed for the *copA*⁻ mutant.

The effect of exogenous excess copper on *cbb*₃ oxidase in the mutants was further probed using antibodies raised against three subunits of the enzyme (Fig. 4B). In the *ctpA*⁻ mutant, the amount of CcoN, CcoO and CcoP was much lower than that observed in the WT, while in the *copA*⁻ strain, the amount of the three subunits was comparable to that seen in the WT. Nevertheless, under excess copper, a decrease of the three subunits of *cbb*₃ was observed in the *copA*⁻ strain consistent with the decrease of the in-gel cytochrome *cbb*₃ *c* oxidase activity. It is noteworthy that although addition of copper in the growth medium of *ctpA*⁻ mutant allows the partial recovery of *cbb*₃ oxidase activity, immunodetection of the *cbb*₃ subunits revealed that this copper addition did not increase the amount of the Cco subunits within the membranes. Concomitantly, we have checked the assembly of the photosystem in these membranes on the same BN-PAGE (Fig. 4C). In contrast to *ctpA*⁻, a substantial decrease of the photosystem amount was observed in the *copA*⁻ strains. This decrease is even more pronounced in the *copA*⁻ mutants under excess copper. Spectral analyses of the WT and *copA*⁻ mutant membranes confirmed the BN-PAGE results with a decrease in the amount of reaction centre and light harvesting antenna LHI and LHII (800–860 nm) in the *copA*⁻ mutant (Fig. S4). These data suggest that excess copper, in the absence of CopA, somehow affects the amount (assembly and/or stability) of *cbb*₃ oxidase and the photosystem under microaerobic conditions.

Strikingly, in the course of these experiments, it was also observed that under anaerobic photosynthesis, all the *copA*⁻ mutants (*copA*::*Tn5*, *copA*::*Tp*, *copA*:: Ω and *ctpA-copA*⁻) and *copR*⁻ mutant extruded a red UV-fluorescent

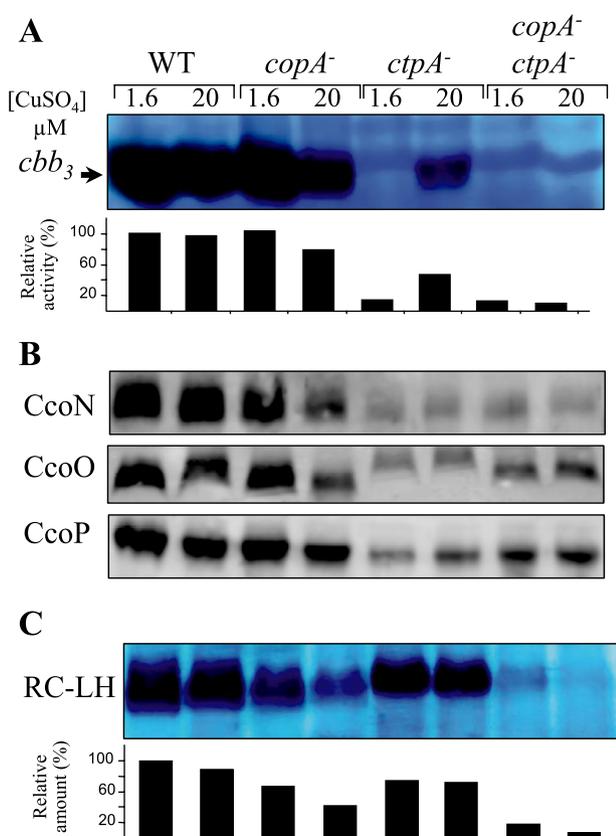


Fig. 4. A. *cbb*₃ oxidase in-gel activity assay on gradient BN-PAGE. WT, *copA*⁻ (*copA*::Ω), *ctpA*⁻ (*ctpA*::*Km*) and *ctpA-copA*⁻ double mutant were grown microaerobically in malate medium (1.6 μM CuSO₄) or in malate supplemented with 20 μM CuSO₄ and equal amount of DDM solubilized membranes were separated on the BN-PAGE and DAB was used to probe *cbb*₃ activity. B. Membranes of the mutants were also separated on 12% SDS-PAGE and the *cbb*₃ subunits within these membranes were subsequently detected by antibodies against CcoN, CcoO or CcoP. C. Amount of the photosystem reaction centre and light harvesting antenna 1 (RC-LH1) in the same membranes on the same BN-PAGE.

compound in the spent medium or on agar plates when cells were exposed to excess copper (Fig. S3).

Increased copper toxicity under microaerobic and anaerobic photosynthetic conditions is associated with an impaired tetrapyrrole biosynthesis pathway

As stated above, *copA*⁻ mutants were more sensitive to excess copper under anaerobic photosynthesis and excreted large amount of a red compound in the medium when supplemented with 20 μM copper. This medium was UV-light fluorescent (Fig. 5A), presumably due to the secretion of porphyrin intermediates. To identify these compounds, absorbance and fluorescence spectra were collected on the spent medium from photosynthetic grown cells. Two absorbance peaks in the Soret region were observed at 390 nm and 371 nm (Fig. 5B). These peaks

are characteristic of coproporphyrin. A sample of standard coproporphyrin III diluted in the malate medium exhibited an identical spectrum to that observed in the spent medium of *copA*⁻ cells grown with CuSO₄ suggesting that the extruded compound may correspond to coproporphyrin. To check the presence of copper within this porphyrin, the sample was brought to acidic pH with HCl (1.5 N HCl). A peak at 394 nm in acid was expected if copper-coproporphyrin was present in the medium (Fig. S5A). However, the sample exhibited a Soret band at 402 with no peak at 394 nm suggesting that the accumulating pigment corresponded to coproporphyrin with no copper. Fluorescence spectra were also collected on these samples. As seen in Fig. 5C the medium of *copA*⁻ strain grown with copper accumulated a compound that had a spectrum identical, under both neutral (peaks at 613 and 672 nm) and acidic treatment (peaks at 597 and 651 nm) (Fig. S5B) to that of the standard coproporphyrin III. From both UV-visible absorbance and fluorescence emission spectra, it is apparent that the main pigment accumulated by *copA*⁻ strains corresponds to coproporphyrin III (oxidized coproporphyrinogen III). These results were additionally supported by HPLC (high-performance liquid chromatography) analyses of the pigment from the spent medium (Fig. 5D). To identify the isomer that accumulated, the pigment was purified and analysed by HPLC. A sample of standard coproporphyrin III was also injected into the same system. As can be clearly observed in the HPLC profile, the pigment coelutes with the authentic coproporphyrin III (Fig. 5D). Nevertheless, to rule out the presence of copper in the secreted coproporphyrin III, the purified pigment was further analysed by mass spectrometry. The mass spectrum matched perfectly with coproporphyrin III (data not shown).

Altogether these data demonstrate that the *copA*⁻ mutant extrudes coproporphyrin III under low oxygen tension (microaerobic and anaerobic photosynthetic) conditions. This effect of copper on porphyrin will affect both haem and bacteriochlorophyll biosynthesis pathways and therefore explains the lower amounts of the haem-copper *cbb*₃ oxidase (Fig. 4A and B) and the photosystem (Fig. 4C) in the membranes under excess copper, and the slower growth of the mutant under microaerobic and anaerobic photosynthetic conditions.

*Effect of increasing copper on growth and coproporphyrin release in the *copA*⁻ mutant*

To establish a correlation between Cu⁺ concentration and coproporphyrin release in the medium by the *copA*⁻ mutant, the WT and *copA*⁻ mutant cells were challenged under anaerobic photosynthesis growth with various Cu⁺ concentrations ranging from 1.6 μM to 20 μM. As shown in Fig. 6A, copper affected *copA*⁻ cells growth in a

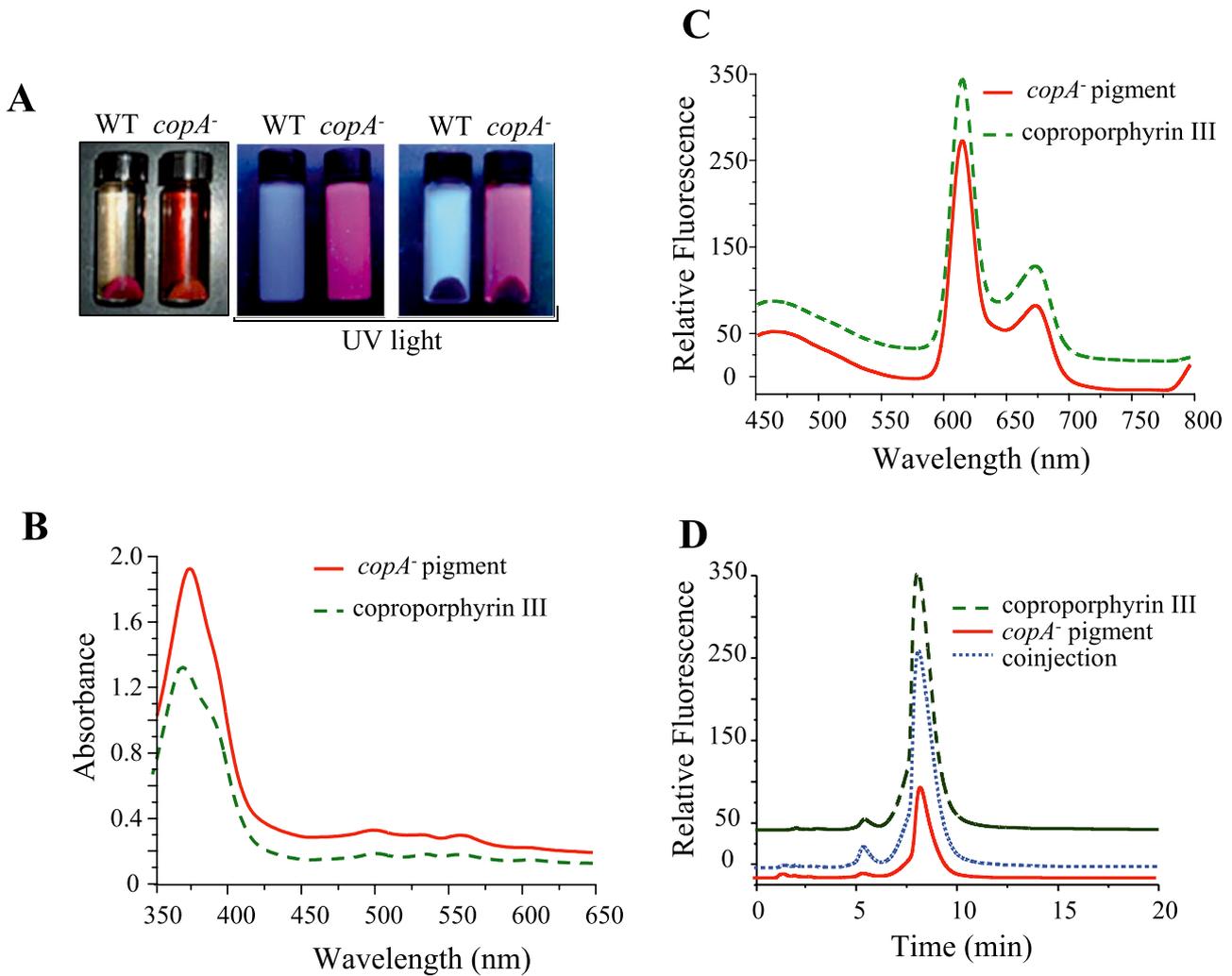


Fig. 5. Characterization of the pigment extracted from the culture medium of *copA*⁻ cells grown under anaerobiosis PS condition.

A. Phenotype of the *copA*⁻ mutant under anaerobiosis and excess copper (20 μ M) compared with the WT. Appearance of the WT and the *copA*⁻ (*copA*:: Ω) mutant in liquid cultures under visible and UV light. The (*copA*::Tn5) and (*copA*::Tp) exhibited the same phenotype. Cultures were also centrifuged to reveal the presence of the UV-fluorescent pigment in the spent medium. Characterization of the pigment extracted from the culture medium of *copA*⁻ cells grown under anaerobiosis PS condition.

B. UV-visible absorption spectra of the spent medium.

C. Fluorescence spectra of the spent medium.

D. HPLC elution profiles of coproporphyrin III (green), pigment from cell free supernatant of *copA*⁻ mutant grown with 20 μ M CuSO₄ (red) and the coinjected pigments (blue).

concentration-dependent manner (within the range of 5–20 μ M) with a growth lag phase. These cells resumed their growth after 48 h with the release of coproporphyrin III in the medium.

The effect of Cu⁺ concentration on coproporphyrin III release was analysed by measuring spectroscopically the presence and amount of coproporphyrin III in the medium of WT and *copA*⁻ mutant. As shown in Fig. 6B, no pigment could be significantly detected in the medium of WT cells irrespective of the copper concentration. In the *copA*⁻ cells only traces of pigments could be detected in the malate medium (1.6 μ M) or in the copper depleted medium (0 μ M). However, addition of 5–20 μ M CuSO₄ had noticeable and

gradual effect on the amount of released coproporphyrin III (Fig. 6B and C). These data show that the amount of released coproporphyrin was copper dependant and that copper affected porphyrin synthesis in a concentration-dependent manner in the *copA*⁻ strain.

In vivo target of excess copper in the tetrapyrrole pathway: characterization of copA⁻ mutant identifies HemN as the first copper target in the tetrapyrrole pathway

Given that coproporphyrinogen III is converted to protoporphyrinogen IX under anaerobiosis and low oxygen tension

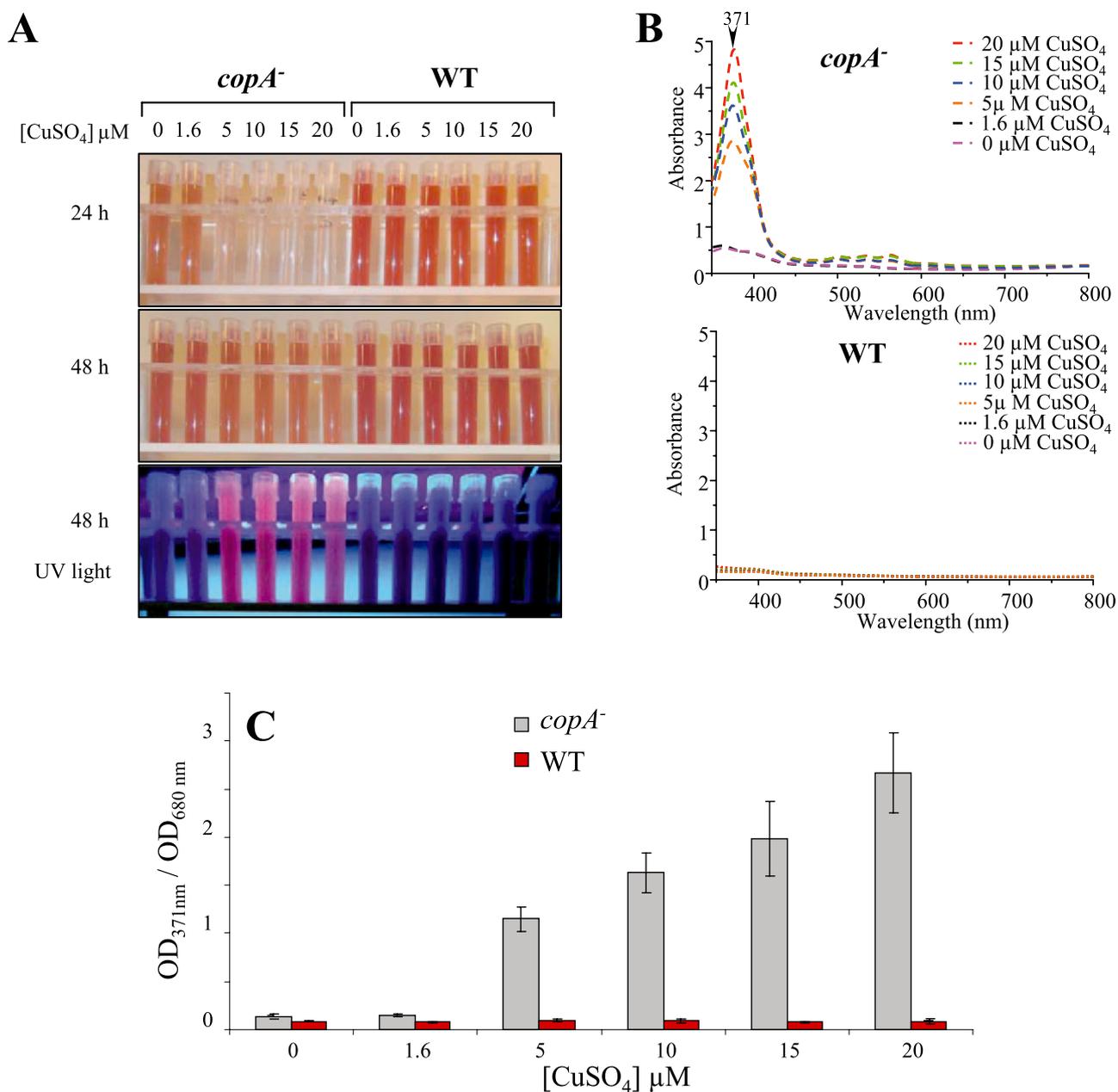


Fig. 6. A. Photosynthetic growth of the *copA*⁻ and WT strains in the presence of increasing copper concentrations (0–20 μM CuSO₄). When grown with excess copper, the *copA*⁻ mutant exhibited a growth lag phase. The addition of 5, 10, 15 or 20 μM CuSO₄ caused a release of the UV-fluorescent coproporphyrin in the spent medium.

B. Absorbance spectra of the spent medium of WT and *copA*⁻. The addition of CuSO₄ increases the coproporphyrin release in a concentration-dependent manner.

C. Correlation between Cu⁺ concentration and coproporphyrin release in the medium. *copA*⁻ and WT strains were grown photosynthetically in the presence of increasing copper concentrations (0–20 μM CuSO₄) as in Fig. 6A. Quantification of coproporphyrin in the medium was performed by absorbance (maxima at 371 nm) and values were normalized by the culture absorbance at 680 nm (1 OD₆₈₀ = 3.10⁹ cells). The data are representative of three independent experiments and the error bars represent standard deviations.

by the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN and that coproporphyrin III (oxidized coproporphyrinogen III) accumulates in a *hemN2*⁻ mutant in *R. gelatinosus* (Ouchane *et al.*, 2007), this implies that HemN expression or activity is affected in the *copA*⁻ mutant under excess

copper. It was also reported in *E. coli* that some [4Fe-4S] iron sulfur-cluster containing enzymes are sensitive to copper (Macomber and Imlay, 2009). Our findings suggest in fact that *in vivo*, HemN, a [4Fe-4S] containing enzyme, is the target of copper in the *copA*⁻ mutant. Because *R. ge-*

latinosus, as many other bacteria, possesses both the anaerobic (HemN) and the aerobic coproporphyrinogen III oxidase (HemF) (Ouchane *et al.*, 2004; 2007), the conversion of coproporphyrinogen III to protoporphyrinogen IX, catalysed under high oxygen tension by HemF, should not be affected in *copA*⁻ strain by excess copper. We therefore checked the presence of coproporphyrin III in the spent medium of *copA*⁻ mutant grown under high or low oxygen tension in presence of excess copper. As shown in Fig. S6 the coproporphyrin III is present in the spent medium only under low oxygen tension, confirming that the excess copper target in the tetrapyrrole pathway is the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase [4Fe-4S] containing HemN. In comparison to the *hem2*⁻ mutant strain of *R. gelatinosus* (*hemN2::Ω*), *hemN2*⁻ mutant accumulates also coproporphyrin III like *copA*⁻ strain only under oxygen limited conditions (semiaerobiosis and microaerobiosis) but not under high oxygen tension (Fig. S6). Unlike *hemN2*⁻ strain, however, which is not photosynthetic, the *copA*⁻ strain still grows by photosynthesis indicating that the *copA*⁻ mutant still produces haem and bacteriochlorophyll, demonstrating that a fraction of HemN enzyme is still active even in the presence of excess copper. As in previous studies which reported that copper can poison cells under strict anaerobiosis (Outten *et al.*, 2001; Macomber *et al.*, 2007; Macomber and Imlay, 2009), our data showed that one of the potential targets of the anaerobic toxicity is the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase and suggested that other [4Fe-4S] containing enzymes could be copper sensitive even in the absence of oxygen.

Discussion

Two homologous Cu⁺-ATPases with distinct specificities

Iron, copper in the form of insoluble sulfides, and other metals were present in the early anaerobic environment on Earth (Crichton and Pierre, 2001; Saito *et al.*, 2003; Canfield *et al.*, 2006). Soluble metals with the ability to transfer electrons such as iron or iron-sulfur clusters were used as cofactors in many enzymes in the anaerobic metabolic pathways (Imlay, 2006). With the appearance of oxygen, some metal bioavailability and utilization had changed and iron for instance, had been replaced by soluble copper recruited to form the active site of the haem-copper oxygen reductases (Castresana and Saraste, 1995; Hendriks *et al.*, 1998). To deal with the availability (rarity/excess) of metals bacteria had evolved uptake systems to provide cells/enzymes with the required cofactor and with efflux system to get rid of any surplus that may be a threat to the cells. Herein we report an example of such a system to allow bacteria to regulate intracellular copper levels. The Cu⁺-ATPase CtpA or homologues are required for the activity of cupro-enzymes

such as the oxygen reductase *cbb*₃ cytochrome *c* oxidase (Preisig *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 2000; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010; Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010b), and the Cu⁺-ATPases CopA is only involved in copper tolerance in many bacteria. Despite the sequence and structural homologies between these proteins, they fulfil two distinct physiological functions and it has been proposed that these ATPases probably have distinct partners within the membrane or the periplasm (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010; Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010b). Furthermore, the present study exploited the ability of *R. gelatinosus copA*⁻ mutant that lacks the copper efflux system, to grow either by oxygenic respiration or anaerobically by photosynthesis to assess the effect of excess copper on respiration and photosynthesis.

Excess copper targets the tetrapyrrole biosynthesis pathway under oxygen limited conditions

In oxygenated medium, copper seems to poison many bacteria through the production of reactive oxygen species (Kimura and Nishioka, 1997; Macomber and Imlay, 2009). In the absence of oxygen, copper can also poison bacteria and it was shown that reduced Cu⁺ was much more toxic. However, the molecular mechanisms of copper toxicity under anaerobic conditions has remained elusive until it was shown that the [4Fe-4S] clusters of dehydratases (dihydroxy-acid dehydratase, isopropylmalate isomerase, fumarase) are the targets of copper toxicity under anaerobiosis in *E. coli* (Macomber and Imlay, 2009).

Our experiments showed that, as in other microorganisms, the toxicity of copper does not necessarily require oxygen and allowed us to identify a new target of copper under microaerobic and anaerobic conditions. Indeed, under excess copper, the *copA*⁻ mutant extruded large amount of coproporphyrin III under anaerobic photosynthetic conditions indicating that among the targets of copper, the tetrapyrrole biosynthesis pathway was affected at the level of the [4Fe-4S] anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN. This result suggested that the poisoning of this mutant by copper occurred through a non-oxidative mechanism probably by damaging the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN. This phenotype was also observed under oxygen limited conditions (microaerobiosis to a less extent semiaerobiosis) when HemN is required in the tetrapyrrole biosynthesis pathway but not under high aeration when the aerobic coproporphyrinogen III oxidase HemF supports the oxidation of coproporphyrinogen III (Fig. 7).

It is noteworthy that HemN is also a radical SAM enzyme with a large active site to accommodate coproporphyrinogen III (Layer *et al.*, 2003). As other SAM radical enzymes, HemN is sensitive towards oxygen because of the exposed

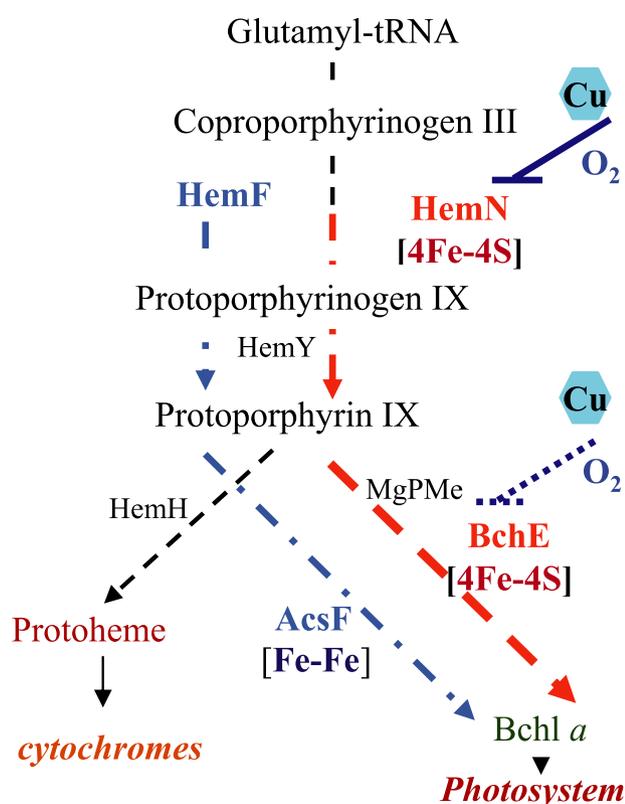


Fig. 7. Tetrapyrrole biosynthesis pathway in *R. gelatinosus* and other facultative phototrophic bacteria. Two branches are indicated depending on the oxygen condition. Under microaerobiosis and anaerobiosis (red arrows) the conversion of coproporphyrinogen III to protoporphyrinogen IX proceeds via the [4Fe-4S] anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN, and the conversion of MgPMe to divinyl protochlorophyllide a via the [4Fe-4S] anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase BchE. Both proteins are oxygen and copper sensitive. The *copA*⁻ mutant accumulates coproporphyrin III (oxidized coproporphyrinogen III) indicating that HemN is affected by copper. Under aerobiosis (high aeration) or excess copper these reactions proceed via the oxygen and probably copper tolerant enzymes HemF and AcsF (blue arrows). For better viewing only some enzymes and intermediates from both pathways are indicated. This figure is available in colour online at wileyonlinelibrary.com.

fourth SAM co-ordinated iron atom of the [4Fe-4S] cluster (Layer *et al.*, 2004; Imlay, 2006). In addition, according to HemN structure, the [4Fe-4S] cluster is buried within the protein. However, a large cleft allows coproporphyrinogen III to enter the active site (Layer *et al.*, 2003) and may also allow the metal ions to access and destroy the [4Fe-4S] cluster. Macomber and Imlay have shown that copper damages the family of [4Fe-4S] dehydratases in which the fourth iron atom is solvent exposed within the active site (Macomber and Imlay, 2009). In this report, our results show that HemN is also copper sensitive and suggest that other members of the radical SAM enzyme family may also be copper or metal sensitive. In this respect, another radical SAM [4Fe-4S] cluster enzyme in the tetrapyrrole

pathway that might be copper sensitive is the Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase BchE. As for HemN/HemF replacement, under high aeration the bacteriochlorophyll biosynthesis pathway utilizes the aerobic version of Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase, AcsF instead of BchE (Pinta *et al.*, 2002; Ouchane *et al.*, 2004) (Fig. 7). AcsF is predicted to be an oxygen tolerant di-iron enzyme and should be also copper tolerant since in the *copA*⁻ the pigmentation of the mutant was comparable to that observed in the WT strain.

On the role of copper in the evolution of [4Fe-4S] containing enzymes

Many studies have reported that some anaerobic [4Fe-4S] containing enzymes have been replaced in metabolic pathways by more efficient and stable aerobic versions as a response and adaptation to oxygen appearance on Earth (Raymond and Blankenship, 2004; Raymond and Segre, 2006). However, in the light of our results and the results reported by Macomber and Imlay clearly demonstrating that copper damages [4Fe-4S] cluster under anaerobiosis or limited oxygen tension, it seems important to take into account metals such as copper in the selection pressure leading to the evolution of copper/oxygen tolerant enzymes. In this evolutionary context, since copper targets the 4Fe-4S clusters in the anaerobic enzymes, one may ask how bacteria dealt with copper in the anaerobic and early oxidizing environment on Earth. In this environment, many metabolic pathways used 4Fe-4S containing enzymes that became vulnerable and a potential target of soluble copper. According to Dupont *et al.* (2011), damage and inhibition of Fe-S metabolism might have been the initial manifestation of copper toxicity upon oxygen appearance (Dupont *et al.*, 2011). It is then tempting to speculate that, since in the early anaerobic earth, copper would have been insoluble or complexed with sulphate; bacteria were not directly exposed to harmful copper and may have not yet evolved a specific efflux copper system. With the gradual oxygen evolution and oxidation on Earth, bioavailability of copper increased, providing selective pressure for bacteria that have acquired or evolved an efflux system from existing transporters involved in other metal homeostasis under anaerobiosis. The sequence and structural homologies as well as the overlapping specificities of many P-type ATPases (ZntA: P-type ATPase that catalyses efflux of Zn, Cd, or Pb, and CopA that catalyses efflux of Cu⁺ and Ag) (Rensing and Grass, 2003) argue for a possible evolution of these transporters to broaden their substrate specificities and to reduce their selectivity. To be recruited in the haem-copper oxygen reductases, copper should be transported and delivered in the membrane. A P-type ATPase with high affinity for copper and slow transfer kinetics as

described by Arguello group (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010; Raimunda *et al.*, 2011) may have evolved to achieve this task.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth media

Escherichia coli was grown at 37°C in LB medium. *R. gelatinosus* was grown at 30°C, in the dark and aerobically (high oxygenation: 250 ml flasks containing 20 ml medium), micro-aerobically (low oxygenation: 50 ml flasks filled with 50 ml medium) or anaerobically in light (photosynthesis in filled and sealed tubes) on malate growth medium (Khalifaoui Hassani *et al.*, 2010a). Antibiotics were used at the following concentrations: kanamycin (km), streptomycin/spectinomycin (Ω), ampicillin, and trimethoprim (Tp) were at 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and tetracycline 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The malate copper concentration is 1.6 μM and exogenous copper CuSO_4 was added to the growth medium at different concentrations. Bacterial strains and plasmids are listed in Table S1.

Molecular biology techniques

Standard methods were performed according to Sambrook *et al.* (1989) unless indicated otherwise. The *copA* and *copR* sequences reported in this paper were deposited in GenBank with Accession number: JX902313 for *copA* and JX902314 for *copR*.

Transposon mutagenesis and mapping

Rubrivivax gelatinosus WT strain was mutagenized using the EZ-Tn5 <KAN-2>Tnp Transposome Kit by following the manufacturer's protocol (Epicentre). DNA was prepared from the isolated mutants. Approximately 10 μg of DNA was digested with PstI, ligated with PstI linearized KS bluescript and transformed into *E. coli*. Transformants were selected on LB agar plates containing kanamycin. Plasmids were isolated and DNA flanking the Tn5 was sequenced with KAN-2 RP-1 reverse primer supplied with EZ-Tn5 kit.

Gene cloning and plasmid constructions for allele replacement

To clone the *copA* gene from genomic DNA of *R. gelatinosus*, a 1.9 kb fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers *copA*-F1 and *copA*-R2 (Table SII). The fragment was cloned into the PCR cloning vector pDrive to give pSA1. The *copA* gene was inactivated by the insertion of the Ω and Tp cassettes at the MscI sites within the *copA* coding sequence. Briefly, plasmid pSA1 was subjected to MscI restriction enzyme digestion prior to ligation with the 2 kb Smal blunt digested Ω cassette or the 0.7 kb Smal digested Tp cassette. The resulting recombinant plasmids were designated pSA2 (*copA::Tp*) and pSA3 (*copA::\Omega*). Furthermore a plasmid (pB79-1) containing the *copA* gene was also isolated from the *R. gelatinosus* genomic DNA library using primers *copA*-F2 and *copA*-R2. A 5 kb fragment containing *copA* was subcloned from pB79-1 in pBBR3-Tc at the SpeI-Acc65I sites. The resulting plasmid

was designated pBRCopA. *copR* gene was subcloned from pB79-1 in pDrive using the primers *copR*-F and REV listed in Table SII. The resulting plasmid pSA4 was linearized by BtrI and ligated with the Smal Tp cassette. The resulting plasmid was designated pSA5.

Gene transfer and strain selection

Transformation of *R. gelatinosus* cells was performed by electroporation (Ouchane *et al.*, 1996). Transformants were selected on malate plates supplemented with the appropriate antibiotic under aerobic conditions. Following transformant selection, template genomic DNA was prepared from the ampicillin sensitive transformants and confirmation of the antibiotic resistance marker's presence at the desired locus was performed by PCR.

Construction of *R. gelatinosus* CopA-H₆ strain

The *copA*-His₆-tagged construct was generated by cloning *copA* in the pET-28b plasmid. The *copA* gene was amplified by PCR from pB79-1 plasmid using the *copA*-EcoRI and *copA*-HindIII primers. HindIII site was introduced the TGA stop codon to generate an in frame fusion. The resulting plasmid pCopAH₆ was sequenced and integrated at the *copA* locus on the chromosome of *R. gelatinosus* by selecting for kanamycin resistant colonies. The integration of this plasmid at the *copA* locus was tested by PCR on genomic DNA.

Membrane protein preparation and spectrophotometric measurements

The membranes were prepared by cell disruption with a French press in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, followed by differential ultracentrifugations. The membranes were then resuspended in the same buffer. Absorption spectroscopy was performed with a CARY 500 spectrophotometer.

Pigment purification and HPLC conditions

Purification and HPLC analyses of the pigments produced by the *copA*⁻ mutants were performed as described in Wright *et al.* (1983). Authentic coproporphyrin III was purchased from Frontier Scientific.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA from WT cells grown photosynthetically under different copper concentrations was extracted according to Steunou *et al.* (2004). The RNA concentration was determined by absorption at 260 nm. Specific primers were designed to amplify fragments of *R. gelatinosus* *copA* and *pucB* genes. The primers used for RT-PCR are in Table SII. Reverse primers for each gene were annealed to 2 μg of total RNA extracted and extended for 50 min in the presence of 1 mM dNTPs at 55°C using 200U of reverse transcriptase (RT) (Superscript III, Invitrogen). Two microlitre of the RT reaction was used for the subsequent PCR; each PCR reac-

tion contained 50U of *Taq* DNA polymerase (Qiagen, Valencia, CA) and 5 % dimethylsulphoxide. The PCR programme included one cycle of 95°C for 1 min, 30 cycles of 94°C for 10 s, 54°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final incubation at 72°C for 10 min. Amplified products were analysed by electrophoresis in a 1.2% agarose gel.

Blue-native gel electrophoresis

The membranes were prepared as previously described (Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010a). To assay *ccb₃* activity, WT, *ctpA⁻*, *copA⁻* and *ctpA-copA⁻* strains were grown microaerobically. BN-PAGE and in gel-Cox activity assays were performed as described in (Khalfaoui Hassani *et al.*, 2010a). Two milligram of membrane proteins were solubilized for 30 min on ice in 0.1 M Tris HCl buffer pH 8 containing 1% (w/v) n-Dodecyl β-D-Maltoside (DDM), 10% (v/v) glycerol and 0.3 M NaCl. The solubilized proteins were cleared by centrifugation 70000 r.p.m. for 15 min (TL100 Beckman). 4.5 μl of loading buffer: 5% (w/v) blue G250 and 500 mM n-aminocaproic acid, were added to the supernatant. BN-PAGE electrophoresis was performed with modifications: the gel buffer contained 75 mM Bis-Tris and 0.75 M n-aminocaproic acid, pH 7.0 and 0.03% (w/v) of DDM was added in the cathode buffer. The Cox was revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). To estimate changes in the level of the activity or amount of proteins, quantification of the band intensity was achieved using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

R. gelatinosus *ccb₃* antibodies production

Rubrivivax gelatinosus ccb₃-(CcoP-His₆) was expressed in *R. gelatinosus* and purified (to be published elsewhere). The purified complex was run on a 12% SDS-PAGE, Coomassie stained, CcoO and CcoP bands were cut and used for antibodies production in rabbits (Eurogentec). Antibodies directed against an N-terminus synthetic peptide of CcoN 2-AHESPATPVYYDTPV-17 were produced in rabbits (Eurogentec). The specific peptide-antibodies were further purified by a peptide-affinity column according to the method applied by Eurogentec.

Western blot and immunodetection

Membrane protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid assay (Sigma) using bovine serum albumin as a standard. Forty-five microgram (for *ccb₃* subunits detection) or 40 μg (for CopA-His₆ detection) of total protein was separated by SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and further transferred to a polyvinylidene difluoride membrane Hybond ECL PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (GE Healthcare). Before loading, samples were treated 10 min at 37°C for the detection of CcoN or 15 min at 75°C for CcoO and CcoP detection or 5 min 95°C for the detection of CopA-His₆. Membranes were probed with different primary antibodies α-CcoN (dilution 1:1000), α-CcoO (dilution 1:10000) and α-CcoP (dilution 1:5000). Secondary horseradish peroxidase-conjugated (HRP) goat anti-rabbit antibody (Bio-Rad) was used at a 1:5000 dilution. For the detection of CopA-His₆, the HisProbe-HRP (from Pierce) was used according to the manufacturer instructions. Reactive bands were detected using a chemilu-

minescent HRP substrate according to the method of Haan and Behrmann (2007). Image capture was performed with a LAS-3000 cooled CCD camera system (Fuji).

Acknowledgements

We are grateful to Dr James Webb at Illinois State University for his assistance with the coproporphyrin III analyses. We thank Ileana Agalidis for the purification of *ccb₃*-His₆ used to raise antibodies. This work was supported by the ANR (ANR BLAN06-2_147814).

References

- Abdel-Ghany, S.E. (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta* **229**: 767–779.
- Abdel-Ghany, S.E., Muller-Moule, P., Niyogi, K.K., Pilon, M., and Shikanai, T. (2005) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* **17**: 1233–1251.
- Canfield, D.E., Rosing, M.T., and Bjerrum, C. (2006) Early anaerobic metabolisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 1819–1834; discussion 1835–1816.
- Castresana, J., and Saraste, M. (1995) Evolution of energetic metabolism: the respiration-early hypothesis. *Trends Biochem Sci* **20**: 443–448.
- Castruita, M., Casero, D., Karpowicz, S.J., Kropat, J., Vieler, A., Hsieh, S.I., *et al.* (2011) Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. *Plant Cell* **23**: 1273–1292.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C.E., O'Halloran, T.V., and Mondragon, A. (2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* **301**: 1383–1387.
- Crichton, R.R., and Pierre, J.L. (2001) Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals* **14**: 99–112.
- Dupont, C.L., Grass, G., and Rensing, C. (2011) Copper toxicity and the origin of bacterial resistance – new insights and applications. *Metallomics* **3**: 1109–1118.
- Gonzalez-Guerrero, M., Raimunda, D., Cheng, X., and Arguello, J.M. (2010) Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **78**: 1246–1258.
- Gourdon, P., Liu, X.Y., Skjorringe, T., Morth, J.P., Moller, L.B., Pedersen, B.P., and Nissen, P. (2011) Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature* **475**: 59–64.
- Haan, C., and Behrmann, I. (2007) A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods* **318**: 11–19.
- Hendriks, J., Gohlke, U., and Saraste, M. (1998) From NO to O₂: nitric oxide and dioxygen in bacterial respiration. *J Bioenerg Biomembr* **30**: 15–24.
- Imlay, J.A. (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* **59**: 1073–1082.
- Khalfaoui Hassani, B., Steunou, A.S., Liotenberg, S., Reiss-Husson, F., Astier, C., and Ouchane, S. (2010a) Adaptation to oxygen: role of terminal oxidases in photosynthesis ini-

- tiation in the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*. *J Biol Chem* **285**: 19891–19899.
- Khalifaoui Hassani, B.K., Astier, C., Nitschke, W., and Ouchane, S. (2010b) CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes. *J Biol Chem* **285**: 19330–19337.
- Kimura, T., and Nishioka, H. (1997) Intracellular generation of superoxide by copper sulphate in *Escherichia coli*. *Mutat Res* **389**: 237–242.
- Koch, H.G., Winterstein, C., Saribas, A.S., Alben, J.O., and Daldal, F. (2000) Roles of the *ccoGHIS* gene products in the biogenesis of the cbb(3)-type cytochrome *c* oxidase. *J Mol Biol* **297**: 49–65.
- Layer, G., Moser, J., Heinz, D.W., Jahn, D., and Schubert, W.D. (2003) Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of radical SAM enzymes. *EMBO J* **22**: 6214–6224.
- Layer, G., Heinz, D.W., Jahn, D., and Schubert, W.D. (2004) Structure and function of radical SAM enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 468–476.
- Macomber, L., and Imlay, J.A. (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 8344–8349.
- Macomber, L., Rensing, C., and Imlay, J.A. (2007) Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 1616–1626.
- Nagashima, S., Kamimura, A., Shimizu, T., Nakamura-Isaki, S., Aono, E., Sakamoto, K., *et al.* (2012) Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144. *J Bacteriol* **194**: 3541–3542.
- Osman, D., and Cavet, J.S. (2008) Copper homeostasis in bacteria. *Adv Appl Microbiol* **65**: 217–247.
- Ouchane, S., Picaud, M., Reiss-Husson, F., Vernotte, C., and Astier, C. (1996) Development of gene transfer methods for *Rubrivivax gelatinosus* S1: construction, characterization and complementation of a *puf* operon deletion strain. *Mol Gen Genet* **252**: 379–385.
- Ouchane, S., Steunou, A.S., Picaud, M., and Astier, C. (2004) Aerobic and anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclases in purple bacteria: a strategy adopted to bypass the repressive oxygen control system. *J Biol Chem* **279**: 6385–6394.
- Ouchane, S., Picaud, M., Therizols, P., Reiss-Husson, F., and Astier, C. (2007) Global regulation of photosynthesis and respiration by FnrL: the first two targets in the tetrapyrrole pathway. *J Biol Chem* **282**: 7690–7699.
- Outten, F.W., Outten, C.E., Hale, J., and O'Halloran, T.V. (2000) Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*. *J Biol Chem* **275**: 31024–31029.
- Outten, F.W., Huffman, D.L., Hale, J.A., and O'Halloran, T.V. (2001) The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 30670–30677.
- Page, M.D., Kropat, J., Hamel, P.P., and Merchant, S.S. (2009) Two *Chlamydomonas* CTR copper transporters with a novel cys-met motif are localized to the plasma membrane and function in copper assimilation. *Plant Cell* **21**: 928–943.
- Pinta, V., Picaud, M., Reiss-Husson, F., and Astier, C. (2002) *Rubrivivax gelatinosus acsF* (previously *orf358*) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester. *J Bacteriol* **184**: 746–753.
- Preisig, O., Zufferey, R., and Hennecke, H. (1996) The *Bradyrhizobium japonicum fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase. *Arch Microbiol* **165**: 297–305.
- Raimunda, D., Gonzalez-Guerrero, M., Leeber, B.W., 3rd, and Arguello, J.M. (2011) The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *Biometals* **24**: 467–475.
- Raymond, J., and Blankenship, R. (2004) Biosynthetic pathways, gene replacement and the antiquity of life. *Geobiology* **2**: 199–203.
- Raymond, J., and Segre, D. (2006) The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science* **311**: 1764–1767.
- Rensing, C., and Grass, G. (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 197–213.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., and Rosen, B.P. (2000) CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 652–656.
- Roh, J.H., and Kaplan, S. (2000) Genetic and phenotypic analyses of the *rdx* locus of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **182**: 3475–3481.
- von Rozycki, T., and Nies, D.H. (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**: 115–139.
- Saito, M.A., Sigman, D.M., and Morel, F.M.M. (2003) The bioinorganic chemistry of the ancient ocean: the co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the Archean/Proterozoic boundary. *Inorganica Chim Acta* **356**: 308/318.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Soloz, M., Abicht, H.K., Mermod, M., and Mancini, S. (2010) Response of gram-positive bacteria to copper stress. *J Biol Inorg Chem* **15**: 3–14.
- Steunou, A.S., Astier, C., and Ouchane, S. (2004) Regulation of photosynthesis genes in *Rubrivivax gelatinosus*: transcription factor PpsR is involved in both negative and positive control. *J Bacteriol* **186**: 3133–3142.
- Tottey, S., Rich, P.R., Rondet, S.A., and Robinson, N.J. (2001) Two Menkes-type atpases supply copper for photosynthesis in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* **276**: 19999–20004.
- Wright, D.J., Rideout, J.M., and Lim, C.K. (1983) High-performance liquid chromatography of coproporphyrin isomers. *Biochem J* **209**: 553–555.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Table SI: Bacterial strains and plasmids

	Relevant characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
<i>R. gelatinosus</i>		
Strain S1	Wild type (WT)	(Uffen, 1976)
<i>ctpA</i> ⁻	<i>ctpA</i> deletion strain (<i>ctpA::Km</i>)	(Khalfaoui <i>et al.</i> , 2010)
<i>copATn</i>	<i>copA</i> insertion strain (<i>copA::Tn5</i>)	This work
<i>copATp</i>	<i>copA</i> deletion strain (<i>copA::Tp</i>)	This work
<i>copA</i> Ω	<i>copA</i> deletion strain (<i>copA::Ω</i>)	This work
<i>ctpA-copA</i> ⁻	<i>ctpA</i> (<i>ctpA::Km</i>) and <i>copA</i> (<i>copA::Ω</i>) deletion strain	This work
<i>copR</i> ⁻	<i>copR</i> inactivated strain (<i>copR::Tp</i>)	This work
CopA-H ₆	strain bearing the His6 tagged <i>copA</i> gene on the chromosome	This work
CopA-H ₆ _ <i>copR</i> ⁻	<i>copR</i> inactivated strain (<i>copR::Tp</i>) bearing the His6 tagged <i>copA</i> gene on the chromosome	This work
<i>hemN2</i> Ω	<i>hemN2</i> deletion strain (<i>hemN2::Ω</i>)	(Ouchane <i>et al.</i> , 2007)
Plasmids		
pGEM-T	cloning vector (Ap ^r)	Promega
pDrive	cloning vector (Ap ^r Km ^r)	Qiagen
pUC4K	plasmid bearing the Km cartridge (Ap ^r Km ^r)	Pharmacia
p34S-Tp	plasmid bearing the Tp cartridge (Tp ^r)	(Dennis <i>et al.</i> , 1998)
pDW9	plasmid bearing the Ω cartridge (Sp ^r , Sm ^r)	(Prentki <i>et al.</i> , 1984)
pBBR1MCS-3	(mob ⁺ , Tc ^r) expression vector	(Kovach <i>et al.</i> , 1994)
pB79-1	pBBR1MSC-4 with 5 kb insert containing the <i>cop</i> genes isolated from WT genomic DNA library	This work
pSA1	pDrive containing <i>copA</i> 1.9 kb PCR fragment	This work
pSA2	Tp cartridge inserted in the MscI site within <i>copA</i> in pSA1	This work
pSA3	Ω cartridge inserted in the MscI site within <i>copA</i> in pSA1	This work
pBRCopA	5 kb SpeI-Acc65I fragment from pB79-1 cloned in pBBR1MCS-3	This work
pSA4	pDrive + 1.5 kb PCR fragment containing <i>copR</i>	This work
pSA5	Tp cartridge inserted in the BtrI site within <i>copR</i> in pSA4	This work
pCopAH ₆	<i>copA</i> gene cloned in the pET28b plasmid at the EcoRI-XhoI sites	This work

Ap^r, ampicillin resistant, Km^r, kanamycin resistant, Tp^r, trimethoprim resistant, Tc^r, tetracyclin resistant, Ω , Sp^r, Sm^r, spectinomycin and streptomycin resistant.

References:

- Dennis, J.J., and Zylstra, G.J. (1998) Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2710-2715.
- Khalfaoui Hassani, B.K., Astier, C., Nitschke, W., and Ouchane, S. (2010) CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes. *J Biol Chem* **285**: 19330-19337.

- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop II, R.M., and Peterson, K.M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* **16**: 800-802.
- Ouchane, S., Picaud, M., Therizols, P., Reiss-Husson, F., and Astier, C. (2007) Global regulation of photosynthesis and respiration by FnrL: the first two targets in the tetrapyrrole pathway. *J Biol Chem* **282**: 7690-7699.
- Prentki, P., and Krisch, H.M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Uffen, R.L. (1976) Anaerobic growth of a *Rhodospseudomonas* species in the dark with carbon monoxide as sole carbon and energy substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 3298-3302.

Table SII: Primers used in this work

Gene	Primer	Sequence 5' to 3'
<i>copA</i>	copA-F2	CTGGCCTTCGGCGACACCGTG
	copA-R2	CAGCACCTCGGCGCGCACCTC
<i>copA</i>	copA-F1	GGCATGACCTGCGCCTCGTGC
	copA-R2	CAGCACCTCGGCGCGCACCTC
<i>copA</i>	copA-EcoRI	ACTGCGCCAGAATTCGGACTCGC
	copA-HindIII	CGCCGATGTTCAAGCTTCGACTCTCC
<i>copR</i>	copR-F	CTGGCCTTCGGCGACACGGT
	copR-REV	TGTAAAACGACGGCCAGT
RT-PCR		
<i>copA</i>	RG35_copA-F	GTCGAACGCACGCTGAAG
	RG36_copA-R	GGTCATGCCCTCGACCTT
<i>pucB</i>	539 pucB-F	GGCAGATGATGGCAAACAAG
	540 pucB-R	GTGGAGCCACGGCGTATAG

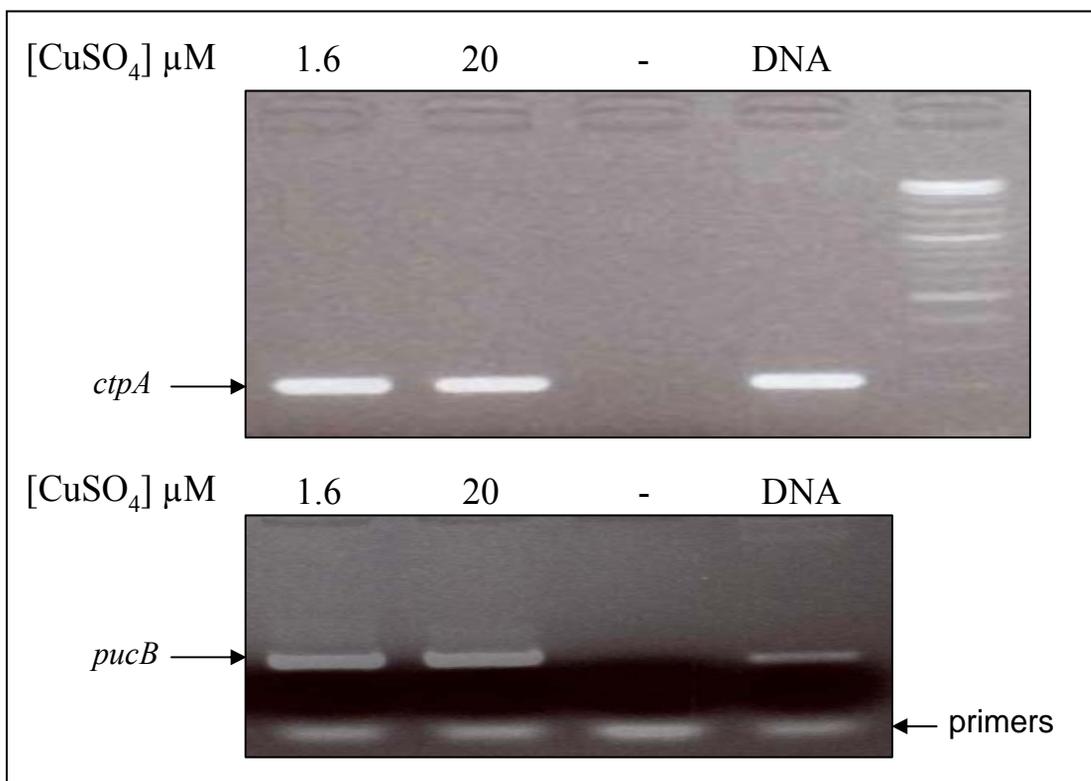


Fig. S2

Expression profile of *ctpA* in response to copper. *ctpA* gene expression level was monitored by RT-PCR on RNA extracted from cells grown under anaerobic photosynthesis conditions in the presence of 1.6 or 20 μM CuSO₄. *pucB* gene was used as a positive control.

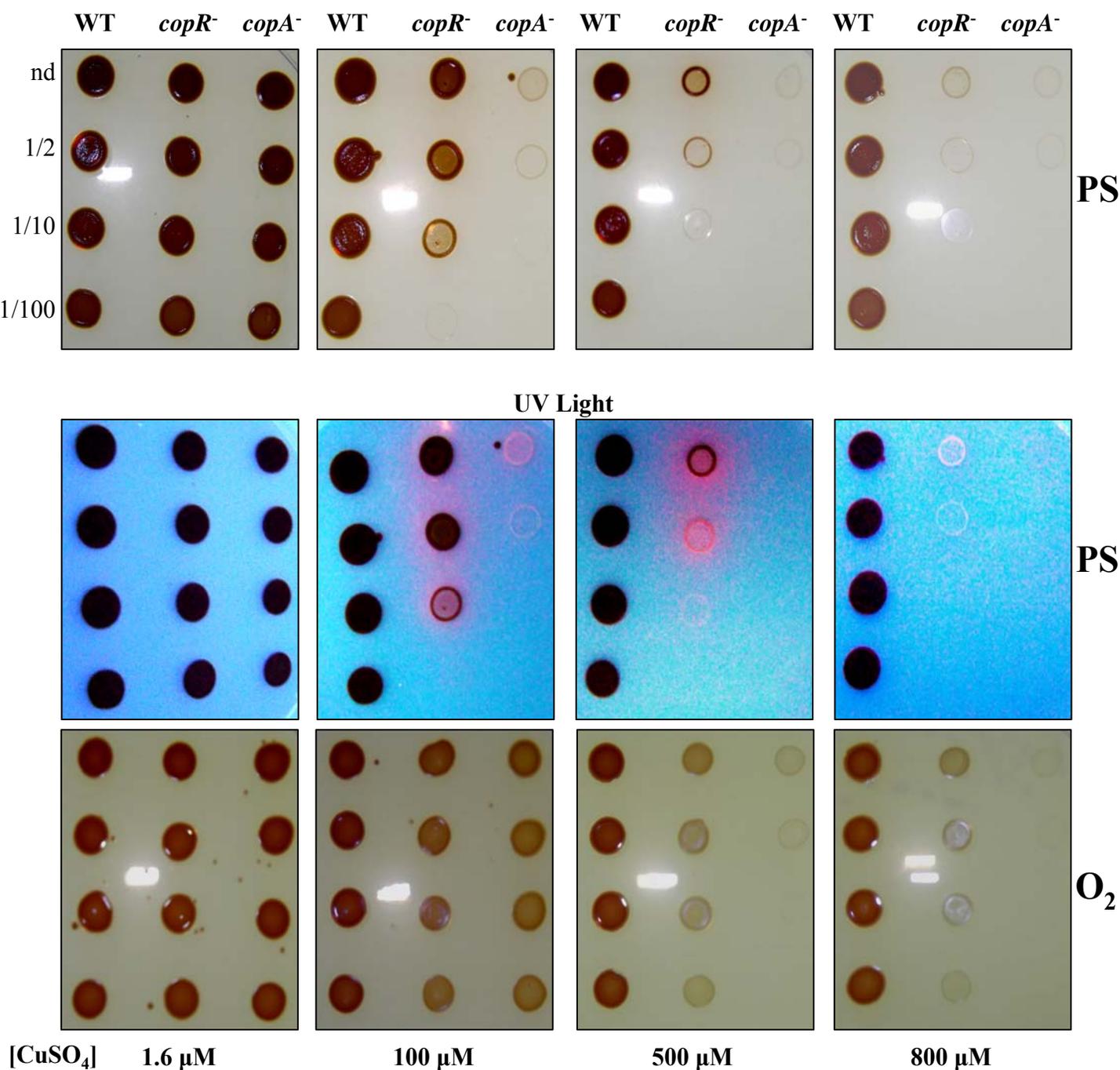


Fig. S3

copR⁻ mutant growth on copper under photosynthesis (PS) or aerobic respiration (O₂).

Growth phenotype and cell viability of the WT, *copR*⁻ (*copR*::Tp) and *copA*⁻ (*copA*::Ω) mutants in the presence of increasing copper concentrations (1.6 to 800 μM CuSO₄). For spots, 10 μl of 1/2, 1/10, 1/100 diluted or undiluted (nd) cultures were spotted on the plates. Cells were grown for 48 h at 28 °C prior to photography.

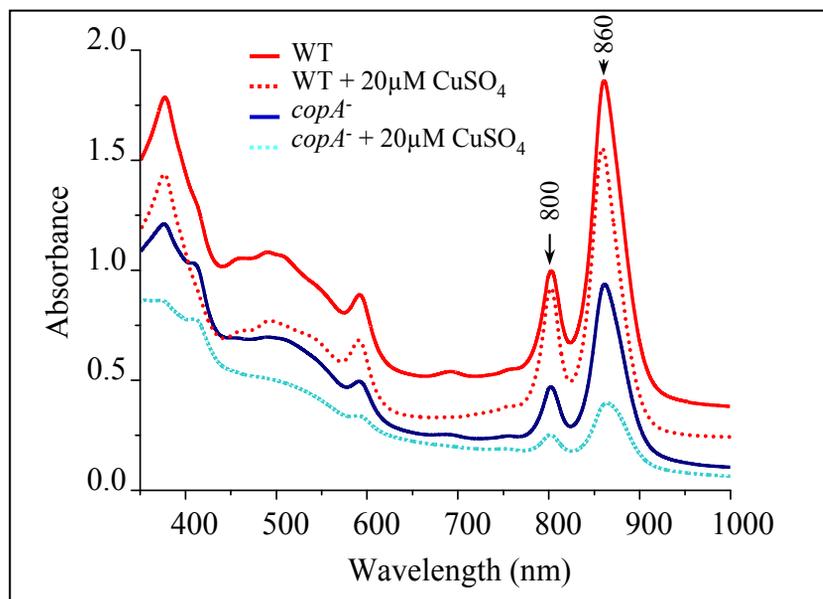


Fig. S4

Spectral analyses of the WT and *copA*⁻ mutant membranes. Cells were grown microaerobically in malate medium (1.6 μM CuSO₄) or in malate supplemented with 20 μM CuSO₄ and equal amount of membranes were used to record the spectra. The spectra showed a significant decrease in the amount of reaction centre and light harvesting antenna LHI and LHII (800-860 nm) in the *copA*⁻ mutant. The decrease is more pronounced in the *copA*⁻ mutant under excess copper.

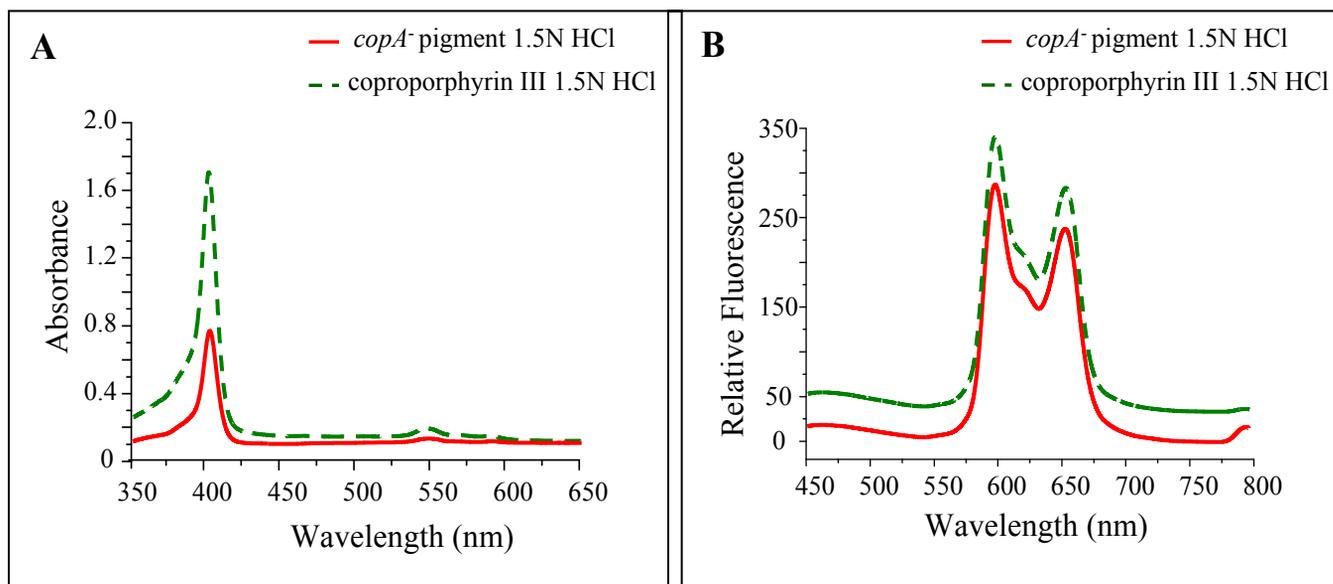


Fig. S5

A- Absorbance spectra of the pigment produced by *copA*⁻ mutant in comparison with coproporphyrin III.

Samples were brought to 1.5N HCl before spectra were recorded.

B- Fluorescence spectra of HCl acidified spent medium. Samples were analyzed using a Perkin Elemer LS50B

luminescence spectrometer with an excitation wavelength of 400 nm.

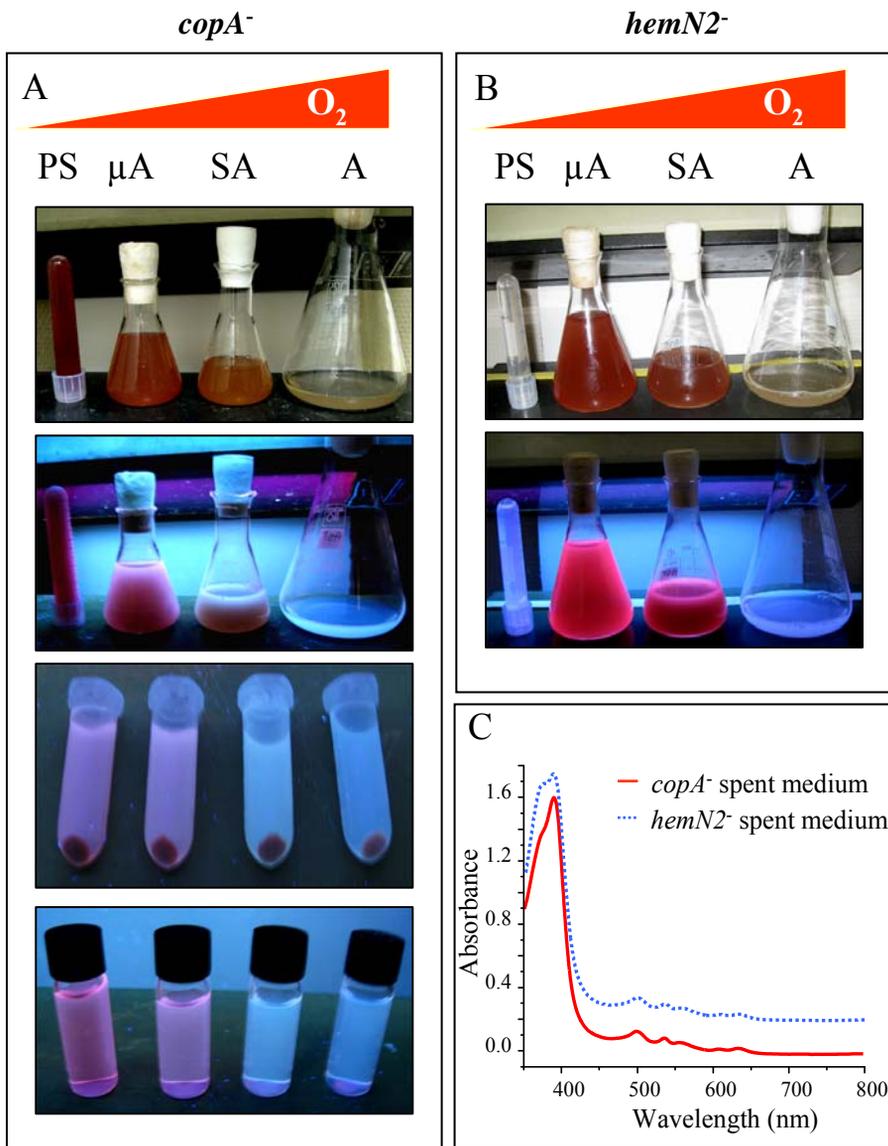


Fig. S6

Characterization of the pigments in the culture medium of *copA*⁻ mutant in comparison with the *hemN2*⁻ mutant. Cells were grown by respiration or under anaerobic PS conditions in malate medium for *hemN2*⁻ mutant and with 20μM CuSO₄ for *copA*⁻ mutant.

A- Phenotype of the *copA*⁻ mutant in liquid cultures under visible and UV light. Cultures were also centrifuged to reveal the presence of the UV-fluorescent pigment in the spent medium.

B- Phenotype of the *hemN2*⁻ mutant in liquid cultures under visible and UV light.

C- Spectral analyses of the spent medium of *copA*⁻ and *hemN2*⁻ mutants. Both strains produced coproporphyrin III in the spent medium only under low oxygen tension, confirming that the excess copper primary targets the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN. Unlike *hemN2*⁻ strain, which is not photosynthetic, the *copA*⁻ strain still grows by photosynthesis indicating that the *copA*⁻ mutant still produces heme and bacteriochlorophyll and that a fraction of anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN is still active in the *copA*⁻ mutant.

Partie II : Identification d'autres gènes impliqués dans la tolérance au cuivre

Dans la partie I, nous avons identifié et caractérisé le rôle d'une deuxième ATPase de type CPx CopA dans la tolérance au cuivre. Contrairement à CtpA, CopA est importante pour la croissance en présence de concentrations élevées en cuivre chez *R. gelatinosus*. Le rôle physiologique de chacune des deux ATPases pourrait être déterminé par des interactions spécifiques entre ces transporteurs et des protéines partenaires périplasmiques ou membranaires.

En effet, l'ATPase CopA pourrait avoir d'autres partenaires induits en réponse à un excès de cuivre. Ces partenaires assureraient soit le transport du cuivre vers un système d'efflux de la membrane externe soit séquestretraient le cuivre au niveau du périplasma dans le cas où la bactérie ne dispose pas de système d'efflux de cuivre au niveau de la membrane externe. Afin d'identifier d'éventuels partenaires de CopA dans la tolérance au cuivre, nous avons considéré l'hypothèse qu'en réponse à un excès de cuivre dans le milieu, la souche sauvage pourrait en plus de CopA induire fortement l'expression d'autres protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre.

II.1- Protéines induites en présence d'excès de cuivre

Pour identifier d'éventuels facteurs de tolérance au cuivre, nous avons analysé sur un gel 1D dénaturant SDS-PAGE des extraits protéiques solubles et membranaires préparés à partir de cellules du wt cultivées dans du milieu malate en présence de 1,6 μM de CuSO_4 ou d'excès de cuivre (1,2 mM). La comparaison du profil d'expression des protéines membranaires ne montre aucune différence significative. Cependant, l'analyse de la fraction des protéines solubles indique la présence de trois protéines (bandes A, B et C de la figure 35) de masse moléculaire apparente d'environ 18, 15 et 14 kDa fortement induites en présence de cuivre (1,2 mM) par comparaison à la fraction isolée à partir de cellules poussées dans du milieu malate (1,6 μM).

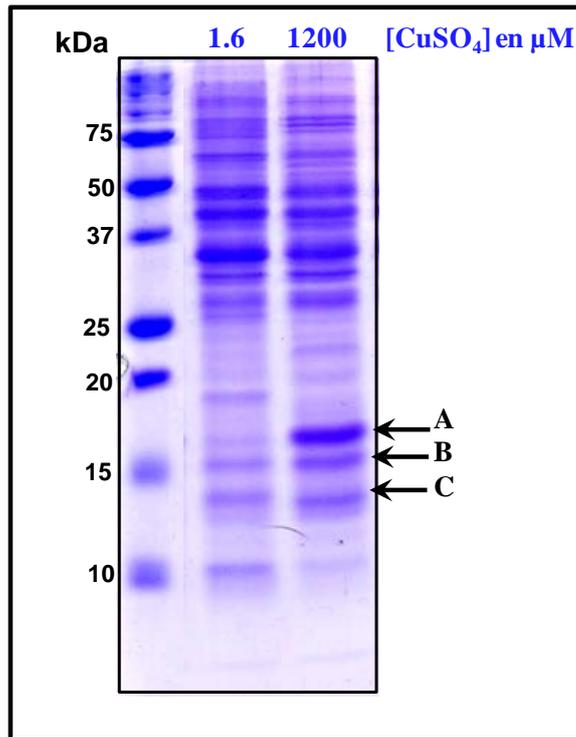


Figure 36 : Effet de l'excès de cuivre (1200 μM) sur l'expression des protéines solubles.

Les fractions solubles isolées à partir de la souche sauvage cultivée en micro-aérobie en présence de 1,6 μM et 1200 μM sont analysées sur SDS-PAGE 14% d'acrylamide. Les bandes A, B et C sont induites par le cuivre.

L'analyse de ces bandes par spectrométrie de masse, a permis d'identifier au moins deux protéines qui pourraient être importantes pour la tolérance au cuivre. Il s'agit des protéines CopI et CopJ. Les gènes qui codent pour ces deux protéines se trouvent en aval des gènes *copA* et *copR* (Figure 36).



Figure 37 : Les gènes codant les protéines CopI et CopJ sont localisés en aval du gène *copA*.

Les résultats de la spectrométrie de masse révèlent la présence de CopI dans les bandes A et B de masse moléculaire apparente de 18 et 15 kDa alors que CopJ est identifiée dans la bande C de masse moléculaire apparente de 14 kDa. Le pourcentage de recouvrement

de séquences de la protéine CopI identifiées dans ces bandes est respectivement de 44% et de 48% alors que pour la protéine CopJ est de 69% (Figure 37).

CopI non mature

Bande A

```

1  MNRILRPALL CVAALFATTA QADAGHDHGS AHAGAHADA DTPYGRPGDA
51  AKAQRTVRVV MSDTMRFDPA TITVRRGETV RFVAANGGRI EHEFVLGTTA
101 SLKAHAQEMR AMPDMQHADP GAVRVAAGAS GEIVWQFKA GSFEFACLIP
151 GHFEAGMVGK VVVR

```

CopI mature

Bande B

```

24  DAGHDHGS AHAGAHADA DTPYGRPGDA AKAQRTVRVV MSDTMRFDPA
48  TITVRRGETV RFVAANGGRI EHEFVLGTTA SLKAHAQEMR AMPDMQHADP
98  GAVRVAAGAS GEIVWQFKA GSFEFACLIP GHFEAGMVGK VVVR

```

CopJ non mature

Bande C

```

1  MKRRELFAAA LAAGMPALAA AAPALPPVQ VWKSPTCGCC GAWVTHMRQA
51  GFAVEVHEVQ DIDASRLLG MPATYGSCHT ARVAGYLLEG HVPAAEVRRL
101 LANKPVAIGL AVPGMPAGSP GMEHGARRDA YEVLLVEKGG GARVFARYNG
151 G

```

Figure 38 : Identification de CopI et CopJ par spectrométrie de masse.

En rouge sont les peptides identifiés par spectrométrie de masse. En jaune les résidus histidines, méthionines et cystéines qui pourraient être impliqués dans l'interaction avec le cuivre. En gris le peptide signal.

II-2- Description des protéines codées par les gènes copI, copJ et copH

II-2.1- La protéine CopI

L'analyse de la séquence CopI par différents programmes (Swissprot/ Embl) de prédictions de structure et localisation subcellulaire indique qu'aucun domaine transmembranaire n'est présent dans CopI et qu'il s'agit d'une protéine soluble.

De plus, ces programmes révèlent la présence d'une séquence signal dans l'extrémité N-terminal. La présence de cette séquence signal suggère une localisation périplasmique de CopI une fois maturée (bande 15 kDa/ Figure 35). La bande de 17 kDa (Figure 35)

correspondrait à la forme non maturée. Il est également possible qu'il y ait une protéolyse de CopI (bande B). Cependant, aucun peptide tryptique n'a été identifié par spectrométrie de masse dans la séquence signal de la protéine CopI. Ces peptides signaux seraient probablement éliminés ce qui suggère fortement une localisation périplasmique de la protéine CopI. Par ailleurs, nous avons exprimé CopI-H6 dans une souche d'*E.coli* en présence de concentrations croissantes en cuivre, les résultats du western blot révèlent la présence de deux bandes, il pourrait s'agir de la forme maturée et non maturée de CopI (Figure 38).

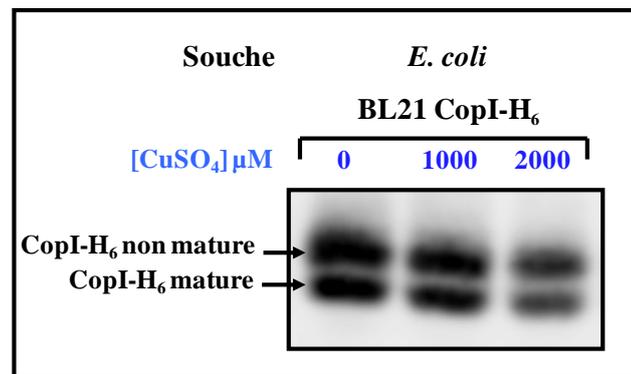


Figure 38 : L'expression de CopI-H6 chez *E. coli* en présence de cuivre.

Expression de la protéine CopI-H₆ sur des cellules totales de la souche CopI-H₆ d'*E. coli* cultivée en présence de cuivre (0 ; 1000 et 2000 μM). La même quantité de cellules (selon la DO à 600nm) est analysée par Western blot à l'aide de la sonde HRP-HisProbe (Pierce).

L'analyse par BlastP de CopI révèle une similitude de séquence (32% d'identité) avec la plastocyanine de *Synechocystis* sp. PCC6803 fixant le cuivre. La plastocyanine est impliquée dans le transport d'électrons entre le complexe *b₆f* et le photosystème I au niveau de la chaîne photosynthétique des cyanobactéries et des algues vertes (Tottey, Rich et al. 2001 ; Hill and Merchant 1995). La structure de ce transporteur soluble d'électron a été résolue chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC6803 (Romero, De la Cerda et al. 1998). Cette dernière renferme un atome de cuivre nécessaire pour le transfert d'électrons.

La modélisation de la structure de CopI (<http://swissmodel.expasy.org/>) en se basant sur la structure déterminée de la plastocyanine de *Synechocystis* donne une structure très proche de cette dernière (Figure 39). Il s'agit d'une structure en « sandwich β » composée de 8 brins β pliés en deux feuilletts β antiparallèles. Ces feuilletts sont associés à un noyau

hydrophobe, où a lieu la coordination d'un atome de cuivre, formant ainsi une architecture en tonneau.

La structure comprend également une hélice α à la suite du quatrième brin β (Romero, De la Cerda et al. 1998) (Figure 39).

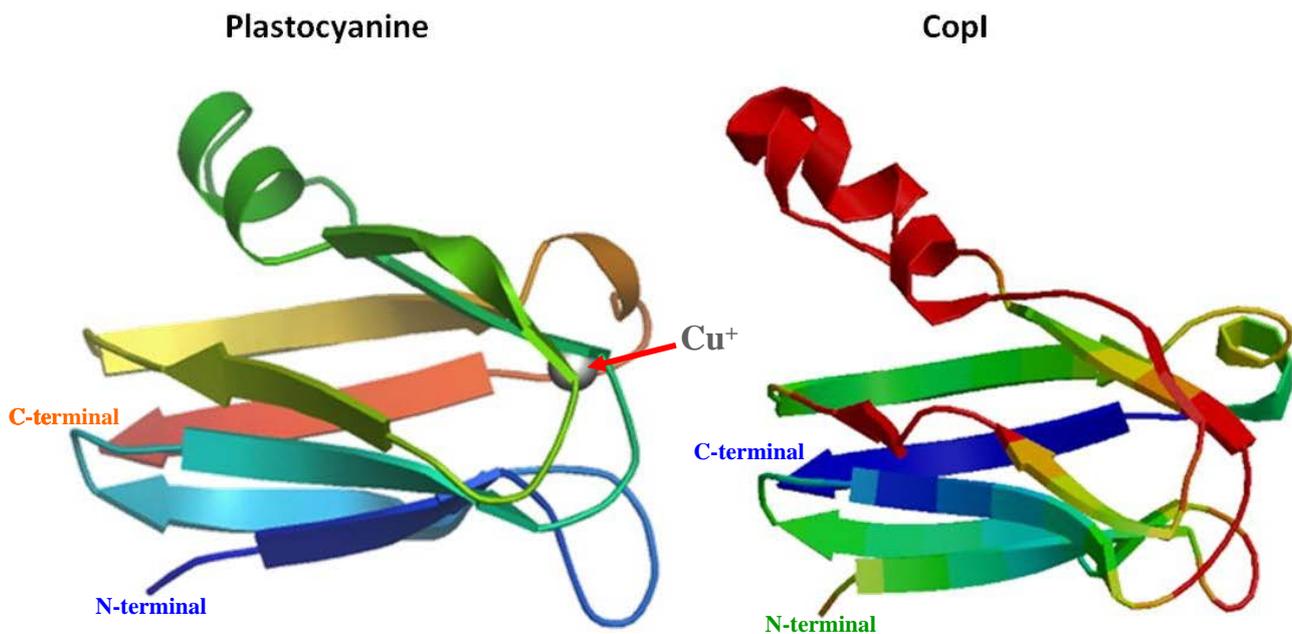


Figure 39 : Modélisation de la structure de CopI dans SWISS-MODEL.

<http://swissmodel.expasy.org/> à partir de la structure résolue de la plastocyanine de *Synechocystis* sp. PCC6803. (Romero A, De la Cerda B, *et al.*, 1998). Le cercle en gris dans la structure de la plastocyanine est l'atome de cuivre.

Par ailleurs, il est intéressant de souligner que la comparaison des séquences et des structures de ces deux protéines révèlent une conservation complète des résidus His39, Cys83, His86 et Met91 de la plastocyanine impliqués dans la coordination de l'atome de cuivre (Figure 40), suggérant que CopI pourrait fixer au moins un atome de cuivre. En revanche, une différence remarquable entre ces deux séquences est constatée dans l'extrémité N-terminal, une séquence additionnelle riche en histidine est présente dans CopI mais pas dans la plastocyanine.

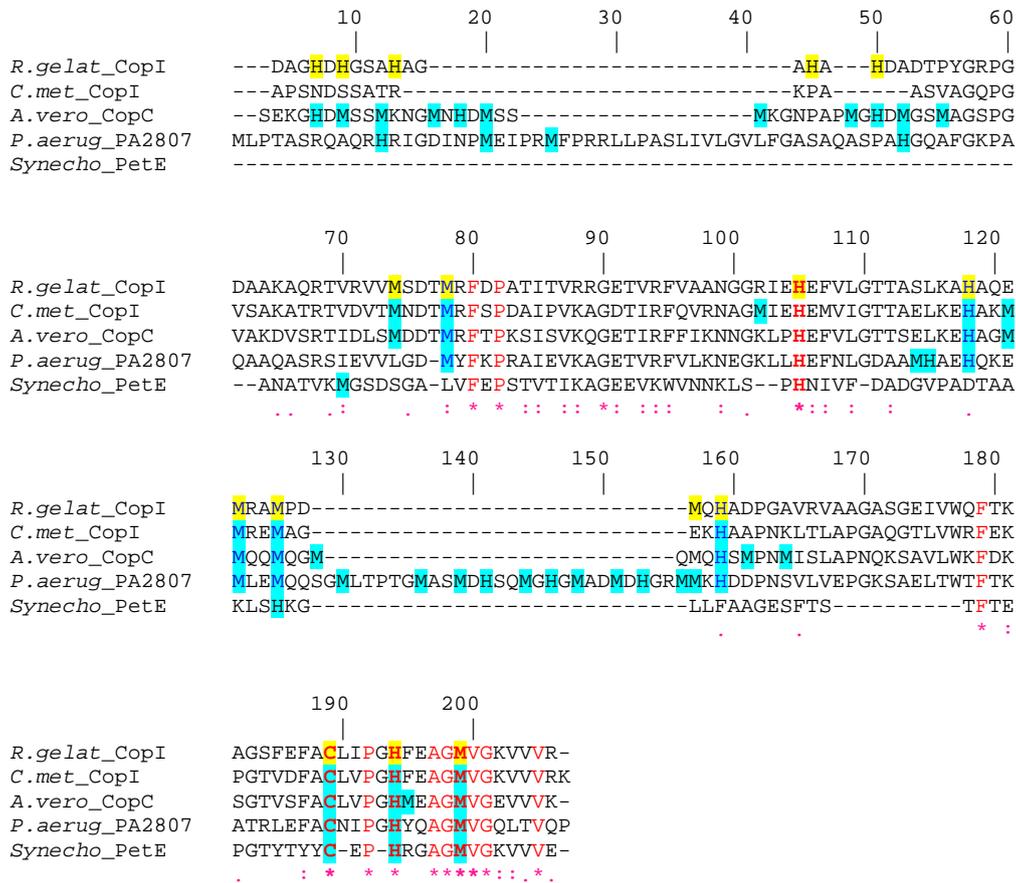


Figure 40 : Alignement de séquences de la protéine CopI de *R. gelatinosus* (R.gelat-CopI) avec ses homologues chez *C. metallidurans* CH34 (C.met-CopI), *Aeromonas* (*A. veronii*) (A.ver-CopC), *P. aeruginosa* PAO1 (PA2807) et la plastocyanine de *Synechocystis*.

L'analyse des séquences montre bien une différence entre ces protéines en N-terminal et la plastocyanine (PetE). Contrairement à la plastocyanine, le N-terminal de CopI et CopC sont riches en résidus Histidines. Légende: En jaune : les résidus (histidines, méthionines et cystéines) dans la séquence protéique de CopI, En bleu : les résidus (histidines, méthionines et cystéines) dans la séquence protéique des homologues de CopI. Les résidus en rouge et en gras (His39, Cys83, His86 et Met91 selon la séquence de la plastocyanine) sont les résidus conservés entre ces protéines. Ces résidus pourraient être impliqués dans la fixation du cuivre. Les résidus en bleu Met43, His83, Met103, Met106 et His137 sur la séquence de CopI sont des résidus assez conservés dans ces protéines et pourraient permettre la fixation du cuivre. Les résidus marqués en rouge et avec des étoiles (*) sont les résidus conservés entre les séquences. Les résidus indiqués avec (:) présentent une forte similitude et (.) une faible similitude.

Des homologues de CopI sont identifiés par BlastP chez d'autres souches de *Rubrivivax*, *R. benzoatilyticus* JA2 (RBXJA2T-18748) et *R. gelatinosus* IL144 (RGE_36230) avec 94% d'identité. Cette séquence est aussi présente dans le génome de *Leptothrix* (*L. cholodnii* SP-6 (Lcho-1267), *C. metallidurans* CH34 (annotée également CopI), *P. aeruginosa* PAO1 (protéine codée par l'ORF2807) et *Aeromonas* (*A. veronii*) (annotée CopC) avec des identités de 52%, 59%, 33% et 41% respectivement. L'alignement de séquences de ces protéines avec CopI de *R. gelatinosus* révèle, qu'en plus de la conservation

des résidus impliqués dans la coordination du cuivre dans la plastocyanine, les résidus Met66, His93, Met113, Met116 et His147 sont aussi conservés (Figure 40).

Rien n'est connu concernant la fonction de CopI chez ces bactéries. Quelques indications sont présentes chez certaines bactéries telles que l'étude transcriptomique réalisée chez *P. aeruginosa* qui révèle que la protéine PA2807 est fortement induite en présence d'excès de cuivre (Teitzel, Geddie et al. 2006). Ce résultat suggère l'importance de cette protéine dans la tolérance au cuivre.

Chez *A. veronii*, le gène codant pour CopC est également localisé dans l'opéron *cop* impliqué dans la tolérance au cuivre. Une étude réalisée chez *A. veronii* a montré que CopC joue un rôle dans la résistance au cuivre en intervenant dans les processus de détoxification du périplasme (Francki, Chang et al. 2000).

La β -protéobactérie *C. metallidurans* CH34 est connue comme une souche résistante à plusieurs métaux notamment le cuivre. La présence d'un homologue à *copI* dans l'opéron *cop* impliqué dans la résistance au cuivre et localisé dans le plasmide pMOL30 indique sa possible implication dans la tolérance au cuivre.

II-2.2- La protéine CopJ

CopJ a une masse moléculaire théorique de 15 kDa. L'analyse de sa séquence protéique révèle la présence d'un peptide signal à l'extrémité N-terminal et l'absence de fragment transmembranaire. Ces analyses montrent qu'il s'agit d'une protéine soluble probablement périplasmique. De plus, l'identification de CopJ par spectrométrie de masse sous la bande C (Figure 35) de masse moléculaire apparente de 14 kDa et l'absence de peptide tryptique identifié dans la séquence signal de CopJ soutiennent sa localisation périplasmique. La protéine périplasmique maturée aurait ainsi une masse moléculaire théorique d'environ 14 kDa (Figure 37).

Des homologues de CopJ sont également identifiés par BlastP chez d'autres souches de *Rubrivivax*, *R. benzoatilyticus* JA2 (RBXJA2T-18753) et *R. gelatinosus* IL144 (RGE_36240) avec 89% et 92% d'identité. Cette séquence est aussi présente dans le génome de *L. cholodnii* SP-6 (Lcho-1268) avec une identité de 55% (Figure 41).

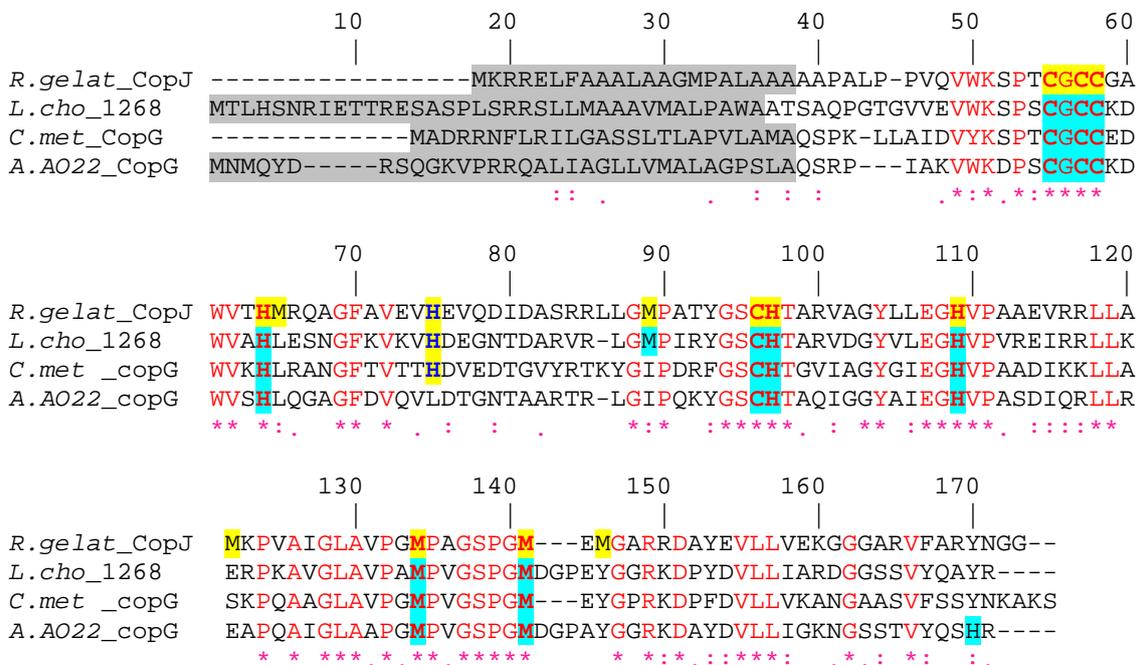


Figure 41 : Alignement de séquences de la protéine CopJ de *R. gelatinosus* (RG_CopJ) avec ses homologues chez *L. cholodnii* SP-6 (Lcho_1268), chez *Achromobacter* sp. AO22 (AO22_CopG), et *C. metallidurans* CH34 (CopG).

En gris : le Peptide signal identifié par le programme SignalP 4.1 Server ; En jaune : les résidus (histidines, méthionines et cystéines) dans la séquence protéique de CopJ, En bleu ciel : les résidus (histidines, méthionines et cystéines) dans la séquence protéique des homologues de CopJ. Les résidus en rouge et en gras sont les résidus (histidines, méthionines et cystéines) conservés entre ces protéines. Ces résidus pourraient être impliqués dans la fixation du cuivre. Le résidu histidine en bleu gras est un résidu assez conservé dans ces protéines (pourraient permettre la fixation du cuivre). Les résidus marqués en rouge et avec des étoiles (*) sont les résidus conservés entre les séquences. Les résidus indiqués avec (:) présentent une forte similitude et (.) une faible similitude.

Chez la β -protéobactérie *Achromobacter* sp. AO22, le séquençage et l'analyse des gènes de l'opéron *copSRABGOFCDK* impliqués dans la tolérance au cuivre chez cette bactérie révèle la présence de chaperones à cuivre périplasmiques "Ach-CopO", "Ach-CopK" et notamment "Ach-CopG" (Ng, Palombo et al. 2012). La protéine "Ach-CopG" présente une homologie de 52% avec la protéine CopJ de *R. gelatinosus* (Ng, Palombo et al. 2012). Cette dernière est prédite également comme étant localisée dans le périplasma et possède également des sites potentiels de fixation du cuivre (4 Cys, 4 His et 2 Met) avec la conservation parfaite du motif CxxC (Multhaup, Strausak et al. 2001) (Figure 41).

La protéine CopJ de *R. gelatinosus* présente également une identité de 57% avec la protéine CopG de *C. metallidurans* CH34 qui pourrait fixer le cuivre, la protéine MCH34-CopG montre également une conservation des résidus de fixation du métal comme CopJ et "Ach-CopG" d'*Achromobacter* sp. AO22 (Monchy, Benotmane et al. 2006). Le rôle de la protéine CopG reste à déterminer chez *C. metallidurans* CH34.

II-2.3- La protéine CopH

Une troisième ORF dans l'opéron *cop* annotée *copH* coderait également pour une protéine soluble périplasmique. Elle aurait une masse moléculaire théorique de 11,78 kDa et présente en extrémité N-terminal un peptide signal d'adressage dans le périplasma (Figure 42). La forme maturée de CopH présente une masse moléculaire théorique de 9,28 kDa. Cependant, contrairement à CopI et CopJ, CopH n'a pas été identifié par spectrométrie de masse comme protéine soluble induite en présence d'excès de cuivre dans les bandes A, B et C. Ceci peut être expliqué par la difficulté d'identifier des protéines de faible poids moléculaire dû au nombre insuffisant de peptides tryptiques générés pouvant être identifiés. Il est également possible que CopH n'intervienne pas dans la tolérance au cuivre et qu'elle ne soit donc pas induite ; comme il est possible qu'elle se dégrade rapidement.

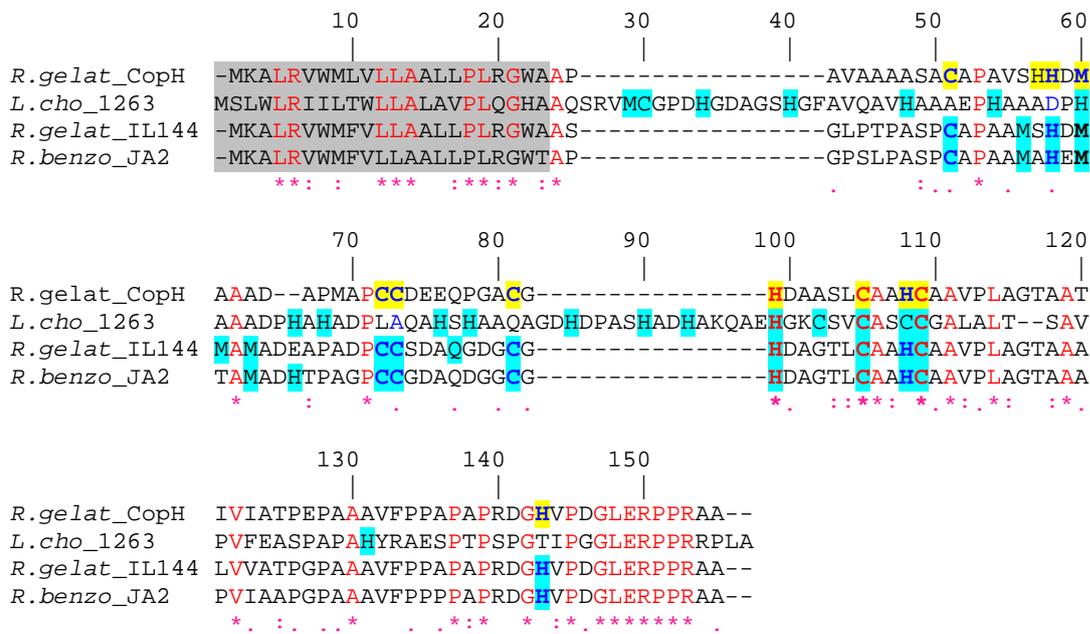


Figure 42 : Aligement de séquences de la protéine CopH de *R. gelatinosus* (RG_CopH) avec ses homologues chez *L. cholodnii* SP-6 (Lcho_1263), chez *R. gelatinosus* IL144 (RG_IL144), et *R. benzoatilyticus* JA2 (RB_JA2).

En gris : le Peptide signal identifié par le programme SignalP 4.1 Server ; En jaune : les résidus (histidines, méthionines et cystéines) dans la séquence protéique de CopH, En bleu: les résidus (histidines, méthionines et cystéines) dans la séquence protéique des homologues de CopH. Les résidus en rouge et en gras sont les résidus (histidines, méthionines et cystéines) conservés entre ces protéines. Ces résidus pourraient être impliqués dans la fixation du cuivre. Les résidus en bleu et en gras sont des résidus assez conservés dans ces protéines et pourraient permettre la fixation du cuivre). Les résidus marqués en rouge et avec des étoiles (*) sont les résidus conservés entre les séquences. Les résidus indiqués avec (:) présentent une forte similitude et (.) une faible similitude.

Le gène *copH* n'est pas très répandu chez les microorganismes. *copH* est présent chez *R. gelatinosus* IL144 (RGE_36220), *R. benzoatilyticus* JA2 (RBXJA2T_18743) et *L. cholodnii* SP-6 (Lcho-1263) avec des identités respectives de 75%, 74% et 42%. L'analyse de l'alignement de séquences de ces protéines montre une histidine conservée en position 63 et un motif CxxHC conservé qui pourrait aussi servir pour la fixation d'un métal. D'autres résidus sont aussi assez conservés comme les Cys33, 52, 53, 61, Met42 et les His63,72,95 (Figure 42). Le fait que la protéine CopH soit également riche en résidus d'histidines et de cystéines pourrait suggérer une implication dans le métabolisme du cuivre.

L'ensemble des données génomiques et des analyses d'expression en réponse au cuivre laisse penser que ces trois protéines CopI/H/J pourraient intervenir dans la tolérance au cuivre. Ces protéines pourraient jouer un rôle soit dans la séquestration du cuivre au niveau du périplasme soit en le transportant vers un système d'efflux de la membrane externe afin de l'excréter dans le milieu extracellulaire.

II-3- Etude du rôle de CopI dans la tolérance au cuivre

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, l'excès de cuivre résulte en une forte induction de l'expression de la protéine CopI. D'une part, nous avons cherché à savoir s'il s'agit d'une induction transcriptionnelle ou traductionnelle et quels sont les facteurs impliqués dans cette régulation ; d'autre part, nous avons analysé le phénotype du mutant *copI* en présence de cuivre.

II-3.1- Induction de l'expression de *copI*/CopI en réponse au cuivre

Nous avons analysé le profil d'expression du gène *copI* et de la protéine CopI en réponse au cuivre. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de *copI* par RT-PCR dans les cellules de la souche sauvage cultivée en photosynthèse en présence de concentrations croissantes de cuivre (0 ; 1,6 ; et 20 μ M de CuSO_4) dans le milieu (Figure 43). Cette expérience a montré qu'en absence de cuivre dans le milieu, aucune expression de *copI* n'est détectée. En présence de 1,6 μ M de cuivre (concentration de cuivre présente dans le milieu malate), nous observons une expression basale du gène *copI*. L'addition de 20 μ M de

cuivre entraîne une augmentation de l'expression de *copI*. Ce résultat démontre que comme *copA*, l'expression du gène *copI* est induite par le cuivre.

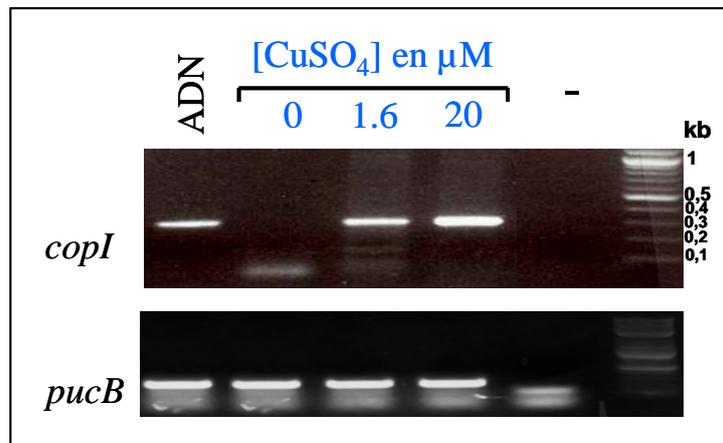


Figure 43 : Effet du cuivre sur l'expression de *copI* par RT-PCR

Suivi de l'expression de *copI* par RT-PCR réalisée sur des ARN extraits à partir des cellules de la souche sauvage cultivées en photosynthèse anaérobie en présence de cuivre. Le gène *pucB* est utilisé comme gène de référence dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions étudiées. ADN : contrôle positif où la taille d'amplification obtenue pour *copI* est de 0,3 kb similaire à celle observée par la RT-PCR. L'eau (-) est le contrôle négatif où aucun acide nucléique (ARN/ADN) n'a été ajouté dans le tampon de la réaction.

Dans un deuxième temps, afin de confirmer l'induction de l'expression de *copI* en présence d'excès de cuivre, nous avons regardé l'évolution de la production de la protéine CopI dans la fraction soluble de protéines en réponse à des concentrations croissantes en cuivre. Pour cela, ne disposant pas d'anticorps anti-CopI, nous avons construit une souche (CopI-H₆) pour suivre l'expression de la protéine grâce à l'étiquette 6 histines. Cette souche contient l'extrémité C-terminale de CopI fusionnée avec cette étiquette. Cette construction a été intégrée dans le chromosome, la transcription de *copI-H₆* étant sous le contrôle de son propre promoteur. Dans des conditions photosynthétiques anaérobies, la souche CopI-H₆ a été cultivée en présence de concentrations croissantes de cuivre (0 ; 1,6 ; 20 ; 200 ; 1000 μ M).

Comme chez la souche wt, aucune protéine CopI-H₆ n'est détectée dans la fraction soluble des cellules cultivées dans un milieu déplété en cuivre (Figure 44). Dans du milieu malate contenant 1,6 μ M de CuSO₄, une faible expression de CopI-H₆ est observée. L'analyse des fractions solubles isolées à partir de la souche CopI-H₆ cultivées en présence de concentrations croissantes de cuivre (20 μ M, 200 μ M et 1 mM) montre une augmentation

significative de la quantité de CopI. Ces résultats démontrent que l'induction de l'expression de CopI est en corrélation avec l'augmentation du cuivre dans le milieu.

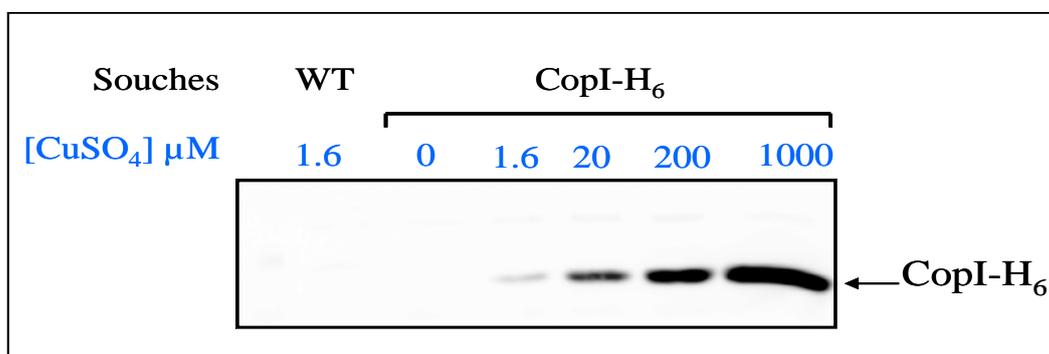


Figure 44 : Effet du cuivre sur l'expression de la protéine CopI par Western blot

Expression de la protéine CopI-H₆ dans les fractions solubles isolées à partir de la souche CopI-H₆ cultivée en présence de cuivre (0 ; 1,6 ; 20 ; 200 et 1000 μM) en micro-aérobie. Les mêmes quantités de protéines solubles (40 μg) sont analysées par Western blot à l'aide de la sonde HRP-HisProbe (Pierce). La fraction soluble du wt à 1,6 μM de CuSO₄ est utilisée comme témoin négatif.

II-3.2- Régulation de l'expression de *copI*

Au cours des expériences de purification de CopI (voir partie purification paragraphe II-3.5), nous avons constaté que CopI peut s'accrocher sur une colonne de nickel et qu'elle est détectable par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce). En effet, la présence dans la structure primaire de CopI dans l'extrémité N-terminal de résidus histidines proches a permis la détection de CopI par western blot grâce à la sonde HisProbe-HRP (Pierce). Suite à cette découverte, nous avons poursuivi le reste du travail en utilisant la copie sauvage de CopI à la place de la construction CopI-H6 utilisée auparavant.

Comme démontré dans la partie I, le régulateur transcriptionnel CopR est impliqué dans la régulation de l'expression de l'ATPase CopA en réponse au cuivre. CopR est donc un candidat potentiel qui pourrait intervenir dans l'induction de la protéine CopI. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'expression de la protéine CopI dans une souche *copR*⁻ cultivée en absence et en présence de cuivre (1,6 μM et 200 μM) dans des conditions photosynthétiques (Figure 45).

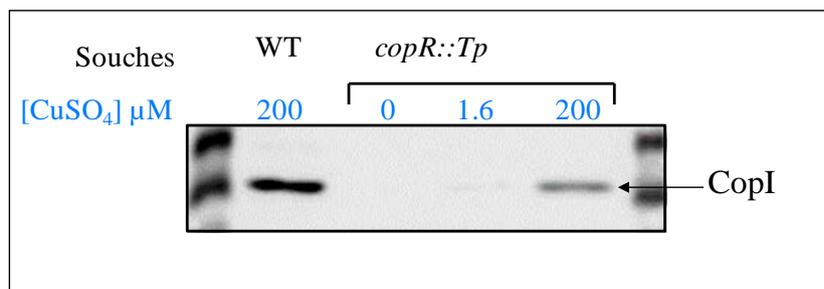


Figure 45 : Effet du cuivre sur l'expression de CopI dans la souche *copR::Tp*

Expression de la protéine CopI dans les fractions solubles isolées à partir de la souche wt et du mutant *copR::Tp* cultivées en présence de cuivre (0 ; 1,6 et 200 μM) en micro-aérobie. Les mêmes quantités de protéines solubles (20 μg) sont analysées par Western blot à l'aide de la sonde HRP-HisProbe (Pierce). La fraction soluble du wt à 200 μM de CuSO₄ est utilisée comme témoin positif.

Les résultats obtenus montrent que CopI est exprimée même en absence de CopR. Une très faible expression est observée à 1,6 μM ; cette expression est induite en présence d'excès de cuivre (200 μM), mais n'atteint pas le niveau observé dans la souche sauvage. En présence de faible concentration de cuivre et en absence de CopR, l'expression observée de CopI serait peut être une expression constitutive. En revanche, à forte concentration de cuivre l'induction de CopI suggère tout comme pour *copA*, que le régulateur CopR est impliqué dans l'induction de l'expression de CopI mais ne serait pas le seul régulateur de cette dernière. Aussi bien les analyses d'expression de CopA et CopI sont en faveur de la présence d'un second régulateur transcriptionnel permettant l'induction de ces protéines en excès de cuivre. CadR nous semble un bon candidat à examiner.

II-3.3- Rôle de CopI dans la tolérance au cuivre

Comme la protéine CopI est très abondante dans la fraction soluble préparée à partir des cellules de la souche sauvage poussée en présence d'excès de cuivre, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'implication du gène *copI* dans la tolérance au cuivre. Pour vérifier si *copI* joue un rôle dans la résistance au cuivre, nous avons généré un mutant *copI*.

Pour tester l'effet de l'excès cuivre sur la croissance du mutant *copI* comparée aux souches sauvage wt et *copA*⁻ en photosynthèse et en respiration, les cellules ont été cultivées dans du milieu malate liquide ou solide additionné de concentrations croissantes en CuSO₄. En milieu solide (Figure 46), l'analyse montre qu'en photosynthèse le mutant *copI* présente une sensibilité plus importante au cuivre comparé au mutant *copA*⁻ et à la souche wt. En effet

en photosynthèse, il ne pousse pas au-delà de 50 μM de CuSO_4 comparé au mutant copA^- qui pousse jusqu'à 120 μM . En aérobie, le mutant copI pousse jusqu'à 300 μM contrairement au mutant copA^- qui ne pousse pas à 200 μM de cuivre. Ces résultats montrent clairement l'implication et l'importance de CopI dans la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus*.

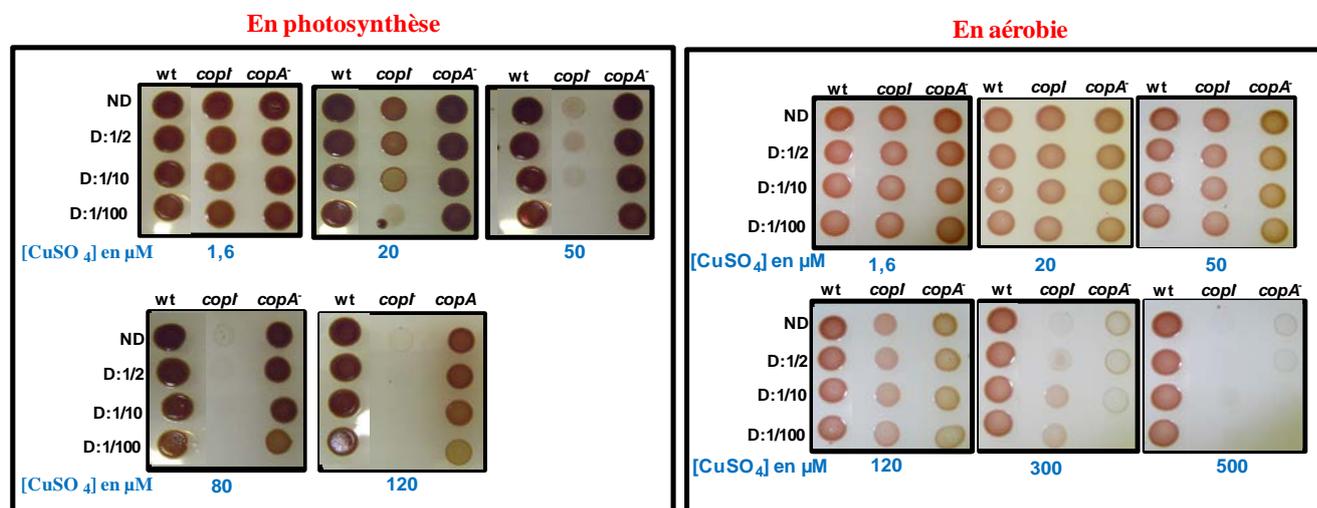


Figure 46 : Effet du cuivre sur la croissance du mutant copI

Phénotype de croissance et de viabilité des cellules de la souche sauvage wt et des mutants copA^- et copI sur des boîtes de milieu malate additionnées de concentrations croissantes en cuivre (de 1,6 μM à 500 μM). 8 μL de pré-cultures de ces souches non diluée et diluée au $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{10}$ et au $\frac{1}{100}$ sont déposés sur boîtes. Après incubation de 48h des boîtes en respiration aérobie à l'obscurité ou en photosynthèse anaérobie, les boîtes sont prises en photos.

Nous avons aussi étudié l'effet de concentrations croissantes en cuivre (de 1,6 à 1200 μM de CuSO_4) sur la croissance du mutant copI en milieu liquide en photosynthèse et en respiration (Figure 47). En photosynthèse, les souches copI et copA^- présentent une sensibilité importante au cuivre comparé au sauvage wt. L'inhibition de la croissance par le cuivre observée dans le mutant copI est relativement plus prononcée à celle du mutant copA^- (Figure 47A). En effet, nous observons un arrêt de la croissance du mutant copI au delà de 300 μM de cuivre en photosynthèse alors que le mutant copA^- présente un ralentissement de la croissance à partir de 300 μM de CuSO_4 et ne cesse de pousser qu'au-delà de 900 μM . En revanche en respiration, il y a une sensibilité au cuivre significativement différente entre les deux mutants. L'inhibition de la croissance du mutant copA^- par le cuivre est plus sévère comparée au mutant copI (Figure 47B). D'ailleurs dans cette condition, la croissance du mutant copI est ralentie mais continue lentement au-delà de 1200 μM contrairement au mutant copA^- qui s'arrête de pousser au-delà de 600 μM de cuivre. Dans l'expérience

contrôle, la souche sauvage pousse en présence de cuivre jusqu'à une concentration de 1200 μM aussi bien en photosynthèse qu'en respiration.

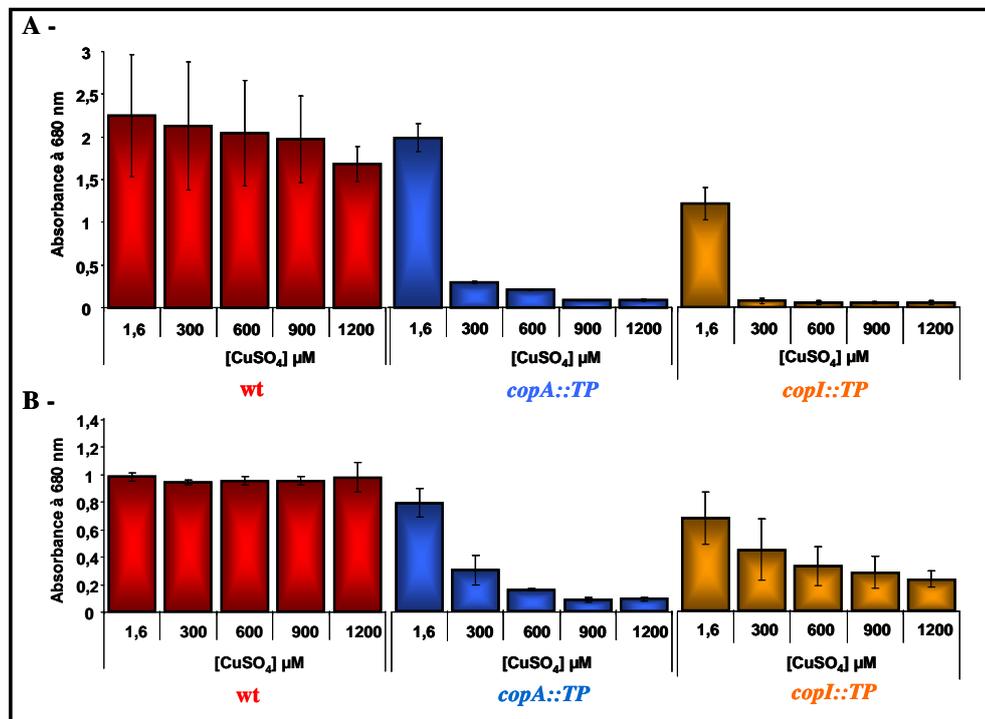


Figure 47 : L'effet du cuivre sur la croissance mutant *copI* en milieu liquide dans des conditions photosynthétiques anérobies (A) et respiratoires aérobies (B)

Pour analyser l'inhibition de la croissance de la souche wt, *copA::Tp*, *copI::Tp* par le cuivre, des pré-cultures cultivées sur la nuit ont été diluées au 1:100 le lendemain dans du milieu malate liquide avec des concentrations croissantes en cuivre (1,6 ; 300 ; 600 ; 900 et 1200 μM). Après 48h d'incubation en présence de cuivre aussi bien en photosynthèse qu'en respiration à 30°C, la croissance a été suivie par la lecture de l'absorbance à 680 nm. Les barres d'erreur sont calculées à partir de trois expériences distinctes.

La différence des concentrations en cuivre supportées par les souches entre milieu solide et milieu liquide a été également constatée chez un mutant d'une protéine périplasmique (ORF PA2807) impliquée dans la tolérance au cuivre chez *P. aeruginosa* PAO1 (Teitzel, Geddie et al. 2006). Malgré ces différences, les résultats en milieu liquide confirment ceux observés précédemment sur milieu solide montrant que CopI est importante pour la tolérance au cuivre. La fonction de CopI serait que le cuivre transporté du cytoplasme vers le périplasme par CopA serait pris en charge par CopI. En effet, si le cuivre ne passe pas par le cytoplasme, et que le cuivre qui rentre dans la cellule est complexé par CopI dans ce cas le mutant *copA*⁻ n'aurait pas de phénotype. Cette hypothèse est à écarter puisque le mutant *copA*⁻ est sensible au cuivre et présente des signes d'altération de la voie de biosynthèse des

porphyrines reflétant ainsi une intoxication des cellules à cause de l'accumulation du cuivre cytoplasmique. En absence de CopI l'accumulation du cuivre au niveau du périplasma aboutit à l'effet toxique observé. Dans ce cas de figure, le rôle de CopI dans la tolérance au cuivre serait de complexer le cuivre au niveau de ce compartiment périplasmique ou alors de le transférer à un système d'efflux de la membrane externe. Par ailleurs, la forte toxicité du cuivre observée en anaérobie dans un mutant *copI* pourrait être liée au fait que le cuivre réduit Cu(I) est plus réactif et donc toxique alors que le cuivre oxydé l'est moins. Une deuxième hypothèse serait qu'en conditions de respiration, d'autres protéines (non identifiées) pourraient remplacer et remplir le rôle de CopI.

Nous avons également construit le double mutant *copA⁻ copI⁻* pour confirmer l'importance des deux protéines dans la tolérance au cuivre. En respiration, en milieu solide, nous avons observé que le double mutant ne pousse pas à une concentration supérieure à 120 μM de CuSO_4 contrairement aux mutants *copA⁻* et *copI⁻* dont la croissance est inhibée au-delà de 200 μM et 300 μM de CuSO_4 respectivement (Figure 48). En photosynthèse anaérobie, la croissance du mutant *copA⁻ copI⁻* s'arrête au-delà de 20 μM comparé aux mutant *copA⁻* et *copI⁻* dont la croissance est inhibée à 120 μM et de 80 μM CuSO_4 respectivement.

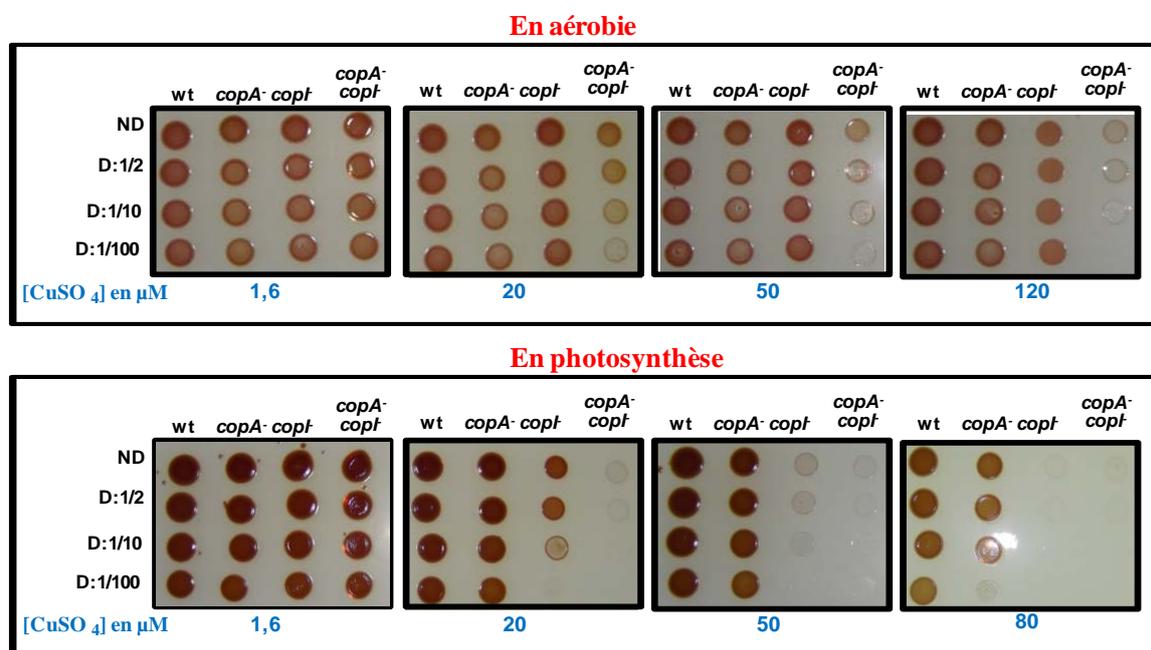


Figure 48 : Effet du cuivre sur la croissance du mutant *copA⁻copI⁻*

Phénotype de croissance et de viabilité des cellules de la souche sauvage wt et des mutants *copA⁻* et *copI⁻* sur des boîtes de milieu malate additionnées de concentrations croissantes en cuivre (de 1,6 μM à 120 μM). 8 μL de pré-cultures de ces souches non diluées et diluées au $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{10}$ et au $\frac{1}{100}$ sont déposés sur boîtes. Après incubation de 48h des boîtes en respiration aérobie à l'obscurité ou en photosynthèse anaérobie, les boîtes sont prises en photos.

L'ensemble des résultats obtenus montrent bien que CopI joue un rôle capital dans le système d'homéostasie du cuivre chez *R. gelatinosus* surtout en condition d'anaérobie. En effet, le phénotype observé dans le mutant *copI* ainsi que la forte induction de l'expression de cette protéine en réponse au cuivre sont des arguments forts confirmant l'implication de cette protéine dans la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus*. Il reste à déterminer la fonction exacte de CopI dans ce système : aurait-elle un rôle dans le stockage du cuivre afin de diminuer sa toxicité? Ou jouerait-elle un rôle comme chaperonne à cuivre pour transporter ce métal vers un système d'efflux ou vers des cuproprotéines? Sur la base de l'analyse de la séquence protéique de CopI comparée à la plastocyanine nous pouvons penser que CopI fixerait au moins un atome de cuivre. La présence d'autres résidus (méthionines et histidines) conservés dans la séquence de CopI, ligands potentiels du cuivre laisse penser que CopI pourrait fixer plusieurs atomes de cuivre. Les questions auxquelles il faut répondre sont alors :

- 1- Est-ce que CopI fixe le cuivre ?
- 2- Combien d'atome de cuivre sont fixés par la protéine CopI ?

Dans le but d'élucider la fonction de cette protéine dans la tolérance au cuivre, nous avons entrepris une approche pour purifier CopI et voir si le cuivre est associé à la protéine purifiée par des expériences de RPE/ICP-MS.

II-3.4- Détection et localisation de CopI

Pour suivre l'expression de CopI dans la souche sauvage, nous avons construit une souche exprimant la forme étiquetée His6 de CopI. Cette construction n'est pas adaptée cependant à l'étude de la fixation du cuivre sur CopI, nous avons donc cherché un autre moyen pour détecter CopI et de le suivre au cours de la purification.

Comme mentionné précédemment, la présence dans l'extrémité N-terminal de la séquence de CopI de cinq résidus histidines (à la position 26, 28, 32, 36 et 38) assez proches, ainsi que la forte induction de l'expression de CopI en réponse au cuivre pourraient permettre la détection de CopI par western blot grâce à la sonde HisProbe-HRP (Pierce). Ce moyen de détection permettrait de suivre l'expression et la localisation subcellulaire de CopI dans les différentes conditions de cultures en présence de cuivre. Pour vérifier cette possibilité, nous

avons réalisé un western blot sur la fraction soluble isolée à partir de la souche sauvage cultivée en micro-aérobie en présence de 1,6 μM et 1000 μM de cuivre. Les résultats du western blot montrent que la protéine CopI peut être effectivement détectée avec la sonde HisProbe-HRP (Pierce) (figure 49).

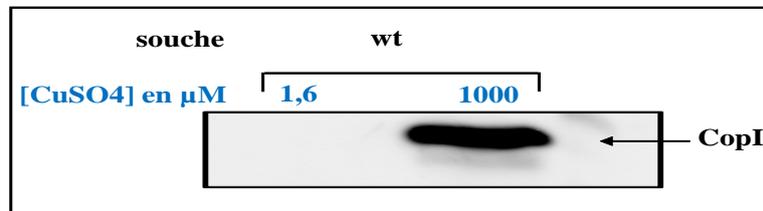


Figure 49 : Détection de l'expression de la protéine CopI dans la fraction soluble isolée à partir de la souche sauvage de *R. gelatinosus* cultivée en micro-aérobie en présence de 1,6 et 1000 μM CuSO_4 .

La même quantité de protéines solubles (20 μg) sont séparées sur un gel dénaturant SDS-PAGE de 14% d'acrylamide et la protéine CopI est révélée par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce).

Ce blot confirme les résultats déjà obtenus montrant que CopI se trouve dans la fraction soluble. La localisation prédite de CopI dans le périplasme laisse penser qu'une fraction de CopI pourrait être présente aussi dans la fraction membranaire. Nous avons alors analysé la fraction membranaire de la souche sauvage et trouvé que CopI est également associée à la membrane. Pour voir la nature de cette association, les membranes ont été traitées avec du tampon Tris/HCL 0,1 M pH 8 à 1 M NaCl dans un bain froid avec sonication pour rompre les éventuelles interactions entre CopI et les membranes. Nous avons utilisé comme témoin les mêmes membranes traitées avec tampon du Tris/HCL 0,1 M pH 8. Après une ultracentrifugation (UCG), les fractions solubles et membranaires ont été analysées par western blot afin de détecter et localiser CopI (Figure 50). Les résultats du western blot montrent la présence de CopI associée à la membrane (pistes 1 et 5). Quelque soit le traitement utilisé (Tris ou Tris/NaCl), une majorité de cette fraction de CopI peut être décrochée de la membrane (pistes 3 et 7) montrant que cette interaction peut être rompue même en absence de traitement salin et suggérant que c'est une interaction faible.

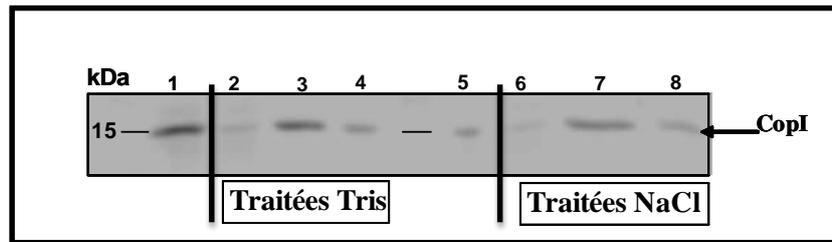


Figure 50 : Western blot des différentes fractions obtenues après traitement au Tris/HCL et du Tris/HCL avec du NaCl des membranes du wt cultivé en présence de 1,2 mM Cu en micro-aérobie en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce).

Légende : pistes 1 et 5 (membranes non traitées), pistes 2 et 6 (membranes traitées Tris ou Tris 1 M NaCl), pistes 3 et 7 (Fraction soluble de l'ultracentrifugation (UCG)), pistes 4 et 8 (Fraction membranaire non culotée après UCG).

En revanche, une partie de CopI reste toujours associée aux membranes comme l'indique la présence de CopI dans la fraction membranaire et dans la fraction membranaire non culotée (piste 4 et 8) (composée également des membranes). Nous pouvons conclure d'après ces résultats que CopI est localisée majoritairement dans la fraction soluble et qu'il y a une fraction de CopI associée à la membrane.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la localisation exacte de CopI dans le périplasm. Quant à l'association probable de CopI avec la membrane, nous pouvons penser que cette association est possible et nécessaire. En effet, étant donné que le cuivre ne doit jamais être libre dans la cellule, on peut comprendre la nécessité d'une interaction transitoire entre CopA et CopI afin que cette dernière prenne en charge le cuivre transporté par l'ATPase.

II-3.5- Purification de CopI

Afin de caractériser CopI et d'éventuelles interactions avec le cuivre, j'ai entrepris la purification de la protéine CopI à partir de la fraction soluble totale isolée de cellules du wt cultivées en micro-aérobie et en présence d'un excès de cuivre (1,2 mM). Les cellules sont lysées par des passages à la presse de French. Une ultracentrifugation est réalisée sur le lysat obtenu afin de séparer les fractions soluble et membranaire. La fraction soluble ainsi isolée subit une phase d'enrichissement en protéine CopI par des précipitations au sulfate

d'ammonium. La fraction enrichie en CopI est ainsi dialysée puis purifiée sur différentes colonnes de chromatographie (DEAE, CM et GF) (Figure 51).

Une première population de CopI se fixant sur une colonne échangeuse de cation DEAE a été identifiée. L'analyse des fractions d'éluion de la DEAE sur un gel dénaturant montre que les fractions contenant CopI sont très contaminées par d'autres protéines de haut poids moléculaire. L'identification de CopI (15 kDa) dans cette fraction a été réalisée par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce) et par analyse de la bande par spectrométrie de masse (Figure 51).

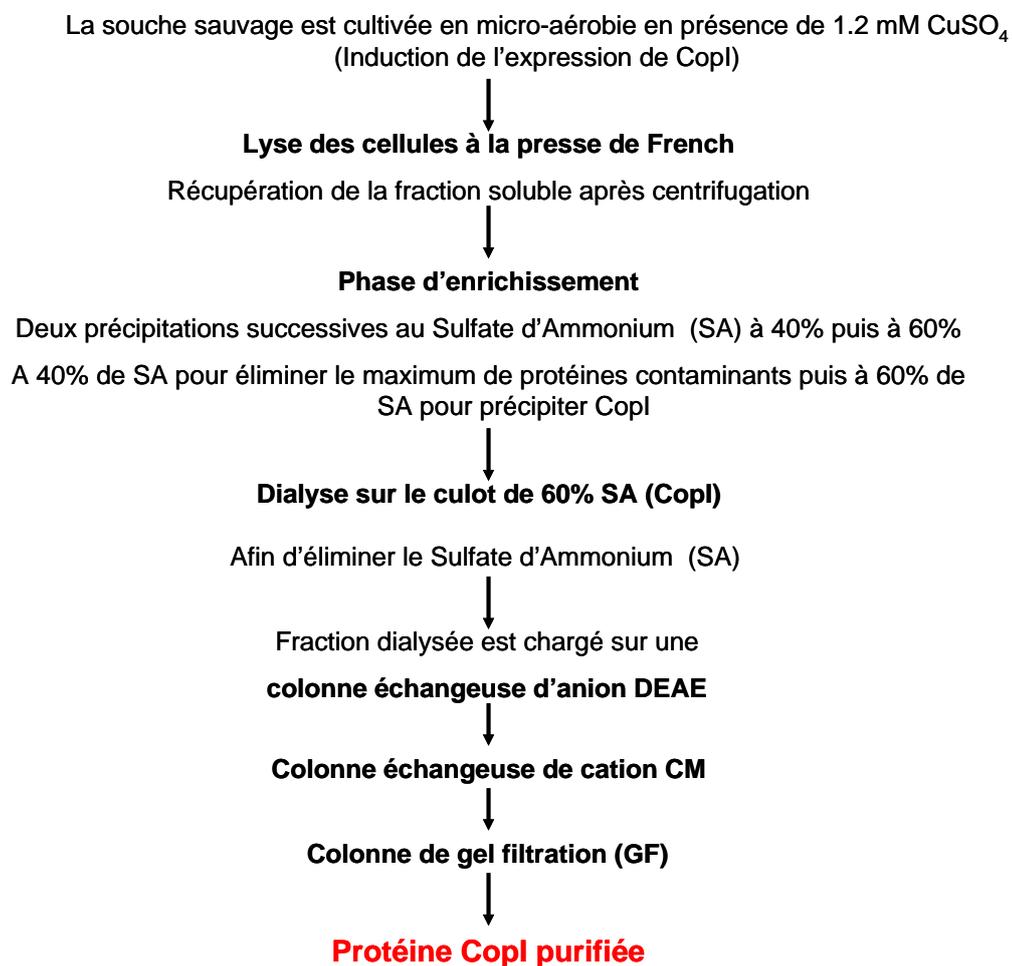


Figure 51 : Protocole de purification de CopI en utilisant différentes colonnes de chromatographie (DEAE, CM et GF).

Une majeure partie de CopI se trouve cependant dans la fraction non retenue de la DEAE. De la même manière, l'analyse de ces fractions sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie et par western blot confirme la présence de CopI dans la fraction non retenue (Figure 52). Les

premières fractions non retenue de la DEAE contiennent CopI avec plusieurs autres protéines contaminantes alors que le reste des fractions est enrichi en CopI relativement pure.

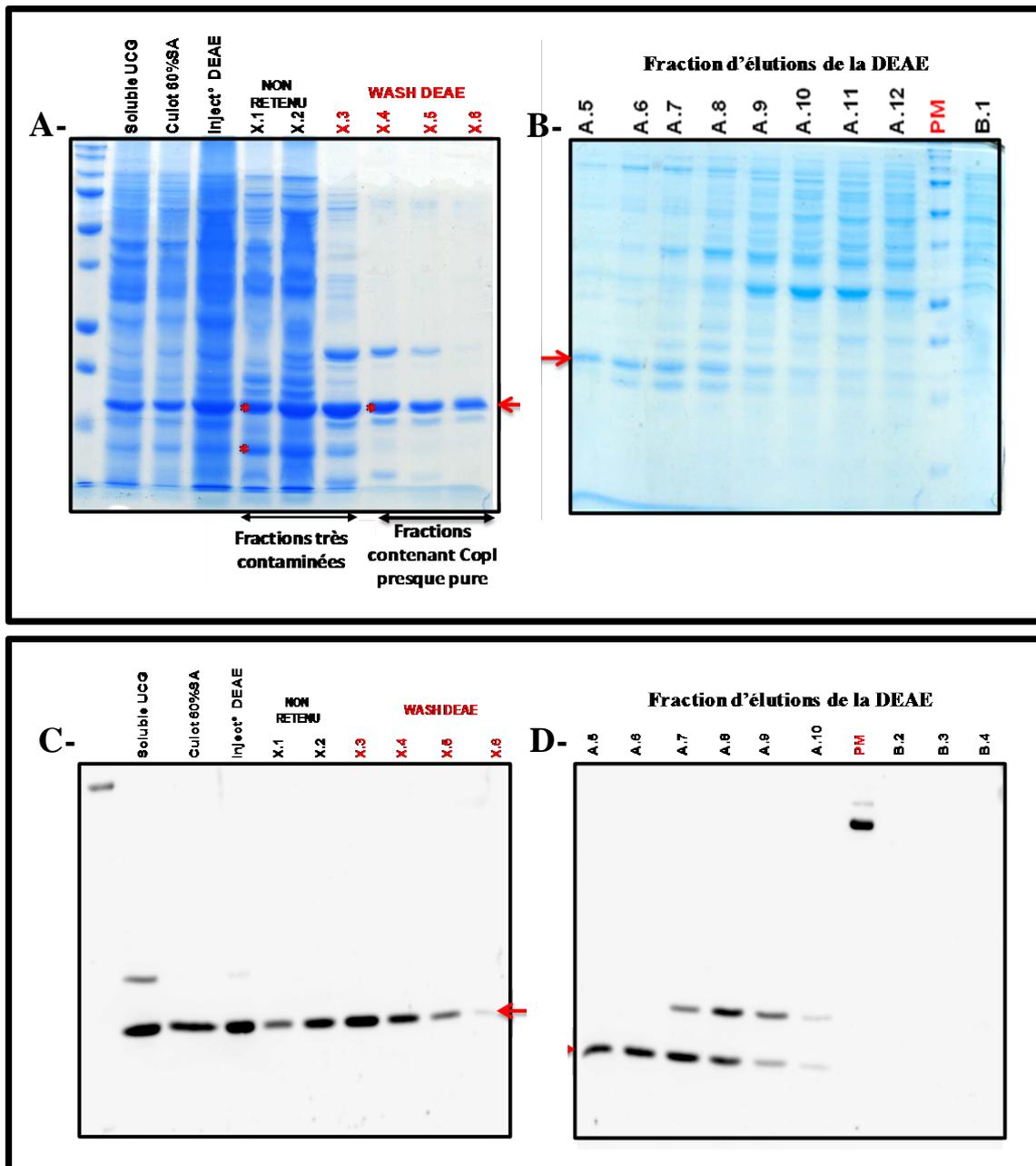


Figure 52 : Analyse des fractions non retenues et des fractions éluées de la DEAE sur un gel dénaturant SDS-PAGE et par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce).

- A – Analyse sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie des fractions non retenues de la DEAE (pistes X.1 et X.2) et des lavages de la DEAE (pistes WASH X.3 à X.6); la piste **soluble UCG** correspond à la fraction protéique soluble obtenu après la lyse des cellules à la presse de French ; la piste **Culot 60% SA** est la fraction contenant CopI après la phase d'enrichissement au sulfate d'ammonium (SA) ; la piste **Inject° DEAE** correspond au culot 60% SA après l'étape de dialyse. – B - Analyse sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie des fractions d'éluions de la DEAE (pistes A.5 à B.1). – C- Western blot réalisé à partir du gel (A) en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce) – D- Western blot réalisé à partir du gel (B) en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce). Les flechettes rouges correspondent à la protéine CopI.

Nous avons donc à la suite travailler avec les fractions non retenues de la DEAE (riche en CopI) et laisser de côté les fractions d'élutions de DEAE. Après dialyse, ces fractions ont été chargées séparément sur une colonne échangeuse d'anions CM (Figure 52) puis sur un gel filtration (Figure 53).

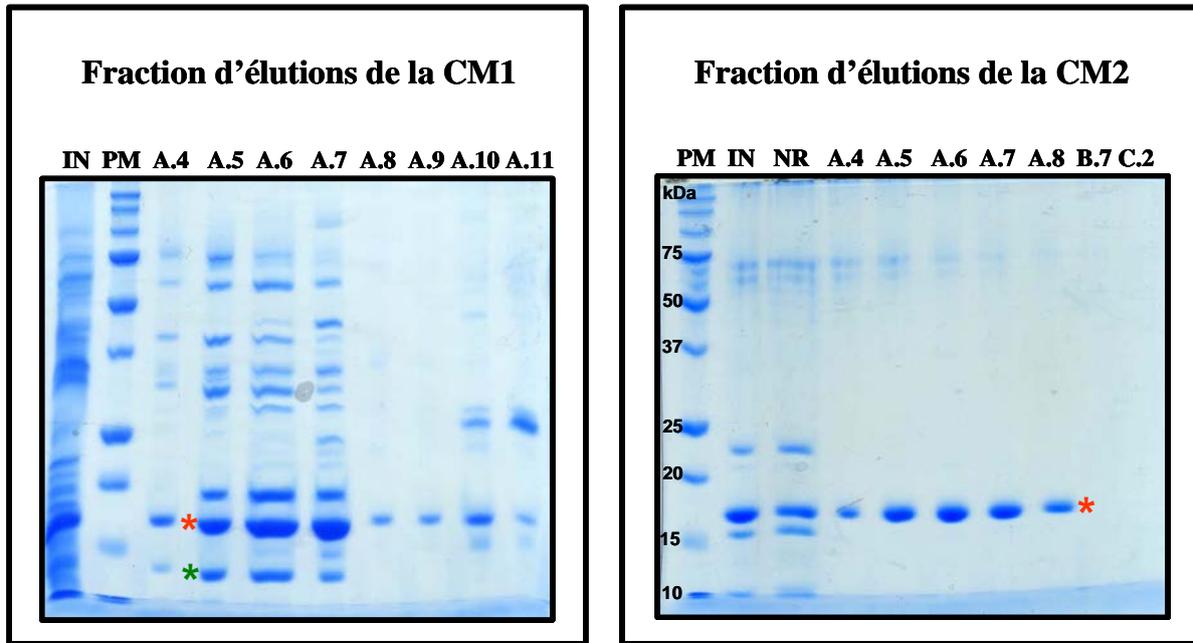


Figure 53 : Fractions d'élutions de la CM obtenues à partir de la fraction non retenue de la DEAE analysées sur un gel dénaturant SDS.

A- Fractions d'élutions de la CM1 (A.4 à A.11) réalisée à partir des fractions non retenues de la DEAE très contaminées contenant CopI ; **IN** correspond à l'échantillon chargé sur la colonne CM1 – **B** - Les élutions de la CM2 (A.4 à C.2) sont obtenues à partir des fractions non retenues de la DEAE contenant CopI presque pure (Figure 52) ; **IN** correspond à l'échantillon chargé sur la colonne CM2. L'analyse par spectrométrie de masse a révélée la présence de CopI (*) et de CopJ (*).

Les protéines fixant le cuivre comme la famille des plastocyanines sont caractérisées par des pics d'absorbance à 439 nm et à 581 nm (Quaranta, McCarty et al. 2007).

Le suivie de l'absorbance sur les fractions contenant CopI de la CM et de la GF montre un pic d'absorbance à ces deux longueurs d'ondes (Figure 54). Ceci indique qu'une ou plusieurs protéines de ces fractions interagissent avec le cuivre.

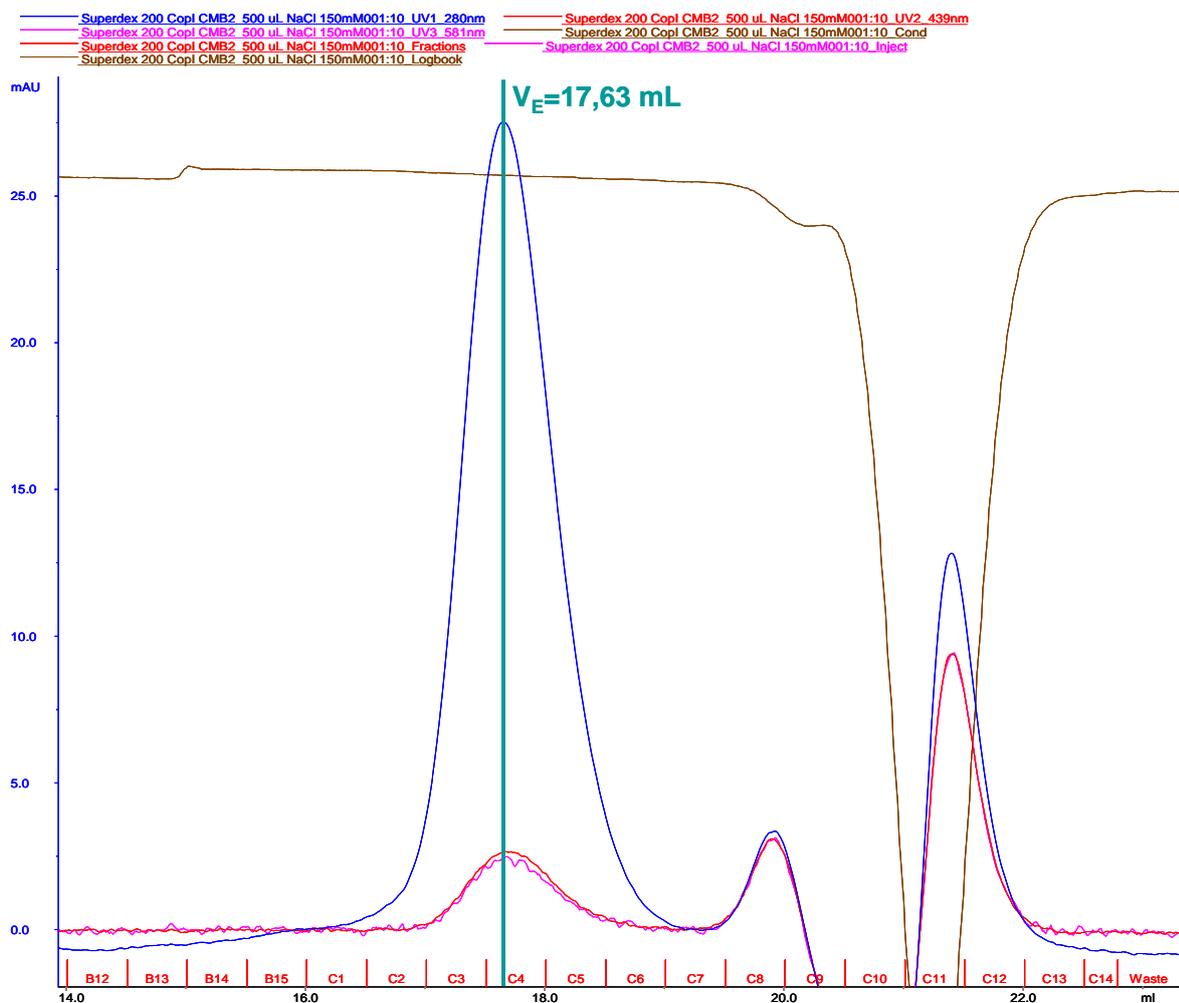


Figure 54 : Densité optique à 280, 439 et 581 nm enregistrée au cours de la filtration sur gel (GF) en fonction du volume « d'éluion ».

En bleu DO à 280 nm ; en rouge DO à 439 nm ; en rose DO à 581 nm. Le trait en vert représente le volume d'éluion de CopI (17,63 mL). Les fractions C3 à C8 ont été analysées sur gel SDS-Page coloré au bleu de coomassie et par western blot.

Les fractions de la GF réalisées à partir du produit d'éluion de la CM2 ont été analysées sur gel SDS et par western blot pour identifier CopI (Figure 55). Comme indiqué sur le gel SDS, les différentes étapes de purification permettent d'isoler une seule protéine. En effet dans les fractions C3 à C6 une seule bande (protéine) d'environ 15 kDa a été identifiée. L'analyse de cette bande par western blot et par spectrométrie de masse confirme qu'il s'agit bien de CopI pure (Figure 55B).

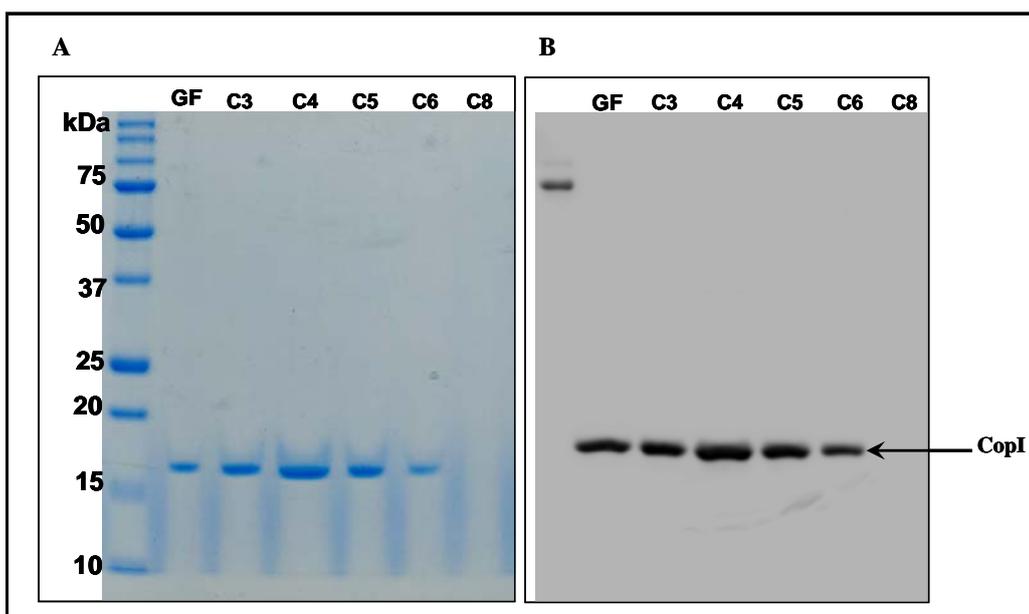


Figure 55 : Analyse des fractions de la GF sur un gel dénaturant SDS-PAGE 14% coloré au bleu de coomassie (A) et par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce) (B).

A – Les pistes C3 à C8 correspondent aux fractions de la GF (voir Figure 54) présentant des pics d’absorbance à 280, 439 nm et 581 nm ; la piste GF correspond à l’échantillon injecté à la GF obtenu à partir de la CM2 (Figure 53).- B – Western blot réalisé à partir du gel A.

Pour estimer la masse moléculaire de CopI purifiée et son état d’oligomérisation, nous avons utilisé une colonne de Gel Filtration calibrée auparavant avec des standards protéiques de faibles masses moléculaires. Nous avons pu ainsi estimer que la masse moléculaire de CopI est d’environ 14,6 kDa dans nos conditions expérimentales, ceci montre que CopI est purifiée sous la forme d’un monomère.

Ce protocole a permis la purification de CopI, cependant, cette approche reste à optimiser. En effet, le rendement de cette approche est très faible. Tout au long de ce protocole de purification, on perd une fraction contenant CopI particulièrement dans la fraction non retenue de la CM. Il faudrait alors utiliser cette fraction et réaliser d’autres étapes de purification afin d’augmenter le rendement.

Par ailleurs, comme CopI est riche en résidu histidines, et que cette protéine est détectée en conditions dénaturantes par la sonde HisProbe-HRP (Pierce), une approche utilisant la chromatographie d’affinité sur une résine Ni-NTA (colonne de nickel) en

condition native a été testée pour améliorer la purification de cette protéine. Effectivement, CopI peut être purifiée sur colonne Nickel, cependant, l'utilisation d'un choc à pH acide pour élué CopI au cours de cette approche pourrait affecter la liaison du cuivre avec CopI. Pour cette raison cette méthode n'est pas appropriée pour purifier CopI et quantifier par la suite le cuivre fixé par cette protéine.

Il serait intéressant de faire des mises au point du protocole de purification de CopI afin d'améliorer le rendement. Par exemple, il faudrait plutôt isoler la fraction soluble périplasmique à partir de la souche wt cultivée en présence d'excès de cuivre au lieu d'utiliser la fraction soluble totale. Ceci permettra l'élimination des protéines solubles du cytoplasme et rendra la purification de CopI plus facile. A partir de cette fraction périplasmique isolée, il faudrait refaire la purification selon le protocole initial et voir si l'élimination du soluble cytoplasmique améliore le rendement de cette approche. Des essais de purification du périplasme ont été entrepris chez *R. gelatinosus* en se basant sur un protocole utilisé chez les bactéries Gram⁻ notamment chez *E. coli*. Cette approche n'avait pas aboutit à des résultats concluants, ceci serait probablement due à une différence de composition des membranes entre la bactérie photosynthétique *R. gelatinosus* et la bactérie *E. coli*.

Ce protocole permet de purifier CopI mais en quantité insuffisante pour la suite des analyses. L'étape d'optimisation de cette approche est donc cruciale pour la caractérisation de CopI par des expériences biophysiques de RPE/ICP-MS qui détermineront le nombre d'atome de cuivre fixés par CopI. Par ailleurs, il est possible que CopI associée à la membrane soit différente de CopI de la fraction soluble. Il est donc aussi intéressant de purifier la fraction de CopI associé à la membrane après leur traitement dans un bain froid avec sonication pour analyser son contenu en cuivre. La comparaison de ces deux populations de CopI (RPE/ICP-MS) permettrait de déceler d'éventuelles différences de contenu en cuivre entre CopI soluble et CopI associée à la membrane.

Ces expériences de quantification du cuivre associé à CopI nous permettront d'avoir une vue plus précise sur le rôle de cette protéine et sur le système d'homéostasie du cuivre chez *R. gelatinosus* et de mieux comprendre les coopérations et les éventuelles interactions entre CopA et CopI dans le transport du cuivre.

II-4- La protéine CopJ

Au cours de la purification de CopI, nous avons également identifié CopJ par spectrométrie de masse comme protéine co-purifiée avec CopI (Figure 56) et induite en présence d'excès de cuivre suggérant ainsi son implication dans la tolérance au cuivre (Figure 35).

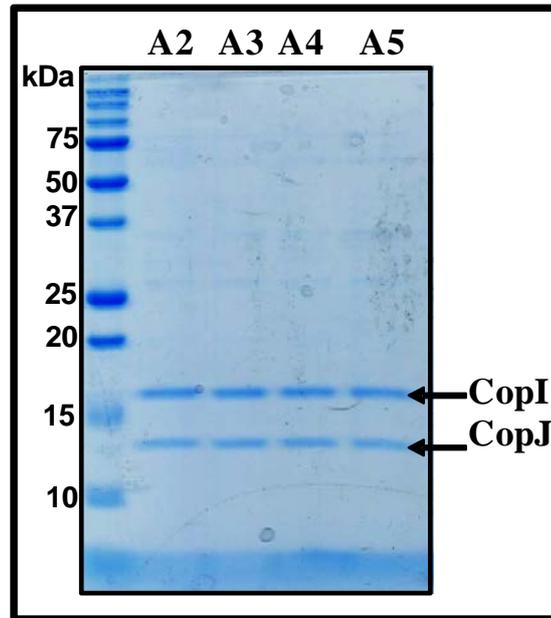


Figure 56 : Analyse des fractions de la GF réalisées à partir du produit d'élution de la CM1 sur un gel SDS-Page coloré au bleu de coomassie.

Les pistes A2 à A5 correspondent aux fractions de la GF obtenues à partir de la CM1 (Figure 53) et présentant des pics d'absorbance à 280, 439 nm et 581 nm.

Afin de vérifier l'implication de CopJ dans l'homéostasie du cuivre, nous avons inactivé le gène *copJ* et sélectionné un mutant *copJ*. La croissance de ce mutant a été examinée sur du milieu malate liquide ou solide en présence de concentrations croissantes en cuivre (1,6 μM à 1 mM CuSO_4) en photosynthèse anaérobie ou en respiration aérobie. En milieu solide, les résultats montrent que contrairement au wt, le mutant *copJ* ne pousse pas au-delà de 300 μM de cuivre en photosynthèse. Cependant, en respiration le mutant *copJ* présente une croissance similaire à la souche sauvage en présence de cuivre (Figure 57).

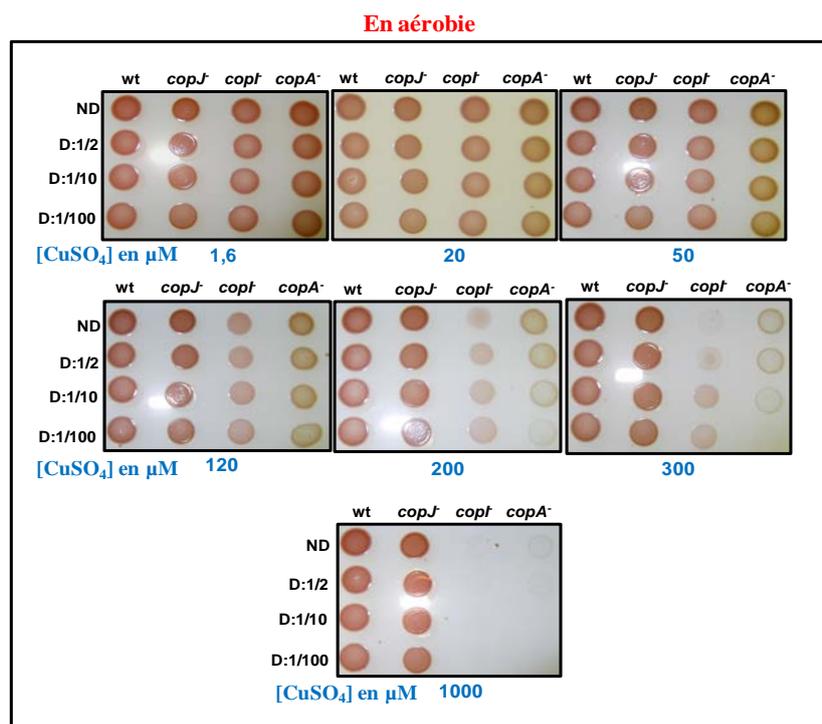
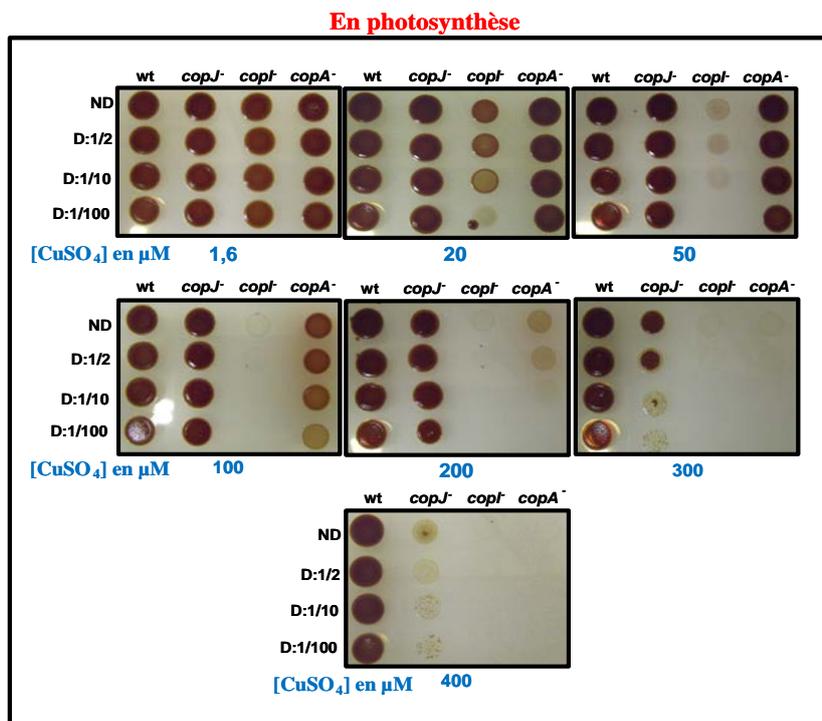


Figure 57 : Effet du cuivre sur la croissance du mutant *copJ*

Phénotype de croissance et de viabilité des cellules de la souche sauvage wt et des mutants *copJ*⁻, *copA*⁻ et *copI*⁻ sur des boîtes de milieu malate additionnées de concentrations croissantes en cuivre (de 1,6 μM à 400 ou 1000 μM). 8 μL de pré-cultures de ces souches non diluées (ND) et diluées au 1/2, 1/10 et 1/100 sont déposés sur boîtes. Après incubation de 48h des boîtes en respiration aérobie à l'obscurité ou en photosynthèse anaérobie, les boîtes sont prises en photos.

Ces résultats sur boîtes sont confirmés par des analyses de l'effet du cuivre sur la croissance du mutant *copJ* en milieu liquide. En effet, nous observons un ralentissement de la croissance du mutant *copJ* à partir de 300 μM de cuivre comparé au wt dans des conditions photosynthétiques (Figure 57 et 58). En revanche en condition de respiration aérobie, le mutant *copJ* se comporte comme la sauvage.

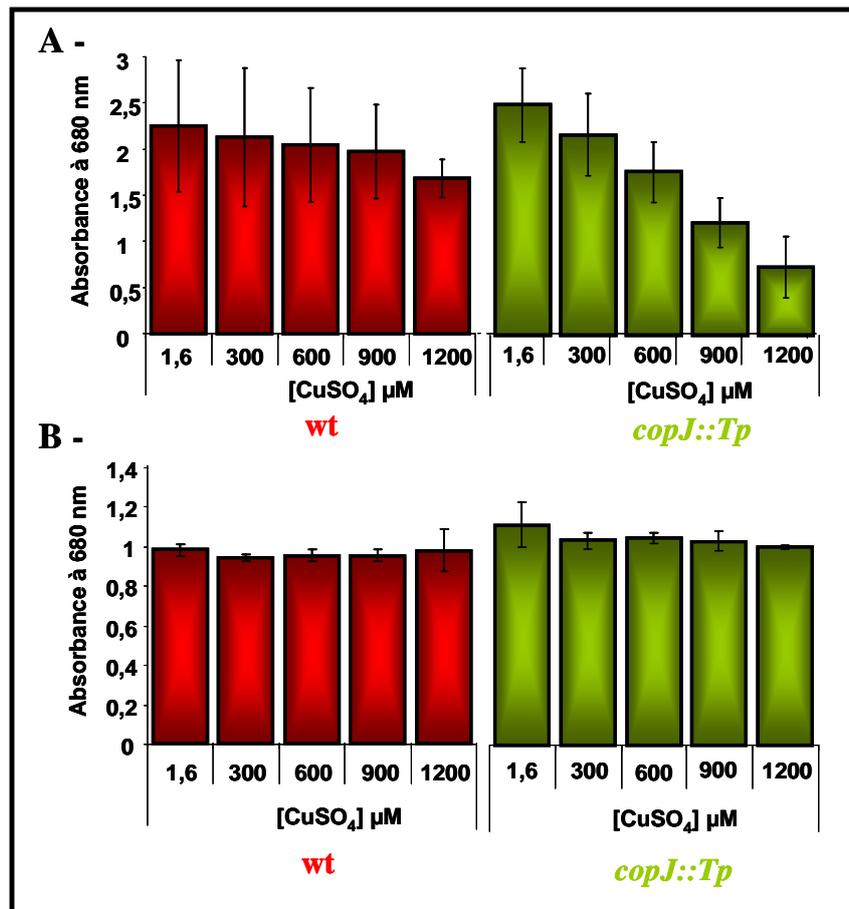


Figure 58 : Effet du cuivre sur la croissance mutant *copJ* en milieu liquide dans des conditions photosynthétiques anaérobies (A) et respiratoires aérobies (B)

Pour analyser l'inhibition de la croissance de la souche wt, *copA::Tp*, *copI::Tp* et *copJ::Tp* par le cuivre, des pré-cultures cultivées sur la nuit ont été diluées au 1:100 le lendemain dans du milieu malate liquide avec des concentrations croissantes en cuivre (1,6 ; 300 ; 600 ; 900 et 1200 μM). Après 48h d'incubation en présence de cuivre aussi bien en photosynthèse qu'en respiration à 30°C, la croissance a été suivie par la lecture de l'absorbance à 680 nm. Les barres d'erreur sont calculées à partir de trois expériences distinctes.

L'ensemble des résultats montre que la protéine CopJ comme CopI joue également un rôle dans la tolérance au cuivre essentiellement en anaérobie. Cependant, son implication est moindre comparée au rôle de la protéine CopI (80 μM / 300 μM). La tolérance au cuivre en

conditions de photosynthèse observée dans le wt nécessite donc l'implication d'au moins ces deux protéines périplasmiques en lien avec CopA. Contrairement à CopA, qui transporte le cuivre du cytoplasme vers le périplasma, le rôle exact de ces deux protéines CopI et CopJ reste à déterminer. Toujours est-il que leur importance dans le système de tolérance au cuivre est avérée et supportée par le phénotype des mutants et la surexpression de ces protéines en réponse au cuivre.

Contrairement à CopI, la tolérance au cuivre en conditions de respiration aérobie ne requiert pas la participation de CopJ. CopI seule pourrait être capable d'assurer la tolérance au cuivre en absence de CopJ. Il serait donc intéressant de construire un double mutant *copI copJ* et d'analyser sa tolérance au cuivre. Si le double mutant est plus sensible au cuivre comparé aux simples mutants, ceci montrerait qu'en absence de CopI, CopJ participerait à la tolérance en cuivre en aérobie. Comme pour CopI, seules les analyses du mutant *copJ* et la présence de ligands potentiels de cuivre dans la séquence de CopJ permettent de proposer un rôle de CopJ dans la fixation ou séquestration du cuivre particulièrement en anaérobie. Des analyses supplémentaires, notamment de la protéine CopJ purifiée, sont nécessaires pour affirmer ou infirmer cette hypothèse.

II-5- Discussion

Chez les bactéries, la quasi-totalité des enzymes à cuivre est localisée dans la membrane interne comme les cytochromes et quinol oxydases, la N₂O réductase, la nitrite réductase à cuivre (Cu-Nir), la superoxyde dismutase CuSOD ou encore la plastocyanine chez les cyanobactéries (Zumft 1997 ; Osman, Patterson et al. 2012 ; Ducluzeau, Ouchane et al. 2008 ; Romero, De la Cerda et al. 1998). Ceci nécessite donc un transport du cuivre vers le périplasma soit du milieu extracellulaire, soit du cytoplasme *via* des transporteurs de la membrane interne. Les travaux de Bahia Khalifaoui chez *R. gelatinosus* et d'autres auteurs chez *B. japonicum*, *R. capsulatus*, *R. sphaeroides* et *P. aeruginosa* ont montré que l'ATPase à cuivre CtpA (FixI, CcoI, RdxI ou encore CopA1) est indispensable pour l'assemblage de l'oxydase *cbb₃* (Preisig, Zufferey et al. 1996 ; Koch, Winterstein et al. 2000 ; Roh and Kaplan 2000 ; Gonzalez-Guerrero, Raimunda et al. 2010). La localisation de cette ATPase dans la membrane interne montre bien que le cuivre nécessaire pour l'activité de l'oxydase provient

du cytoplasme. Dans le cytoplasme, le cuivre n'est jamais à l'état libre et il est complexé à des molécules comme le glutathion ou les méthalthionines (Ascone, Longo et al. 1993) afin de canaliser son pouvoir redox. En cas d'excès, cet ion métallique est chassé du cytoplasme par des ATPases semblables à CtpA qui en fonction des espèces le délivre à un système d'efflux vers le milieu extérieur comme Cus chez *E. coli* ou à d'autres protéines périplasmiques comme CopK ou CopH de *C. metallidurans* pour le séquestrer et le neutraliser.

Différents systèmes de tolérance au cuivre ont été identifiés chez divers microorganismes (*E. hirae*, *E. coli*, *salmonella*, *C. metallidurans*, *P. aeruginosa*, etc). Cependant, très peu d'études ont été réalisées chez les protéobactéries photosynthétiques. En effet, une seule étude portant sur l'oxydase de cuivre CutO chez *R. capsulatus* en fait référence (Wiethaus, Wildner et al. 2006). Pour combler ce manque de données chez les bactéries pourpres, je me suis intéressée donc au métabolisme du cuivre chez *R. gelatinosus* afin d'identifier et caractériser les protéines impliquées dans ce processus et de comprendre les mécanismes qui régissent l'homéostasie du cuivre chez cette bactérie pourpre. Grâce à cette étude, nous avons identifié une partie des déterminants impliqués dans le système de tolérance au cuivre, notamment l'ATPase CopA qui représente la protéine centrale dans tous les systèmes d'homéostasie du cuivre caractérisés à ce jour chez différents microorganismes. Nous avons également identifié la présence du régulateur CopR intervenant dans la régulation de l'expression de CopA. Enfin, nous avons constaté que le système de la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus* fait intervenir des protéines probablement périplasmiques riches en résidus histidines et cystéines CopI et CopJ. De plus, l'analyse du génome de *R. gelatinosus* ainsi que la méthode de la mutagenèse par transposition indiquent qu'aucun système homologue à Cus d'*E. coli* n'est présent dans cette souche. L'ensemble de ces résultats me permet de proposer un modèle de tolérance au cuivre chez cette protéobactérie différent de ceux identifiés jusqu'à présent chez *E. coli* ou *E. hirae* mais présent chez d'autres espèces telles que *C. metallidurans* ou *P. aeruginosa*. Dans ce modèle, le cuivre transporté par CopA vers le périplasme ne serait pas transporté vers le milieu extracellulaire comme chez *E. coli* mais il serait plutôt fixé ou séquestré au niveau du périplasme par les protéines périplasmiques CopI et CopJ (voir modèle ci-dessous paragraphe I.2).

II-5.1- Un système de détoxification du cuivre périplasmique chez *R. gelatinosus*

Le système d'efflux du cuivre cytoplasmique excédentaire vers le périplasma semble être très conservé dans tous les microorganismes étudiés jusqu'à présent et fait intervenir l'ATPase à cuivre d'efflux CopA. Au niveau du compartiment périplasmique, le cuivre doit être pris en charge par des systèmes de détoxifications spécifiques en raison de sa toxicité. La forte toxicité du cuivre dans le périplasma a probablement généré une forte pression de sélection sur les bactéries aboutissant à l'émergence de différents systèmes périplasmiques de détoxification du cuivre. Il s'agit notamment du système d'efflux CusF/ABCD entre le périplasma, et la membrane externe chez *E. coli* (Figure 3 introduction), diverses chaperonnes à cuivres (CopI, CueP, CucA, CusF, CopH, CzcE, ORF PA2807...) et les oxydases à cuivre (CuiD, CueO...).

Chez plusieurs espèces, en aérobie, les oxydases à cuivre périplasmiques CueO d'*E. coli* ainsi que ses homologues CuiD de *Salmonella* et CutO de *R. capsulatus* oxydent le cuivre Cu(I) sous une forme moins toxique Cu(II) (Espariz, Checa et al. 2007 ; Wiethaus, Wildner et al. 2006 ; Outten, Huffman et al. 2001). En anaérobie, *E. coli* met en place le système d'efflux CusCFBA. La chaperonne CusF transfère le cuivre au système CusCBA pour l'excréter dans le milieu extracellulaire (Rensing and Grass 2003). L'analyse du génome de *R. gelatinosus* ne révèle aucun homologue de l'oxydase à cuivre périplasmique CueO et des sous-unités CusFBA du complexe Cus. Cependant, deux homologues à CusC sont présents dans le génome de *R. gelatinosus* et ont une identité de séquences de 40 à 35% avec CusC d'*E. coli*. Leur rôle dans la tolérance au cuivre n'est cependant pas encore déterminé mais il est possible qu'ils interviennent dans d'autres processus. Par contre, l'absence des autres gènes *cusFBA* suggère qu'il n'y aurait pas de système Cus fonctionnel chez *R. gelatinosus*. L'absence de ce système serait compensée par la présence des protéines CopI et CopJ qui permettent à la bactérie de tolérer des concentrations élevées en cuivre. Des systèmes semblables ont été décrits chez des bactéries comme *P. aeruginosa*, *Synechocystis* PCC6803 ou encore *Salmonella* qui possèdent un système alternatif à Cus pour la protection du périplasma (Osman, Waldron et al. 2010 ; Teitzel, Geddie et al. 2006 ; Tottey, Waldron et al. 2008). Parmi ces protéines périplasmiques les plus étudiées, figure la protéine CueP de *Salmonella* (Osman, Waldron et al. 2010).

Chez cette bactérie, le système de tolérance du cuivre met en jeu deux ATPases CPx CopA et GolT qui délivrent le cuivre à CueP afin de le séquestrer. (Espariz, Checa et al. 2007 ; Pontel and Soncini 2009). CueP présente une faible identité de séquence avec CopI (de 14%) de *R. gelatinosus* (Osman, Waldron et al. 2010). Par contre, il semblerait qu'elles remplissent des fonctions similaires dans la tolérance au cuivre.

II-5.2- Rôles putatif de CopI dans la tolérance au cuivre

Au cours de cette étude, nous avons identifié la protéine puis le gène *copI* chez *R. gelatinosus*, dont l'expression est induite par l'excès de cuivre. Ce gène qui code pour une protéine périplasmique riche en résidus histidine et méthionine protège *R. gelatinosus* de la toxicité du cuivre en aérobie et en anaérobie. Deux hypothèses sont émises sur le rôle de CopI : soit elle transporterait le cuivre comme CusF vers un système d'efflux de la membrane externe (Bagai, Rensing et al. 2008) ; soit elle séquestrerait le cuivre excrété par CopA au niveau du périplasma. Cependant, la très forte induction de CopI comparée à celle de CopA, en réponse au cuivre, observée sur un gel SDS chez *R. gelatinosus* suggère que CopI peut séquestrer le cuivre. Des résultats similaires obtenus chez *P. aeruginosa* montrant que l'homologue de « CopI », ORF2807, est induit 2400 fois contre une induction de 8 fois pour CopA (Teitzel, Geddie et al. 2006) sont en faveur du rôle proposé pour CopI dans la séquestration du cuivre. Par ailleurs, l'homologie de séquence et la conservation des résidus impliqués dans la coordination du cuivre (His39, Cys83, His86 et Met91) avec la plastocyanine, indiquerait que CopI pourrait fixer de façon covalente au moins un atome de cuivre.

Les analyses génomiques révèlent la présence de plusieurs protéines périplasmiques capables de séquestrer le cuivre chez diverses bactéries. Certaines de ces protéines présentent des homologies de séquences avec CopI de *R. gelatinosus*. Parmi celle-ci, la protéine codée par l'ORF2807 de *P. aeruginosa* présente une identité de 37% avec CopI et une parfaite conservation des résidus qui pourraient être impliqués dans la coordination du cuivre. L'étude transcriptomique réalisée chez *P. aeruginosa* PAO1 en présence d'excès de cuivre, indique comme précédemment indiqué, que cette ORF est fortement induite dans ces conditions (Teitzel, Geddie et al. 2006). De plus, le mutant de délétion de l'ORF2807 montre aussi une augmentation de la sensibilité au cuivre (Teitzel, Geddie et al. 2006) comme c'est le cas pour

le mutant *copI*. Chez *C. metallidurans* CH34, une protéine également annoté CopI présente 52% d'identité avec RG-CopI (Monchy, Benotmane et al. 2006). Cependant aucune étude n'a porté sur le rôle de cette protéine dans la tolérance au cuivre. Vu la forte homologie de séquence, il est fort probable que MCH34-CopI remplisse le même rôle que CopI de *R. gelatinosus*.

En plus de CopI, *C. metallidurans* produit plusieurs autres protéines périplasmiques impliquées dans la tolérance du cuivre comme "CopA", CopK et CopC qui sont également riches en méthionines et histidines et qui seraient capables de fixer respectivement 11, 2 et 2 atomes de cuivre par molécule (Cha and Cooksey 1991 ; Bersch, Favier et al. 2008 ; Arnesano, Banci et al. 2003 ; Monchy, Benotmane et al. 2006). Des analyses transcriptomiques réalisées chez *C. metallidurans* CH34 montrent que l'expression de MCH34-CopI en présence de 0,1 mM de CuSO₄ est induite 55 fois alors que les gènes *copC*, *copK* et *copA* sont induits respectivement 278, 158 et 86 fois dans les mêmes conditions de culture (Monchy, Benotmane et al. 2006). Ces protéines seraient impliquées dans la détoxification du périplasm : CopC et CopK seraient capables de fixer le cuivre alors que "CopA" est une oxydase de cuivre.

Chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803, une protéine périplasmique CucA a été identifiée et semble avoir un rôle dans la protection du périplasm contre les dégâts éventuels que peut occasionner l'excès de cuivre (Tottey, Waldron et al. 2008 ; Waldron, Firbank et al. 2010). Il a été montré que CucA est exportée dans le périplasm sous forme d'apoprotéine pour y acquérir le cuivre. Les deux transporteurs CtaA et PacS et la métallochaperonne Atx1 sont nécessaires pour fournir le cuivre à CucA. La coordination du métal se fait par trois résidus histidine et un résidu glutamate (Waldron, Firbank et al. 2010). Le pourcentage d'homologie avec CopI est très faible, cependant les deux protéines semblent remplir la même fonction.

Chez *P. syringae* pv. *tomato*, les protéines périplasmiques CopC (homologue à PcoC d'*E. coli*) et "CopA" sont abondantes en présence de cuivre et les colonies présentent une coloration bleue caractéristique de l'accumulation du cuivre dans les cellules. Ce phénotype suggère l'implication de ces protéines périplasmiques dans la séquestration du cuivre (Cha and Cooksey 1991 ; Boal and Rosenzweig 2009).

Les structures tridimensionnelles des protéines périplasmiques fixant le cuivre, comme CusF, CucA, CopK ou encore CopC, ont été déterminées et montrent une variété de structures entre ces chaperonnes à cuivre (Xue, Davis et al. 2008 ; Waldron, Firbank et al. 2010 ; Zhang, Koay et al. 2006). De la même manière, plusieurs familles de protéines périplasmiques (CopI, CopG, CucA, CopK, CopH, CueP, CusF, CzsA, PcoA, PcoC, etc) pouvant fixer le cuivre ont été décrites. L'existence de cette grande variété de séquences protéiques et probablement de structures est remarquable et peut refléter l'importance et la nécessité de protéger le périplasma contre le cuivre et la pression de sélection qu'aurait engendré le cuivre pour faire évoluer ou recruter une telle variété de protéines ayant la même fonction. En d'autres termes, peut-être qu'à défaut de pouvoir chasser complètement le cuivre du périplasma, les bactéries ont acquis différentes protéines pour assurer la séquestration du cuivre dans cet espace. Pontel a en effet suggéré que ces chaperonnes périplasmiques présentes chez ces bactéries remplaceraient le système d'efflux de la membrane externe Cus pour protéger le périplasma de la toxicité du cuivre en excès (Pontel and Soncini 2009).

Toutefois il n'est pas exclu que certaines de ces protéines puissent avoir d'autres fonctions physiologiques dans la cellule. A titre d'exemple, CueP chez *Salmonella*, en plus de son rôle dans la tolérance au cuivre, fournirait le cuivre indispensable pour l'activité de la superoxyde dismutase Cu-Zn-SOD (Osman, Patterson et al. 2012). Dans ce sens, l'homologie de CopI avec PetE (la plastocyanine) peut suggérer un rôle de CopI dans le transfert d'électrons ou alors comme CueP, CopI pourrait acheminer le cuivre aux cuproprotéines de la membrane.

II-5.3- Rôles potentiels de CopJ et CopH dans la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus* :

L'existence chez diverses bactéries d'une variété de protéines périplasmiques impliquées dans la séquestration du cuivre, ainsi que la présence de résidus ligands potentiels de cuivre sur les séquences protéiques de CopJ et CopH chez *R. gelatinosus* laisse aussi prédire un rôle pour ces protéines dans la séquestration du cuivre. Comme CopI, ces protéines présentent des résidus méthionines, cystéines et histidines bien conservés susceptibles d'interagir avec le cuivre au niveau du périplasma.

L'analyse phénotypique du mutant *copJ* indique que la protéine CopJ participe à la tolérance au cuivre mais, son importance est moindre comparée à CopI. En effet, le mutant *copJ* est plus tolérant au cuivre aussi bien en anaérobie qu'en aérobie contrairement au mutant *copI*. Ce phénotype peut être expliqué par deux hypothèses. La première hypothèse est que l'absence de CopJ est compensée par la présence de CopI ou autres protéines (non identifiées) surtout en respiration. La différence de la tolérance au cuivre observée entre les mutants *copI* et *copJ* pourrait s'expliquer par le fait que CopI fixerait plusieurs atomes de cuivre contrairement à CopJ. La deuxième hypothèse est que CopJ n'intervient pas dans la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus* en aérobie. Afin d'affirmer ou infirmer ces hypothèses, il faudrait construire le double mutant *copI-copJ* et étudier son phénotype en présence du cuivre. Si le double mutant est plus sensible que *copI*, ceci montrerait qu'en absence de CopI, CopJ participerait à la tolérance en cuivre en aérobie. En revanche si la tolérance du double mutant est similaire à celle du simple mutant *copI*, ceci indiquerait que CopJ n'intervient pas dans la tolérance au cuivre en aérobie. Par contre en microaérobie et en photosynthèse, l'implication de CopI et CopJ sont nécessaires pour assurer la tolérance au cuivre et c'est dans ces conditions d'ailleurs que CopJ est co-purifiée avec CopI, suggérant ainsi une possible interaction entre ces deux protéines. Par ailleurs, des analyses complémentaires telles que l'étude de l'expression de CopI dans un mutant *copJ* et des expériences de quantification du cuivre par RPE/ICP-MS sur du CopJ préalablement purifiée, nous permettront d'avoir une image plus claire sur le rôle de CopJ dans la tolérance du cuivre.

RG-CopJ a des similitudes élevées avec CopG d'*Achromobacter* sp. AO22 (42% d'identité) et de *C. metallidurans* CH34 (51% d'identité) (Ng, Palombo et al. 2012 ; Monchy, Benotmane et al. 2006). Chez ces deux bactéries, CopG serait une chaperonne à cuivre et l'étude de *copG* en présence de cuivre montre une induction relativement modérée de son expression (8 fois) par comparaison aux autres protéines périplasmiques exprimées chez *C. metallidurans* CH34 (Monchy, Benotmane et al. 2006). Ce résultat suggère que comme pour CopJ de *R. gelatinosus*, CopG de *C. metallidurans* CH34 aurait peut-être un rôle moins important que CopI dans la tolérance au cuivre.

La troisième protéine CopH de *R. gelatinosus* est très peu répandue chez les bactéries. Des homologues sont présents dans d'autres souches de *R. gelatinosus* comme *R. gelatinosus* IL144 ou chez *R. benzoatilyticus* JA2 et *L. cholodnii* et présentent un motif CxxHC ainsi que des histidines et cystéines bien conservées. Chez *V. cholerae*, le système de tolérance au

cuivre fait intervenir l'opéron Cop. Le gène VCA0262 localisé dans cet opéron, coderait pour une protéine présentant 20% d'identité avec la protéine CopH de *R. gelatinosus*. Comme *RG-copH*, l'ORF VCA0262 coderait également pour une protéine prédite périplasmique mais dont le rôle dans la résistance au cuivre reste à déterminer (Marrero, Sanchez et al. 2012).

Le fait que *copH* est localisé à proximité des gènes codant pour les autres déterminants impliqués dans le système de tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus* et chez *Vibrio (V.) cholerae* laisse penser que CopH pourrait jouer un rôle dans ce système. Cependant, il n'a pas été détecté avec les protéines CopI et CopJ. Afin de déterminer si CopH intervient dans la tolérance au cuivre, il faudrait générer un mutant *copH* et analyser son phénotype en présence de cuivre. Nous pouvons également suivre le profil d'expression du gène *copH* par RT-PCR en réponse au cuivre dans différentes conditions d'oxygénation pour déterminer dans quelles conditions *copH* s'exprime le plus.

II-5.4- Modèle proposé pour l'efflux du cuivre chez *R. gelatinosus*

Comme nous l'avons déjà dit, l'homéostasie du cuivre chez les microorganismes photosynthétiques n'est pas très étudiée à l'exception de certaines études réalisées chez les cyanobactéries comme *Synechocystis* PCC6803 portant sur les transporteurs ATPasiques de cuivre CtaA/PacS et les chaperonnes à cuivre (Tottey, Rich et al. 2001). De la même manière, très peu de choses sont connues sur les mécanismes d'import du cuivre chez les microorganismes en général, l'entrée du cuivre dans les cellules se ferait probablement de manière non spécifique. En effet, il a été supposé chez *E. coli* que l'entrée du cuivre s'effectue par l'intermédiaire des porines de la membrane externe telles que les porines OmpC et OmpF (Li, Nikaido et al. 1997 ; Rensing and Grass 2003). Il a été également suggéré par une étude transcriptomique réalisée chez *E. coli* que l'import du cuivre pourrait s'effectuer d'une manière non spécifique notamment *via* le système d'import du zinc de type ABC *znuABC* (Kershaw, Brown et al. 2005). Une fois dans la cellule, le cuivre est pris en charge par des protéines spécifiques afin d'assurer le contrôle de la concentration intracellulaire de ce métal. Une variété de systèmes de tolérance au cuivre a été décrite chez des protéobactéries comme *E. coli*, *Salmonella*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *H. pylori* ou encore *C. metallidurans* CH34. La protéine centrale dans tous ces systèmes étudiés chez les différents microorganismes est l'ATPase « CopA » impliquée dans l'efflux du cuivre du cytoplasme vers le périplasma.

Divers partenaires cytoplasmiques et périplasmiques de CopA dans la tolérance au cuivre ont été décrits dans la littérature.

Chez *Salmonella*, *V. cholerae* et *E. coli*, des protéines périplasmiques différentes participent à la tolérance au cuivre selon les conditions de culture aérobie et anaérobie. En aérobie, *Salmonella* et *E. coli* mettent en place une oxydase à cuivre (CuiD et CueO) pour oxyder le Cu(I) en Cu(II) alors que *V. cholerae* exprime Vc_Cot pour contribuer à la résistance au cuivre. En anaérobie, *E. coli* met en place le complexe CusCFBA tandis que *Salmonella* et *V. cholerae* induisent respectivement l'expression de CueP et CopG pour protéger le périplasma de la toxicité du cuivre. Chez *R. gelatinosus*, le modèle que nous proposons s'approche de celui décrit chez *Salmonella* et *V. cholerae*.

En effet, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse montre que le modèle d'homéostasie du cuivre chez *R. gelatinosus* diffère de celui d'*E. coli*. Ces résultats me permettent de proposer un modèle d'efflux du cuivre qui varie selon les conditions d'oxygénation en mettant en jeu l'ATPase CopA et les protéines périplasmiques CopI et CopJ.

Dans ce modèle CopA, comme chez tous les organismes, transporterait le cuivre du cytoplasme vers le périplasma. Au niveau du périplasma et selon la teneur en oxygène dans le milieu, *R. gelatinosus* met en place différentes protéines solubles prédites périplasmiques : CopI en aérobie et CopI/CopJ en microaérobie/anaérobie. Du fait qu'une population de CopI est attachée à la membrane, nous proposons que cette population ne soit pas chargée en cuivre. Nous pouvons imaginer que le transfert du cuivre vers CopI nécessite une interaction avec CopA. Une fois CopI chargée en cuivre, l'interaction CopA/CopI est rompue et CopI se décroche de la membrane pour se localiser dans le périplasma. CopI pourrait alors séquestrer le cuivre au niveau du périplasma ou le transloquer vers un système d'efflux encore non identifié de la membrane externe.

En microaérobie et anaérobie, la protéine CopJ rentre en jeu afin d'assurer une tolérance totale au cuivre dans la souche sauvage de *R. gelatinosus*. Comme CopI, il n'est pas exclu que CopJ soit également attaché à la membrane afin d'acquérir le cuivre. D'ailleurs, la protéine CopJ est co-purifiée avec CopI. L'hypothèse la plus simple sur le rôle de CopJ dans ce

modèle est que CopJ, comme CopI, séquestrerait le cuivre au niveau du périplasma. Néanmoins, des zones d'ombre sur le rôle exact de CopI et CopJ restent à éclaircir.

Dans la partie I, nous avons montré que malgré l'homologie de séquences entre les ATPase à cuivre CtpA et CopA, remplissent deux fonctions physiologiquement différentes dans la cellule. Il a été suggéré que le rôle de chacune des deux ATPases serait déterminé par des interactions spécifiques avec des protéines partenaires. Dans ce sens, l'identification de CopI et CopJ comme partenaires possibles de l'ATPase CopA dans la tolérance au cuivre pourrait déterminer le rôle de ce transporteur dans l'efflux du cuivre (Figure 59).

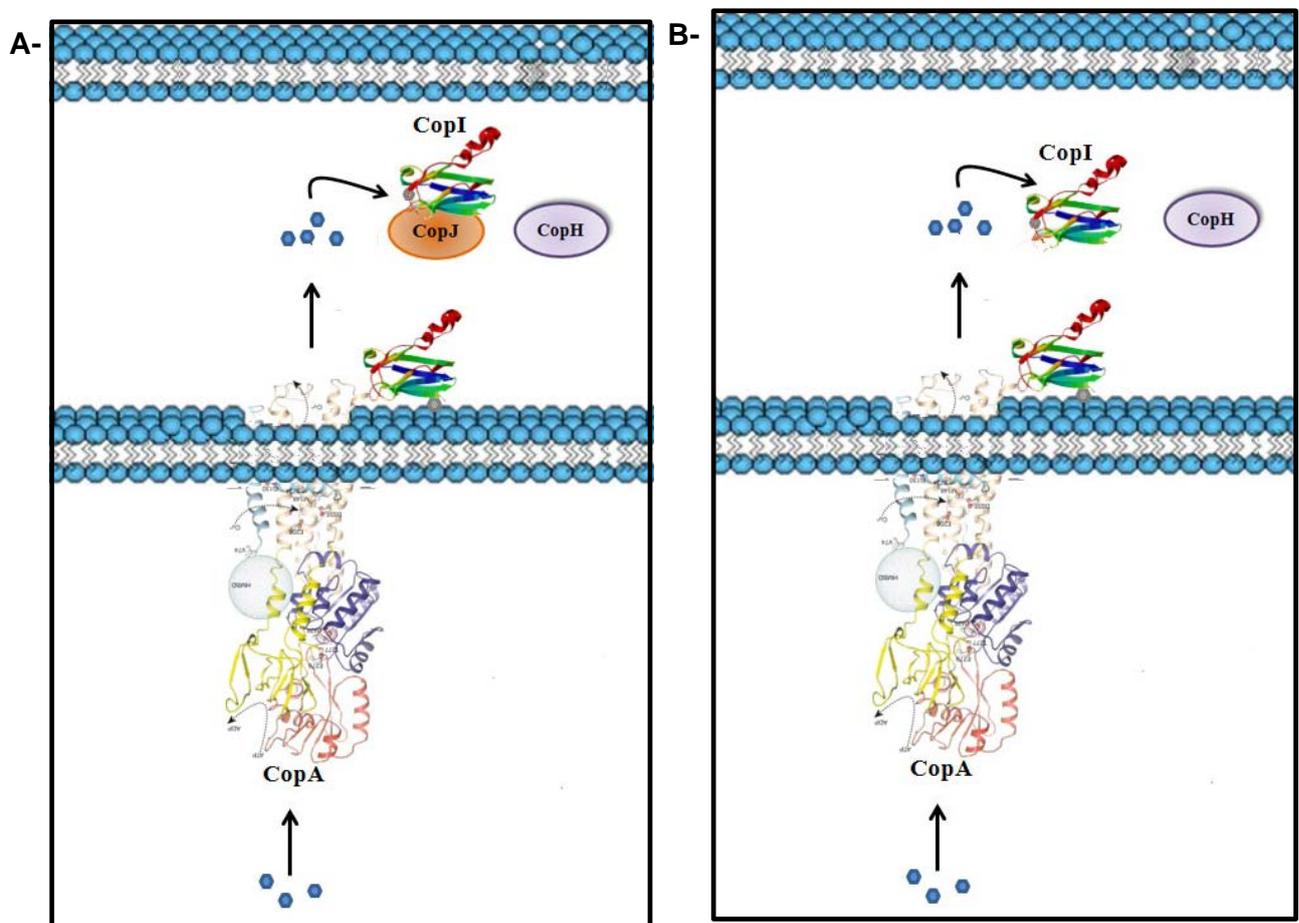


Figure 59 : Modèle proposé chez *R. gelatinosus* concernant l'efflux du cuivre

En Anaérobiose (A) et aérobiose (B), en présence d'excès de cuivre CopA transporterait le métal du cytoplasme vers le périplasma. Au niveau de ce compartiment en absence d'oxygène (A), les protéines CopI, CopJ et probablement CopH interviennent dans la détoxification du cuivre contrairement aux conditions aérobies (B) qui ne mettraient en jeu que la protéine CopI et probablement CopH pour prendre en charge le cuivre.

Ce modèle de tolérance au cuivre proposé chez *R. gelatinosus* reste à confirmer et à compléter. En effet, la localisation périplasmique des protéines CopI et CopJ sera à vérifier en utilisant un contrôle pour le compartiment périplasmique et cytoplasmique. La protéine CopI peut être détectée grâce à la sonde His-Probe (Pierce), ceci nous a déjà permis de détecter sa présence dans les fractions solubles mais également associée à la fraction membranaire. Pour vérifier sa présence dans le périplasme, il faudrait mettre au point un protocole adapté à *R. gelatinosus* permettant la purification de la fraction périplasmique tout en utilisant des témoins pour chacune des trois fractions : membranaire, cytoplasmique et périplasmique. Par ailleurs, la fixation du cuivre par CopI ou CopJ doit être vérifiée par des expériences de RPE/ICP-MS, une fois les protéines purifiées.

Enfin, le rôle de la protéine CopH dans la tolérance au cuivre reste inconnu. L'analyse du phénotype d'un mutant *copH* nous permettra de déterminer si cette protéine a un rôle dans le système de tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus*.

II-5.5- Modèles expliquant la sécrétion de la coproporphyrine III uniquement dans un mutant *copA*⁻ de *R. gelatinosus*

Le modèle proposé pour le transport du cuivre chez *R. gelatinosus*, nous permet d'expliquer les raisons de la sécrétion de la coproporphyrine III uniquement dans un fond génétique *copA*⁻ et pas dans le mutant *copI* pourtant plus sensible au cuivre (Figure 60).

En effet, en microaérobie et anaérobie, le mutant *copA*⁻ en présence d'excès de cuivre contrairement au wt et aux mutants *copI* et *copJ*, secrète dans le milieu de la coproporphyrine III. L'accumulation de la coproporphyrine III indique une altération de la voie de biosynthèse des porphyrines au niveau de la conversion de la coproporphyrinogène III en protoporphyrinogène catalysée par la coproporphyrine III oxydase IX, HemN. HemN est une enzyme à cluster [4Fe-4S] soluble localisée dans le cytoplasme. Nous avons proposé que le cuivre en excès qui s'accumule dans le cytoplasme en l'absence du système d'efflux de la membrane interne CopA, affecte la stabilité et l'activité de cette enzyme.

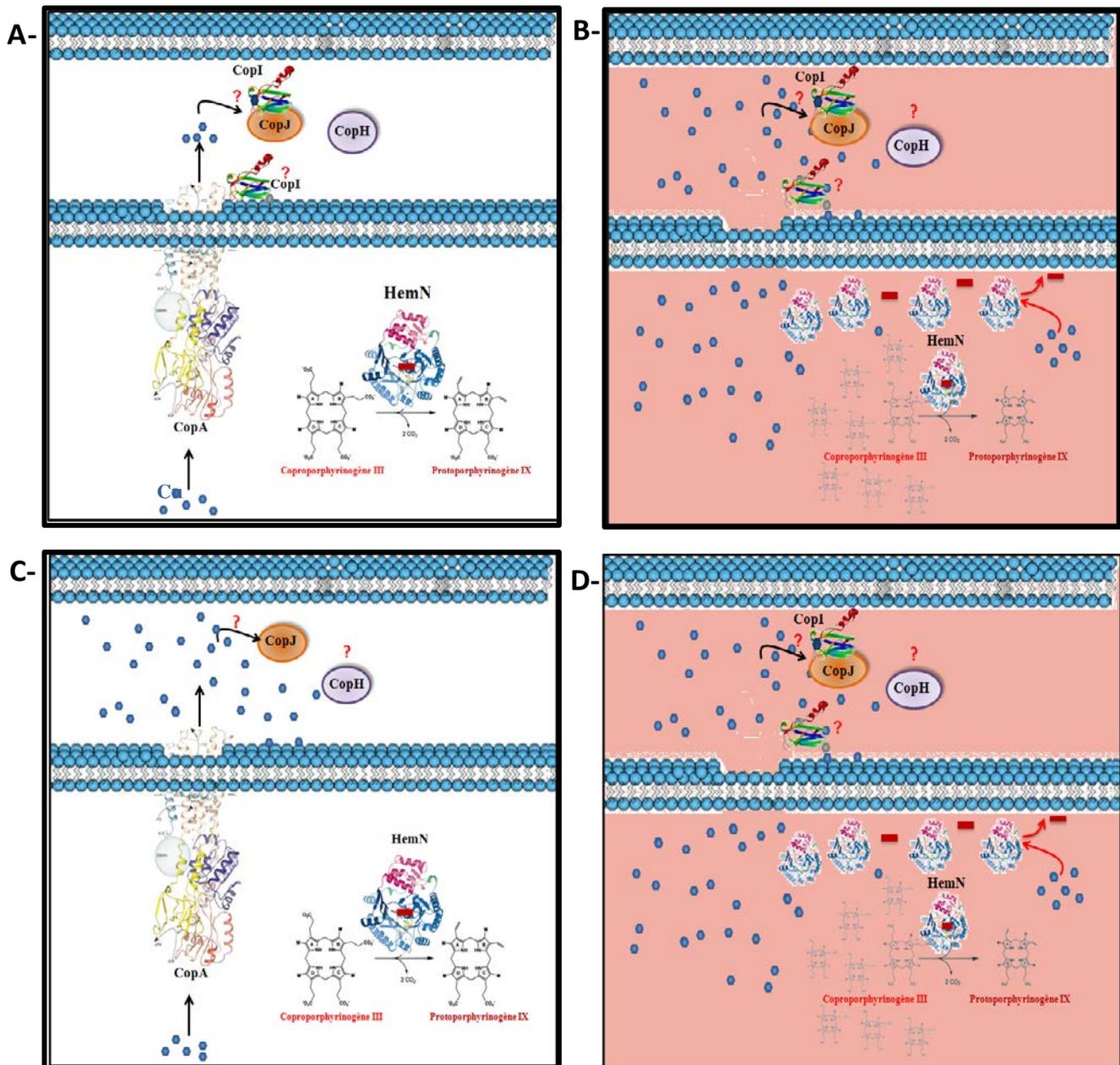


Figure 60 : Transfert du cuivre et toxicité du cuivre en anaérobie microaérobie chez la souche sauvage wt et les mutants *copA*, *copI* et *copA copI*

- A – Transport du cuivre dans la souche sauvage où CopA transporte le cuivre du cytoplasme vers périplasm qui sera pris en charge par la suite par la protéine CopI (et probablement CopJ et CopH). La concentration intracellulaire du cuivre est ainsi contrôlée et HemN assure sa fonction dans la voie de biosynthèse des porphyrines. – B - Transport du cuivre dans la souche *copA*, le cuivre s'accumule particulièrement dans le cytoplasme, ceci affecte l'activité de HemN en déstabilisant son site catalytique constitué de clusters [Fe-S] entraînant la sécrétion de son substrat la coproporphyrinogène III (rouge). – C - Transport du cuivre dans la souche *copI*, le cuivre transporté par CopA s'accumule dans le périplasm sans être pris en charge au niveau de ce compartiment par CopI, la concentration du cuivre cytoplasmique étant « contrôlée », HemN est ainsi stable. – D - Transport du cuivre dans la souche *copA copI*, le cuivre s'accumule aussi bien dans le cytoplasme que le périplasm ce qui attaque entre autres l'activité de HemN reflétée par la sécrétion de son substrat la coproporphyrinogène III (rouge).

En revanche, les mutants *copI* et *copJ* cultivés dans les mêmes conditions d'oxygénation et en présence d'excès de cuivre (20 ou 40 μM CuSO_4) ne présentent pas de phénotype de sécrétion de la coproporphyrine III observé dans le mutant *copA*⁻ (Figure 60C). Ceci peut s'expliquer par le fait que dans ces mutants, la protéine CopA se met en place et l'excès de cuivre est ainsi chassé du cytoplasme permettant à HemN de remplir sa fonction comme dans un fond génétique sauvage. Le cuivre ainsi transporté va s'accumuler dans le périplasme sans être pris en charge par CopI ou CopJ conduisant ainsi au ralentissement de la croissance des mutants.

Comme pour le mutant *copA*⁻, le double mutant *copA*⁻*copI* secrète également de la coproporphyrine III en présence d'excès de cuivre et en condition limitée en oxygène, en raison de l'absence de CopA.

Matériels et méthodes

Souches bactériennes et milieu de culture : *R. gelatinosus* est cultivée à 30°C dans du milieu malate. La bactérie est capable de croître dans différentes conditions d’oxygénation, à l’obscurité et en respiration en aérobie (en présence de forte oxygénation : dans un erlen de 250 mL contenant 20 mL de milieu), en micro-aérobie (faible oxygénation : dans un erlen de 50 mL rempli avec 50 mL de milieu de culture) ou anaérobie en présence de lumière (pour la photosynthèse les tubes sont remplis de milieu et scellés) (Hassani, Steunou et al. 2010). Les antibiotiques Kanamycine (km), ampicilline et triméthoprime (Tp) sont utilisés à une concentration de 50 µg/mL. Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont listés dans le tableau 3 (voir annexe).

Clonage des gènes et construction de plasmides recombinants : Pour cloner le gène *copI* à partir du plasmide pb79-1 de la banque d’ADN génomique de *R. gelatinosus*, un fragment de 2,035 kb (contenant ainsi les gènes *copR*, *copH*, *copI* et *copJ*) est amplifié par PCR en utilisant les amorces *copI-For* et *copI-Rev* (Table II). Le fragment a été cloné dans le vecteur de clonage pDrive pour donner le vecteur recombinant pSI1. Le gène *copI* a été inactivé par l’insertion d’une cassette de résistance à la Tp aux sites *SacII* (délétion d’un fragment de 735 pb) dans la séquence codante de *copI*. Brièvement, le plasmide pSI1 a été digéré par l’enzyme de restriction *SacII* puis traité avec le fragment de klenow à 25°C pendant 20 min pour générer des bouts francs grâce à l’activité polymérase 5’→3’ de la klenow. Le produit est ligué avec la cassette Tp de 0,7 kb préalablement digérée par *SmaI* qui produit des bouts francs. Le plasmide recombinant résultant est désigné pSI2 (*copI::Tp*).

Pour inactiver le gène *copJ*, le plasmide pSI1 a été utilisé. Le gène *copJ* a été inactivé par l’insertion de la cassette de résistance à la Tp au site *MscI* dans la séquence codante de *copJ*. Le plasmide pSI1 a été digéré par l’enzyme de restriction *MscI* puis ligué avec la cassette Tp de 0,7 kb préalablement digérée par *SmaI*. Le plasmide de recombinaison résultant est désigné pSJ1 (*copJ::Tp*). Afin d’éliminer les gènes (*copR*, *copH*) qui sont localisés en aval du gène inactivé *copJ::Tp*, la construction *copJ::Tp* est alors sous-clonée dans le plasmide KS pBluescript II. Le plasmide pSJ1 est digéré par les enzymes *EcoRI* et *SmaI*, pour extraire le fragment de 1583 pb contenant la construction *copJ::Tp*. Ensuite, ce fragment est ligué avec le plasmide KS préalablement digéré avec les enzymes *EcoRI* et *SmaI*. Le plasmide ainsi

obtenu pSJ2 a été utilisé pour transformer les cellules du wt de *R. gelatinosus* par électroporation.

Transfert de gène et sélection de souche : La transformation des cellules de *R. gelatinosus* a été réalisée par électroporation comme précédemment décrit (Ouchane, Picaud et al. 1996). Les transformants ont été sélectionnés sur des boîtes de milieu malate contenant l'antibiotique approprié dans des conditions d'aérobie. Les transformants ampicilline-sensibles sont issus de deux événements de recombinaisons homologues et n'ont pas intégré le plasmide recombinant. Après la sélection du transformant, l'ADN génomique a été préparé à partir de ces souches ampicilline-sensibles et la confirmation de la présence du marqueur de résistance à l'antibiotique a été vérifiée par PCR.

Construction du double mutant *copA::K copI::Tp* : Le mutant *copA::K*, obtenu par la méthode de transposition au Tn5 citée au cours du chapitre II, a été utilisé pour construire le double mutant *copA::K copI::Tp*. Le plasmide pSI2 est utilisé pour transformer par électroporation la souche de *copA::K*.

Construction de la souche CopI-H6 de *R. gelatinosus* : La construction de *copI-His₆* a été produite en clonant le gène *copI* dans le plasmide de pET-28b. Le gène *copI* (fragment de 550 pb) a été amplifié par PCR à partir du plasmide pSI1 en utilisant les amorces *copI-NcoI* et *copI-XhoI*. Le site *XhoI* a été généré dans le codon STOP TGA pour produire une fusion du cadre de lecture. Le plasmide résultant pCopIH₆, a été séquencé et intégré dans le locus de *copI* sur le chromosome de *R. gelatinosus*. Les colonies sélectionnées sont kanamycine résistantes. L'intégration de ce plasmide dans le locus de *copI* a été vérifiée par PCR sur l'ADN génomique de ces souches.

Extraction d'ARN et RT-PCR : L'ARN total des cellules du sauvage poussé en photosynthèse en présence de différentes concentrations de cuivre a été extrait selon Steunou, Astier et al. 2004. La concentration des ARN a été déterminée par absorption à 260 nm. Des amorces spécifiques ont été conçues pour amplifier des fragments des gènes *copI* et *pucB* de *R. gelatinosus*. Les séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR sont indiquées dans le tableau III (voir annexe). Les amorces anti-sens de chaque gène ont été hybridées en présence de 2 µg d'ARN total extrait, puis une étape d'élongation de 50 min à 55°C a été réalisée en présence de 1 mM de dNTPs et en utilisant 200U de transcriptase reverse (RT) (Superscript III, Invitrogen). 2 µL de la transcription reverse ont été utilisés pour une PCR comme suit ; chaque réaction de PCR contient 50U de la Taq ADN polymérase (Qiagen Inc., Valence, CA) et 5% diméthyl sulfoxyde (DMSO). Le programme de PCR réalisé est le suivant : un cycle de

1 min à 95°C, 30 cycles de 10 s à 94°C, 30 s à 54°C, 30 s à 72°C et une incubation finale de 10 min à 72°C. Les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur un gel de 1,2% d'agarose.

Western blot et immunodétection : La concentration des protéines solubles a été déterminée en effectuant une analyse par l'acide bicinchoninique (sigma) et de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard. Pour la détection CopI_His₆, 40 µg de protéines solubles totales ont été chauffées 5 min à 95°C puis déposées sur gel SDS-PAGE (14% d'acrylamide) et transférées sur une membrane en polyvinylidène difluoride (PVDF) (GE Healthcare). Pour la détection de CopI-His₆, la sonde HisProbe-HRP (Pierce) a été utilisée selon les instructions du fabricant. Les bandes ont été détectées en utilisant un substrat chimioluminescent de HRP selon la méthode de Haan et de Behrmann. La capture d'image a été réalisée avec un système d'appareil-photo CCD LAS-3000 (Fuji).

Recherche de protéines solubles induites en présence d'excès de cuivre : La souche sauvage de *R. gelatinosus* a été mise en culture en photosynthèse en présence de 1,6 µM de cuivre (Malate) et en présence d'excès de cuivre (1,2 mM). Après 48h d'incubation, les cellules sont centrifugées. La fraction protéique soluble a été isolée après une étape de lyse cellulaire à la Presse de French et une ultracentrifugation pendant 1h30 à 40000 rpm (rotor 70Ti). Les différents échantillons ont été dosés par la méthode colorimétrique en utilisant l'acide bicinchoninique (sigma) et en prenant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme étalon. Les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 5 min avant de les déposer sur un gel dénaturant SDS-PAGE de 14% d'acrylamide.

Purification de CopI :

Au cours de la purification, la détection de CopI est suivie sur gel coloré au bleu de coomassie. La bande correspondante à CopI est de masse moléculaire d'environ 15 kDa. La présence dans CopI de nombreux résidus histidines proches permet également la détection de la protéine par Western blot grâce à la sonde HisProbe-HRP (Pierce). Enfin, la protéine CopI présente une forte homologie avec les protéines de la famille des plastocyanines. Ces derniers fixant le cuivre sont caractérisés par des pics d'absorbance à 439 nm et à 581 nm (Quaranta, McCarty et al. 2007). Au cours de la purification de CopI sur colonne, nous avons suivi l'absorbance à ces deux longueurs d'ondes et à 280 nm pour suivre la protéine CopI.

Les cellules du wt sont cultivées en micro-aérobie en présence d'un excès de cuivre de 1,2 mM. Les cellules sont lysées par deux passages à la presse de French. L'échantillon subit par la suite une ultracentrifugation de 1h30 à 40000 rpm (Rotor 70Ti, Beckman Coulter L-100XP Ultracentrifugeuse) permettant ainsi la séparation des fractions soluble et

membranaire. La fraction soluble est alors précipitée au sulfate d'ammonium (SA). Deux précipitations successives au sulfate d'ammonium ont été réalisées, une première à 40% de SA permettant d'éliminer le maximum de protéines contaminantes puis une deuxième à 60% de SA entraînant la précipitation de CopI. Le culot de protéines de la précipitation à 60% de SA est resuspendu dans du tampon Tris/HCL 20 mM à pH 8 puis dialysé dans plusieurs bain dans le même tampon (Tris/HCL 20 mM à pH 8) pendant 2 h, 12 h et 2 h à 4°C. La fraction dialysée est alors purifiée sur différentes colonnes de chromatographie (DEAE, CM puis GF) afin d'isoler CopI.

Le choix du type de colonne d'échangeuse d'ions à utiliser a été déterminé en fonction du pI de CopI et du pH du tampon utilisé. La protéine CopI a un point isoélectrique de 6,82 et le tampon utilisé est à pH=8. Ainsi, la charge globale nette de CopI serait alors négative et devrait se fixer sur la colonne échangeuse d'anions DEAE chargée positivement. La colonne est préalablement équilibrée avec 10 volumes de colonne (cv) du tampon Tris/HCL 20 mM à pH 8 avec un débit de 2 mL/min. La fraction dialysée est ainsi chargée avec un débit d'injection de 1mL/min sur une colonne échangeuse d'anions DEAE (HiTrap DEAE FF (5 mL) de GE Healthcare). La colonne est lavée avec du tampon Tris/HCL 20 mM à pH 8 pour éliminer les protéines non retenues. L'élution est réalisée par un gradient linéaire de 0 à 0,5 M en NaCl sur 6 cv à un débit de 2 mL/min. Des fractions de 2,5 mL sont recueillies.

La fraction non retenue de la DEAE est dialysée dans du tampon HEPES 50 mM à pH 8 puis injectée sur une colonne échangeuse de cations (HiTrap CM FF (5 mL) de GE Healthcare à un débit de 1 mL/min). La colonne CM est préalablement équilibrée avec 10 cv du tampon HEPES 20 mM à pH 8 avec un débit de 2 mL/min. Après une étape de lavage, l'élution est réalisée avec un gradient de NaCl de 0 à 0,5 M sur 6 cv à un débit de 2 mL/min.

Les fractions d'élution de la CM contenant CopI (la bande colorée au bleu de coomassie d'environ 15 kDa) sont respectivement collectées puis concentrées (500 µL) avec le système Amicon Ultra-15- cut off de Millipore. La fraction concentrée (500 µL) est injectée sur une colonne de gel filtration (GF) de type Sephadex G-200 de GE Healthcare. La colonne GF est prééquilibrée avec 2 cv du tampon Tris/HCL 0,1 M 0,15 NaCl pH 8 avec un débit de 0,5 mL/min. Cette étape permet de séparer des protéines selon leur masse moléculaire. Le tampon de la GF est le Tris 0,1 M contenant 0,15 NaCl pH 8. Les fractions collectées de la GF d'un volume de 0,5mL sont analysées sur un gel dénaturant. Les bandes de 13, 15 et 17 kDa observées lors de l'analyse sur un gel coloré au bleu de coomassie des

fractions de la GF ont été analysées par spectrométrie de masse pour confirmer la présence de CopI et CopJ.

Calibration de la GF : La colonne de GF (Sephadex G-200 de GE Healthcare) a été calibrée à l'aide du kit GE Healthcare Low MW calibration kit contenant comme Standards des protéines de faible masse moléculaire : Aprotinine (6,5kDa), la ribonucléase A (13,7 kDa), anhydrase carbonique (29kDa), Ovalbumine (44kDa), Conalbumine (75kDa). Le Bleu dextran, un polymère d'ose, est utilisé afin de déterminer le volume d'élution (V_0) d'une molécule non retardée par le gel. L'Aprotinine, c'est le standard qui est totalement retardé et dont l'élution (V_T) aura lieu en dernier. La calibration de la GF avec le mélange des standards a été réalisée dans les mêmes conditions de chromatographie utilisées pour purifier CopI à savoir dans le tampon Tris/HCL 1 M avec 0,15 M NaCl pH 8.

II-6- Résultats supplémentaires

II-6.1- Les systèmes d'import du cuivre

Les études menées sur l'homéostasie du cuivre chez différents microorganismes portent majoritairement soit sur la caractérisation des systèmes d'efflux du cuivre (CusCBAF, CopA....) soit sur les protéines chaperonnes (CucA, CueP, CopG, CopH, CopZ, CzcE...) impliquées dans la tolérance au cuivre ou alors sur des chaperonnes (Cox11, Sco1...) impliquées dans la biogénèse des complexes respiratoires. Les systèmes d'import du cuivre semblent ne pas avoir bénéficié du même intérêt que les systèmes d'efflux et demeurent jusqu'à présent peu étudiés. Très peu de données sont donc disponibles sur les mécanismes d'entrée du cuivre chez les microorganismes. Des études menées chez *E. coli* suggèrent l'implication de systèmes non spécifiques dans l'entrée du cuivre. Chez la bactérie Gram⁺ *E. hirae*, l'ATPase CopA permet l'import du cuivre du milieu extracellulaire (Solioz and Stoyanov 2003 ; Solioz, Abicht et al. 2010). Finalement, chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 une ATPase de type PIB CtaA localisée dans la membrane interne est impliquée dans le transport du cuivre du périplasme vers le cytoplasme (Waldron, Tottey et al. 2007). Mis à part ces deux exemples de transporteurs spécifiques du cuivre, il a été suggéré que l'entrée du cuivre du milieu extracellulaire vers le périplasme se ferait par l'intermédiaire de protéines non spécifiques, notamment des porines de la membrane externe OmpC et OmpF (Li, Nikaido et al. 1997 ; Rensing and Grass 2003) chez *E. coli*.

L'utilisation de la méthode de la mutagenèse par transposition dans la souche sauvage au cours des recherches menées pour déterminer les gènes impliqués dans la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus*, nous a permis l'identification du système d'efflux du cuivre (l'ATPase CopA). La sensibilité de la souche *copA*⁻ au cuivre permet de mettre en place un crible simple et efficace pour essayer d'identifier des protéines impliquées dans l'import du cuivre chez ce modèle en utilisant la transposition.

II-6.1.1- Stratégie de la transposition par Tn5

Dans le but de chercher les mécanismes impliqués dans l'entrée du cuivre dans la cellule, j'ai utilisé le transposon Tn5 (kanamycine résistant) dans la souche *copA*⁻. Après la transposition, la souche transformée a été étalée sur des boîtes de milieu malate supplémenté en cuivre (120 µM de CuSO₄).

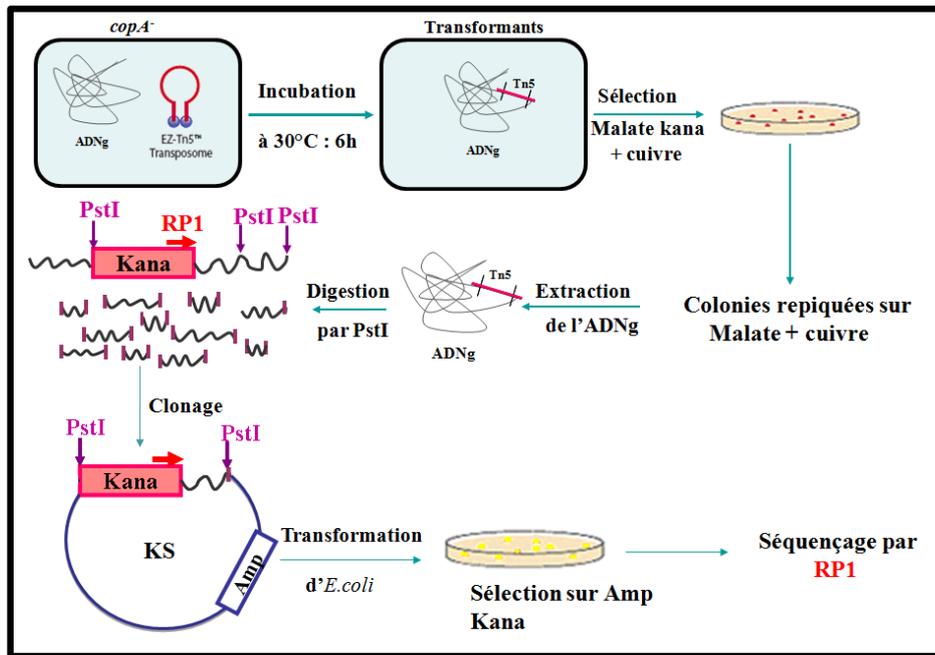


Figure 61 : Stratégie de la mutagenèse par le transposon au Tn5

Transformation par électroporation de la souche *copA*⁻ avec EZ-Tn5 Transposome (portant une résistance à la kanamycine), après incubation, les transformants sont étalés sur des boîtes solides de malate km contenant du cuivre. Les colonies qui apparaissent sont repiquées en milieu liquide en présence de cuivre afin de vérifier que les colonies ont bien acquis une tolérance au cuivre comparée au mutant *copA*⁻. Afin d'identifier les gènes inactivés par le transposon, une étape de clonage du gène inactivé est entreprise à partir de l'ADN génomique (ADNg) de ces souches. L'ADNg est alors digéré par l'enzyme de restriction PstI qui ne coupe qu'à une des deux extrémités du transposon. Le produit de digestion est ligué dans un plasmide portant une résistance à l'Ampicilline (KS) permettant ainsi de sélectionner, après transformation, les colonies d'*E. coli* Amp et Km résistants sur boîtes malate km et boîtes malate. Les plasmides extraits à partir de ces colonies sont séquencés avec l'amorce du transposon « RP1 » afin d'identifier le site d'insertion du transposon dans le génome de *R. gelatinosus*.

Nous avons utilisé comme critère de sélection la tolérance du cuivre acquise par le suppresseur comparé à la souche parentale (*copA*⁻) (Figure 62). Cette résistance résulterait de l'insertion du transposon dans un gène donné pouvant jouer un rôle direct ou indirect dans l'entrée du cuivre soit en favorisant son export dans cette souche.



Figure 62 : Sensibilité au cuivre des suppresseurs *scopA* comparée à la souche *copA*⁻.

Par le biais de cette stratégie, nous avons isolé une dizaine de colonies. Trois d'entre elles montraient une tolérance au cuivre après repiquage sur 120 μM de CuSO_4 . L'analyse de ces colonies (*copA:: Ω -lolB::Tn5*, *copA:: Ω -feoB::Tn5*, *copA:: Ω -NikB::Tn5*) a permis d'identifier les gènes *lolB*, *feoB* ou encore *nikB* comme potentiellement impliqués dans l'import du cuivre chez *R. gelatinosus*.

II-6.1.2-Le suppresseur *copA:: Ω -lolB::Tn5*

Dans le mutant *copA:: Ω lolB::Tn5*, le transposon a été localisé dans le gène *lolB*. Le gène *lolB* code pour une protéine du système Lol. Chez les bactéries Gram⁻, le système Lol est impliqué dans l'adressage des lipoprotéines vers la membrane externe. Ce système est composé de cinq protéines LolA, LolB, LolC, LolD et LolE (Figure 63) (Tokuda and Matsuyama 2004). La protéine LolB prend en charge l'insertion des lipoprotéines dans la membrane externe (Tsukahara, Mukaiyama et al. 2009).

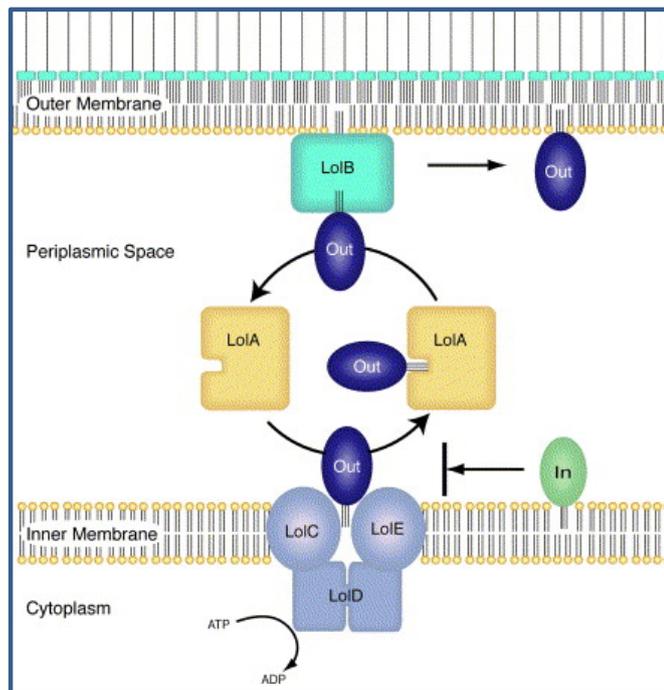


Figure 63 : Système LolABCDE impliqué dans l'adressage des lipoprotéines vers la membrane externe

Les lipoprotéines marquées par "In" désignent celles spécifiques de la membrane interne alors que celles annotées "Out" représentent les lipoprotéines spécifiques de membrane externe. Le transporteur ABC LolCDE identifie les lipoprotéines de la membrane externe et il les libère de la membrane interne. Au niveau du périplasma, elles sont prises en charge par LolA, causant la formation d'un complexe lipoprotéine/LolA. Ce transporteur périplasmique transfère la lipoprotéine au récepteur LolB de la membrane externe afin d'assurer son insertion dans la membrane externe (Narita and Tokuda 2006).

La résistance au cuivre acquise par le mutant *copA::Ω-lolB::Tn5* pourrait être expliquée par le fait que la fonction du système Lol soit altérée dans cette souche. Le dysfonctionnement du système Lol pourrait générer un défaut de mise en place dans la membrane externe d'au moins une lipoprotéine qui pourrait être impliquée dans l'entrée du cuivre. Il est également possible que la mutation de *lolB* ait un effet pléiotrope conduisant à une modification globale de la structure ou à la fluidité de la membrane externe. Ce changement au niveau de la membrane externe pourrait être à l'origine d'une tolérance au cuivre et autres métaux.

Il est intéressant de signaler qu'une étude transcriptomique réalisée en présence de cuivre chez *P. aeruginosa*, montre que l'expression de *lolB* est 4 fois réprimée en présence d'excès de cuivre (Teitzel, Geddie et al. 2006). Par ailleurs, il a été proposé que la lipoprotéine NlpE de la membrane externe chez *E. coli* serait impliquée dans la tolérance au cuivre (Gupta, Lee et al. 1995). Cependant, aucun homologue à NlpE n'a été identifié chez *R. gelatinosus*.

II-6.1.3-Le suppresseur *copA::Ω-feoB::Tn5*

Un second mutant isolé dans ce crible correspond à *copA::Ω-feoB::Tn5*. Le transposon a été localisé dans le gène *feoB*. La protéine FeoB fait partie du système FeoABC (Figure 64) qui transporte le fer ferreux Fe^{2+} dans des conditions d'anaérobiose (Cartron, Maddocks et al. 2006). En effet dans ces conditions, le fer ferreux est plus stable et plus soluble que le fer ferrique Fe^{3+} . Il diffuse librement par l'intermédiaire des porines de la membrane externe des bactéries. Une fois dans l'espace périplasmique, il est pris en charge par un transporteur de fer ferreux désigné Feo.

FeoB est une protéine de la membrane cytoplasmique avec au moins sept domaines transmembranaires, et fixe à son extrémité N-terminale du GTP. La protéine FeoA est nécessaire pour activer le transport du Fe^{2+} par FeoB. Il a été montré que FeoA interagit spécifiquement et directement avec FeoB (Kim, Lee et al. 2012). La troisième protéine FeoC n'est pas indispensable dans l'activité de FeoAB et le gène correspondant est souvent absent dans l'opéron de *feo* chez plusieurs bactéries.

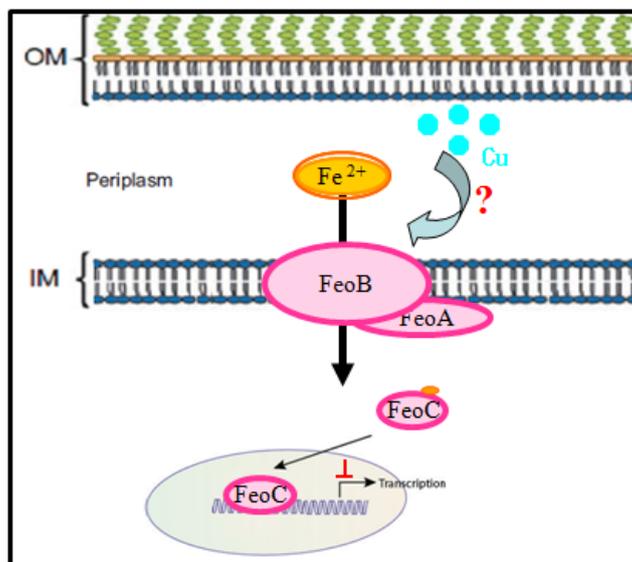


Figure 64 : Système FeoABC

Le Fe^{2+} diffuse à travers les porines de la membrane externe des bactéries. Au niveau du périplasm, le fer est pris en charge par le système FeoABC. FeoA active le transport du Fe^{2+} par FeoB. FeoC aurait un rôle de régulateur de l'expression de l'opéron Feo (Cartron, Maddocks et al. 2006).

La résistance acquise par le suppresseur *copA::Ω-FeoB::Tn5* pourrait être due au fait que le système Feo, en plus de son rôle dans le transport du fer, laisserait également passer le cuivre ou autres métaux. Par ailleurs, il est à noter également que chez *P. aeruginosa*, l'expression de *feoB* est réprimée en présence d'excès de cuivre (Teitzel, Geddie et al. 2006).

D'une manière intéressante, un des deux gènes annotés *feoB* dans le génome de *Porphyromonas (P.) gingivalis* serait impliqué dans le transport du manganèse (Dashper, Butler et al. 2005). Finalement, une étude réalisée chez *Helicobacter (H.) mustelae* révèle que le transporteur ABC du fer FecDE transporte aussi le nickel et le cobalt (Stoof, Kuipers et al. 2010).

Ces résultats suggèrent que les systèmes de transport de fer pourraient transporter aussi d'autres métaux. Cette approche par transposition va dans le même sens que ces études et suggère que Feo pourrait permettre l'entrée du cuivre dans la cellule.

Le gène *feoB* a été identifié deux fois dans deux transpositions indépendantes, ce qui conforte l'hypothèse que le système Feo puisse être impliqué dans le transport du cuivre.

II-6.1.4-Le suppresseur *copA::Ω-nikB::Tn5*

Dans ce suppresseur, le transposon s'est inséré dans le gène *NikB* codant pour une protéine d'un système putatif de transport de type ABC du nickel (Eitinger and Mandrand-

Berthelot 2000). Chez *E.coli*, ce système est composé de cinq protéines NikA, NikB, NikC, NikD et NikE (Figure 65). Il serait impliqué dans le transport du Ni^{2+} du périplasma au cytoplasme en anaérobie (Dosanjh and Michel 2006). La protéine NikA constitue la partie périplasmique du système de transport. NikB et NikC sont deux protéines hydrophobes associées à la membrane interne, composées de six hélices transmembranaires chacune. Elles formeraient un pore permettant le passage du nickel vers l'intérieur des cellules. Enfin, NikD et NikE sont deux protéines cytoplasmiques associées à la membrane. Ces dernières sont impliquées dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, apportant ainsi l'énergie indispensable au transport. Le nickel pris en charge au niveau du périplasma par ce système pourrait rentrer dans la cellule *via* des porines. La résistance au cuivre acquise par le suppresseur *copA::\Omega-nikB::Tn5* suggère que le système NikABCDE pourrait aussi transporter du cuivre.

Il a été rapporté que la chaperonne de nickel NikA serait également capable de lier le cuivre avec une affinité 10 fois plus faible comparée à celle du Ni^{2+} (de Pina, Navarro et al. 1995).

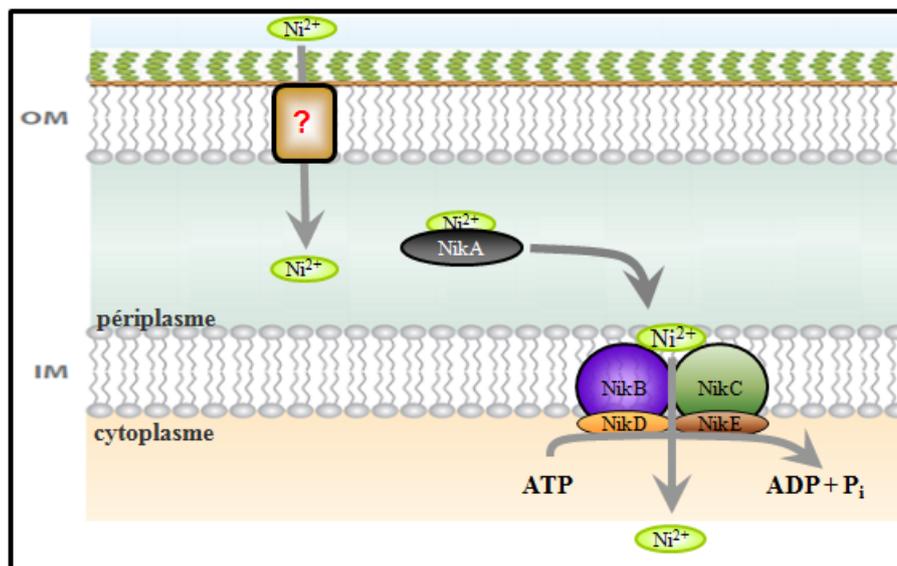


Figure 65 : Système de transport du nickel de type ABC

Le nickel rentrerait dans la cellule probablement à travers les porines de la membrane externe. La protéine périplasmique NikA prend ainsi en charge le nickel au niveau du périplasma. Les protéines membranaires NikB et NikC permettraient le passage du nickel vers le cytoplasme. Les protéines cytoplasmiques NikD et NikE associées à la membrane sont impliquées dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, apportant ainsi l'énergie indispensable au transport (Eitinger and Mandrand-Berthelot 2000).

II-6.2-Discussion

La mutagénèse par transposition n'a pas permis l'identification de transporteur spécifique du cuivre chez *R. gelatinosus*. En revanche, elle a permis d'identifier les systèmes d'import du fer (Feo) et du nickel (Nik) comme potentiellement capable de laisser rentrer du cuivre du milieu extérieur. Les résultats suggèrent que ces systèmes d'imports du fer et du nickel participeraient de façon minoritaire à l'import du cuivre. En effet, la tolérance au cuivre acquise par les mutants *copA::Ω-feoB::Tn5* et *copA::Ω-nikB::Tn5* (120 μM) est très faible. Ces mutants ne poussent pas au-delà de cette concentration. Ceci peut indiquer que le cuivre peut diffuser et rentrer dans la cellule par plusieurs systèmes de transport non spécifiques. L'inactivation d'un seul gène n'engendrerait donc qu'une faible amélioration de croissance en présence de cuivre. Par ailleurs, dans une autre étude réalisée au laboratoire, il a été suggéré que la maltoporine (porine de la membrane externe impliquée dans le transport du maltose) peut également laisser passer le cuivre. Ces données sont en faveur d'une hypothèse dans laquelle le cuivre diffuserait par différentes porines et transporteurs de la membrane comme il a été proposé chez *E. coli* notamment (Li, Nikaido et al. 1997 ; Rensing and Grass 2003).

Ces preuves génétiques restent à confirmer d'une part en inactivant ces gènes dans un fond génétique *copA⁻* et d'autre part par une approche biochimique pour montrer que ces transporteurs laissent effectivement passer le cuivre.

Concernant le mutant *lolB⁻*, il est probable que la résistance acquise soit liée à un changement de l'intégrité de la membrane plutôt qu'à l'activité d'un transporteur spécifique au cuivre. Pour savoir si la résistance acquise par ce suppresseur *copA::Ω-lolB::Tn5*, est limitée au cuivre ou s'il s'agit d'une résistance générale aux métaux, nous avons testé la croissance de ce suppresseur en présence de concentrations croissantes en divers métaux comme le nickel, le cobalt, le cadmium ou le zinc sur des milieux solides en aérobie et en anaérobie. Les résultats préliminaires montrent que le mutant *copA::Ω-lolB::Tn5* présente une tolérance au cobalt (à 1mM) plus importante que celle du wt et du mutant *copA::Ω* seulement en aérobie. Ces expériences doivent être refaites dans un mutant *lolB⁻* et un double mutant *lolB⁻* dans lequel le système d'efflux de ce métal est inactivé toutefois ce dernier est inconnu chez *R. gelatinosus*. Cependant, cette approche peut être utilisée dans un mutant dépourvu du système d'efflux du cadmium *cadA⁻* qui est disponible au laboratoire.

Nous avons également sélectionné d'autres suppresseurs de *copA* où le transposon s'est inséré au niveau du gène qui code pour une putative déshydrogénase et au niveau de trois gènes qui codent pour des protéines solubles conservées de fonctions inconnues. Cependant le rôle des produits de ces gènes dans l'import du cuivre reste à déterminer. Il faudrait générer des mutants pour chacun de ces gènes et tester leur phénotype par rapport à la résistance au cuivre comparé au wt.

Néanmoins, l'ensemble de ces résultats me permet de proposer un modèle d'entrée du cuivre chez *R. gelatinosus*. Du milieu extracellulaire le cuivre rentre dans la cellule par l'intermédiaire des porines notamment la maltoporine ou encore les porines Omp. Une fois dans le périplasme, le cuivre pourrait diffuser à travers le système Nik ou le système similaire Feo pour gagner le cytoplasme.

Chapitre II : la dénitrification

Caractérisation de la voie de dénitrification chez *Rubrivivax gelatinosus*

Les bactéries photosynthétiques pourpres sont très versatiles, et poussent sous diverses conditions en utilisant différentes sources de carbone et azote. En effet, en présence de lumière et en l'absence d'oxygène, elle effectue la photosynthèse et en présence d'oxygène, elles respirent. A l'obscurité et en anérobiose, certaines de ces bactéries peuvent induire d'autres types de réductases pour utiliser des accepteurs d'électrons alternatifs à l'O₂. C'est le cas de *R. capsulatus* et *R. sphaeroides* f. sp. *denitrificans* qui poussent avec du DMSO grâce à une DMSO réductase (Shaw, Hanson et al. 1996 ; Knablein, Mann et al. 1996) ou encore *R. sphaeroides* 2.4.3 qui pousse en présence de nitrate par le biais de la chaîne de dénitrification (Nar, Nir, Nor et Nos). Comme ces bactéries pourpres, *R. gelatinosus* a la capacité d'adapter rapidement son métabolisme énergétique en fonction des conditions environnementales. En absence d'O₂ et en présence de lumière, elle effectue la photosynthèse; en présence d'oxygène, elle respire produisant ainsi de l'énergie sous forme d'ATP. En photosynthèse, la bactérie met en place des complexes photosynthétiques, en respiration, elle met en place des oxydases terminales (*cbb₃* et *bd*) de la chaîne respiratoire.

Au début de ma thèse, mon projet de recherche consistait à identifier l'éventuelle présence d'un troisième métabolisme énergétique la respiration anaérobie *via* la dénitrification.

En effet, au cours des études menées au laboratoire sur le rôle du facteur d'assemblage CtpA (CcoI) (transporteur de cuivre) dans la biogenèse de l'oxydase *cbb₃* chez *R. gelatinosus* (Hassani, Astier et al. 2010), Bahia Khalfaoui a identifié la présence de la N₂O réductase dans les membranes de la souche sauvage. La N₂O réductase catalyse la dernière étape de dénitrification en réduisant l'oxyde nitreux (N₂O) en diazote (N₂) au niveau de sa sous-unité catalytique NosZ. En se basant sur l'homologie de séquence avec NosZ de *R. eutropha*, l'opéron *nos* de *R. gelatinosus* a été cloné et ce gène a été inactivé par Bahia Khalfaoui. L'inactivation de ce gène a permis de confirmer que la bande de haut poids moléculaire correspond à celle de la protéine NosZ. Ce résultat montre que *R. gelatinosus* pourrait réduire le N₂O en N₂ (Hassani, Astier et al. 2010).

Par ailleurs, il a été observé chez *R. gelatinosus* que la mise en place de NosZ dans les membranes de la souche sauvage n'est plus détectée dans des conditions de faible oxygénation contrairement aux membranes du mutant *fnrL* (non publié). Ces résultats laissent suggérer que l'expression de *nosZ* est probablement induite par le régulateur FnrL dans des

conditions limitées en oxygène (Thèse Bahia Khalfaoui). La présence de cette enzyme suggère que *R. gelatinosus* peut utiliser l'oxyde nitreux (N₂O) comme source d'azote. *R. gelatinosus* pourrait réaliser la dénitrification en présence du nitrate (NO₃), si elle possède et exprime les gènes codant pour l'ensemble des enzymes intervenant dans la voie de dénitrification.

La dénitrification est un processus bactérien de respiration alternatif. En situation d'anaérobie, certaines bactéries ont la capacité d'assurer leurs survies *via* ce processus. Elles remplacent l'oxygène absent par les nitrates qui servent d'accepteur final d'électrons. Cette voie métabolique fait intervenir un ensemble d'enzymes: la nitrate réductase (NAR), la nitrite réductase (NIRs), la NO réductase (NOR) et enfin la N₂O réductase (NOS) (Figure 66).

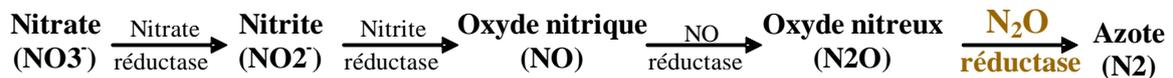


Figure 66 : La chaîne de dénitrification

Dans cette voie métabolique, le nitrate est réduit en azote gazeux. Ces enzymes contribuent au transport des électrons à travers la membrane et à la formation d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane cytoplasmique indispensable pour la production de l'ATP.

Au cours de ma 1^{ère} année de thèse je me suis intéressée à identifier, cloner et inactiver les différents gènes codant les enzymes qui pourraient intervenir dans la voie de dénitrification chez *R. gelatinosus* et chercher les conditions de croissance en anaérobie.

II-1-Identification des opérons codant les différentes enzymes impliquées dans la voie de dénitrification :

II-1.1-La nitrate réductase : Nap

Chez les bactéries dénitrifiantes, il existe deux types de nitrate réductase dissimilatrices. Une est connue en tant que nitrate réductase respiratoire (Nar) liée à la membrane et l'autre comme une nitrate réductase périplasmique (Nap). L'analyse du génome de *R. gelatinosus*

indique qu'aucun opéron homologue à celui de la Nar n'est présent mais confirme la présence de l'opéron Nap.

Au début de ces travaux, la séquence du génome de *R. gelatinosus* n'était pas encore disponible. En se basant donc sur l'homologie de séquence d'ADN génomique qui existent entre *R. gelatinosus* et la β -proteobactérie *L. cholodnii* SP-6, un couple d'amorce a été produit (napA-for1 et napA-rev1) pour la sous-unité catalytique (NapA) de la nitrate réductase périplasmique qui réduit le nitrate NO_3^- en nitrite NO_2^- . Afin d'identifier l'opéron qui code pour la nitrate réductase périplasmique, ces amorces ont été utilisées pour cribler la banque d'ADN génomique de *R. gelatinosus*, un plasmide pB164-50 contenant un insert d'environ 7,8 kb a été isolé de la banque et séquencé. L'opéron qui code pour Nap chez *R. gelatinosus* est représenté dans la Figure 67.

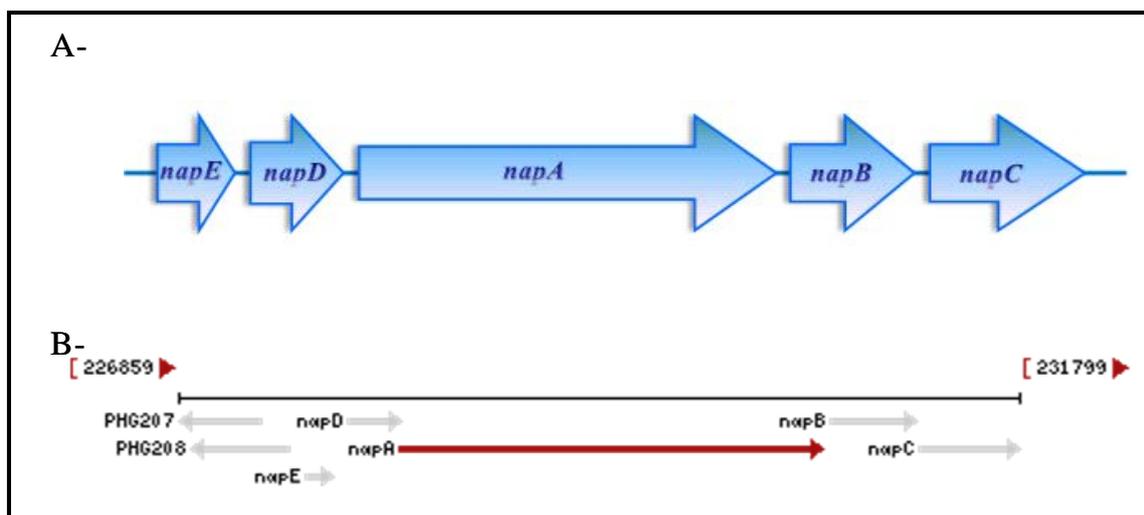


Figure 67 : Organisation de l'opéron du nitrate réductase périplasmique (*Nap*)

A- Opéron *Nap* de *R. gelatinosus* - B - Opéron *Nap* de *Ralstonia eutropha* H16

L'opéron de *nap* identifié chez *R. gelatinosus* comprend cinq gènes *napEDABC* (Figure 67A) contrairement à celui de *R. sphaeroides* DSM158 qui est constitué de sept gènes *napKEFDABC* (Gavira, Roldan et al. 2002). Cette organisation des gènes est homologue à celle trouvée dans l'opéron *nap* de *Ralstonia (R.) eutropha* H16 et de *L. cholodnii* SP-6 (Figure 67B).

Le plasmide de banque contient le gène *napE* qui code pour une petite protéine de 73 résidus. NapE possède une hélice transmembranaire, sa fonction est toujours inconnue mais il a été suggéré qu'elle serait associée dans la membrane à NapC pour faciliter la réduction des cytochromes de cette dernière à partir du pool de quinones membranaires (Reyes, Gavira et al. 1998). Une similitude élevée a été trouvée entre *napE* de *R. gelatinosus* et la protéine correspondante NapE d'*Azoarcus* sp BH72 (identité de 73%) et de *R. eutropha* H16 (identité de 62%).

En aval de *napE*, on trouve le gène qui code pour la protéine NapD prédite soluble même si elle ne présente pas de peptide signal en extrémité N-terminal. La fonction de NapD est inconnue mais il a été suggéré chez *Thiosphaera (T.) pantotropha* qu'elle aurait un rôle dans l'assemblage et la formation d'un complexe enzymatique NapAB mature (Berks, Richardson et al. 1995 ; Simpson, Richardson et al. 2010).

Le gène *napA* code pour la sous-unité catalytique où a lieu la réduction du nitrate en nitrite. Elle est soluble, constituée de 871 résidus. Elle présente une forte homologie avec la protéine NapA d'*Azoarcus* sp BH72 (identité de 80%), de *R. eutropha* H16 (identité de 71%) et de *L. cholodnii* SP-6 (identité de 69%). En extrémité N-terminal, on trouve un motif de quatre cystéines impliqué dans la fixation d'un cluster [4Fe-4S]. L'analyse de la séquence de NapA indique que cette protéine contient du molybdoptérine-guanine dinucléotide (MGD) comme cofacteur. Par homologie de séquence avec NapA de *T. pantotropha* et de *Shewanella*, ce cofacteur serait lié à la protéine par la cystéine à la position 211 dans la séquence NapA de *R. gelatinosus* (Berks, Richardson et al. 1995 ; Simpson, Richardson et al. 2010). Une séquence signal en N-terminal exceptionnellement longue (49 résidus) présentant un motif à deux arginines « TAT » (aux positions 35 et 36) est identifiée dans la structure primaire de NapA de *R. gelatinosus*. Ce motif pourrait être impliqué dans l'exportation du complexe Nap en conformation repliée dans le périplasme (Morozkina and Zvyagilskaya 2007 ; Moreno-Vivian, Cabello et al. 1999).

En aval du gène *napA*, il y a le gène *napB* qui code pour une protéine soluble présentant dans son extrémité N-terminale un peptide signal nécessaire pour son export à travers la membrane interne *via* le système Sec. Elle contient deux hèmes de type *c* fixés sur le motif CXXCH (C₇₆XXC₈₀H₈₁-X_n-C₁₁₇XXC₁₂₀H₁₂₁). La sous-unité NapB est impliquée dans

le transfert d'électrons à la molybdoptérine. Elle présente une forte similitude avec les protéines correspondantes de NapB de *R. eutropha* H16 (identité de 59%), de *L. cholodnii* SP-6 (identité de 57%) et d'*Azoarcus* sp BH72 (identité de 47%).

La dernière sous-unité NapC est une protéine membranaire contenant une hélice transmembranaire. Elle appartient à la famille des protéines périplasmiques à cytochrome *c* tétrahémique NapC/NirT. Elle est codée par le gène *napC* localisé en aval de *napB*, et est constituée de 193 résidus. Elle contient quatre motifs CXXCH ($C_{52}XXC_{55}H_{56}-X_n-C_{82}XXC_{85}H_{86}-X_n-C_{142}XXC_{145}H_{146}-X_n-C_{175}XXC_{178}H_{179}$) qui lient quatre hèmes de type *c*. Elle fonctionne dans le transfert d'électrons entre le pool de quinones et la nitrate réductase périplasmique. La protéine NapC serait le donneur direct d'électrons à NapAB. Une forte homologie est constatée entre NapC de *R. gelatinosus* et celle de *R. eutropha* H16 (identité de 77%), d'*Azoarcus* sp BH72 (identité de 77%) et de *L. cholodnii* SP-6 (identité de 56%).

Afin de générer un mutant de la nitrate réductase périplasmique chez *R. gelatinosus*, un fragment de 1,4 kb du gène NapA a été cloné par PCR à l'aide des amorces *napA-F1* et *napA-R1* dans le plasmide pDrive (pNapA1) pour inactiver ce gène par insertion de cassettes de résistance aux antibiotiques (Tp/ Ω) au niveau d'un site de restriction unique (BglIII) (Figure 68A) obtenant ainsi les plasmides pNapA2(Tp) et pNapA3(Ω). La construction du plasmide pNapA2 (Figure 68B) a été vérifiée par séquençage mais aussi par digestion enzymatique en utilisant comme témoin négatif le plasmide pNapA1.

Les profils de digestion par EcoRI et KpnI des plasmides pNapA2(Tp) et pNapA1 (utilisé comme témoin) ont été comparés. Pour le produit de digestion par EcoRI pour le plasmide pNapA2(Tp) on s'attend à deux bandes de 3,8 Kb et 2 Kb alors qu'avec le témoin pNapA1 nous attendons deux bandes de 3,8 Kb et 1,4 Kb. Pour la digestion par KpnI, nous aurons avec pNapA2(Tp), trois bandes de 4,5 Kb, 0,8 Kb et 0,6 Kb et avec pNapA1 une bande de 5 Kb (Figure 68C). Les résultats de digestions confirment que la construction du plasmide pNapA2(Tp) est correcte.

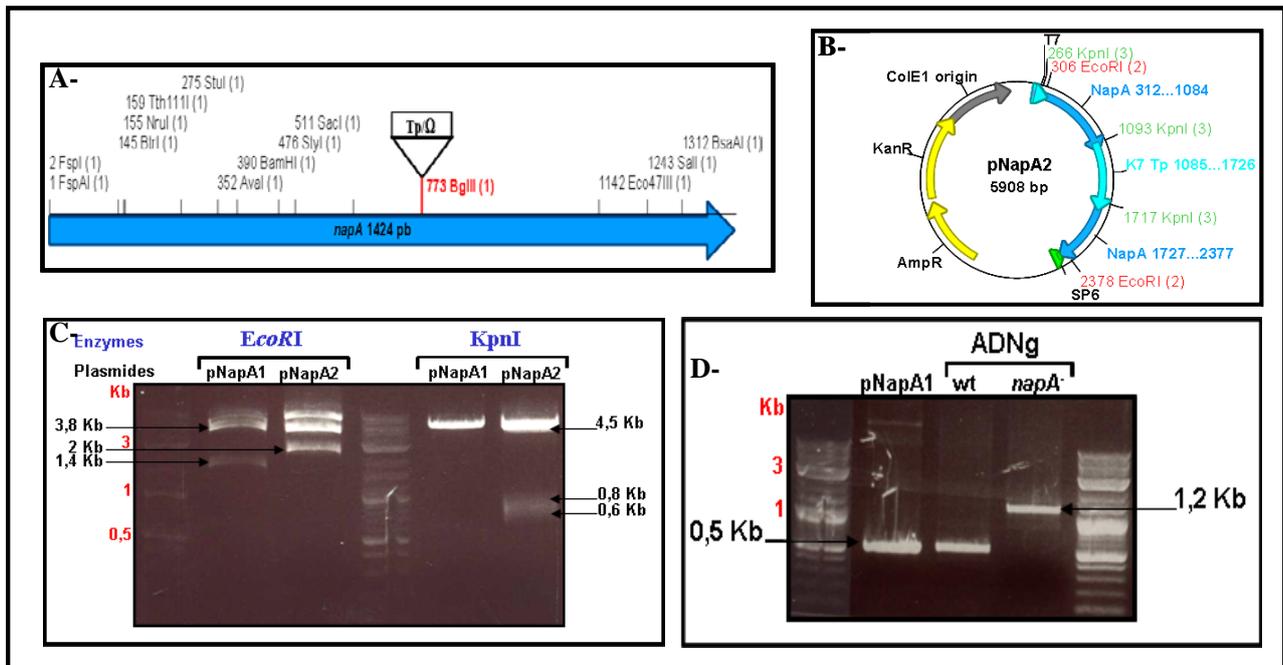


Figure 68 : Etapes de clonage et d'inactivation du gène *napA*.

A- Clonage par PCR d'un fragment de 1424 pb du gène *napA* et inactivation du gène par insertion du marqueur de résistance à la Tp au niveau du site BglIII –B- Carte du plasmide pNapA2(Tp) –C- Profil de digestion des plasmides pNapA1(Tp) et pNapA2(Tp) par EcoRI et KpnI. –D- Profil d'amplification par PCR sur la souche sauvage et mutante *napA::Tp*.

Afin d'inactiver le gène *napA*, la souche sauvage de *R. gelatinosus* a été transformée par électroporation avec le plasmide intégratif pNapA2(Tp). Les transformants ont été sélectionnés sur des boîtes de milieu malate contenant l'antibiotique Tp dans des conditions d'aérobie. Nous avons sélectionné les transformants ampicilline-sensibles dont le gène sauvage *napA* a été remplacé par le gène *napA* délété grâce à deux événements de recombinaisons. L'ADN génomique a été préparé à partir de ces souches ampicilline sensibles, Tp résistant (*napA::Tp*) afin de confirmer la présence du marqueur de résistance à la Tp par PCR comparé à la souche sauvage de *R. gelatinosus*. Le produit d'amplification attendu à partir du sauvage est de 0,5 Kb alors que chez le mutant *napA::Tp* est de 1,2 Kb. Les résultats obtenus par PCR indiquent que le gène de résistance à la Tp s'est bien inséré au niveau du gène *napA* (Figure 68D). Ce mutant ne présentait aucun phénotype particulier en milieu malate aussi bien en photosynthèse qu'en respiration.

II-1.2-Les nitrites réductases :

II-1.2.1-La nitrite réductase dissimilatrice: *cd₁* NIR

La deuxième enzyme qui catalyse la réduction du nitrite en monoxyde d'azote (NO) ou en ammonium NH_4^+ et eau est la nitrite réductase (NIRs). Il existe deux types de nitrite réductases structurellement différentes ; la *cd₁* NIR et la Cu NIR qui catalysent la réduction du nitrite en NO. Chez *R. gelatinosus*, le gène codant la sous-unité NirS de la nitrite réductase du type *cd₁* -NIR a pu être cloné par homologie avec la souche japonaise IL144 de *R. gelatinosus*. Des amorces (nirS-F1 et nirS-R1) ont été générées à partir de la séquence génomique *nirS* de cette souche puis utilisées pour cribler la banque d'ADN génomique de *R. gelatinosus*. Un plasmide pB36-81 contenant un insert d'environ 6 kb a été isolé de la banque et séquencé. L'opéron qui code pour la *cd₁*-NIR est constitué de onze gènes *nirESMCFDLGHJN* (Figure 69). Ce cluster présente une hétérogénéité au niveau de l'organisation, de la composition et du nombre de gènes selon les espèces dénitrifiantes. Il contient des gènes de structure pour le cytochrome *cd₁* et les composants de la nitrite réductase respiratoire mais aussi les gènes requis pour la biosynthèse de l'hème *d₁*. Il est bien caractérisé chez les bactéries dénitrifiantes comme *P. denitrificans* (*nirXISECFDLGHJN*) (de Boer, Reijnders et al. 1994) *P. aeruginosa* (*nirSMCFDLGHJEN*) (Kawasaki, Arai et al. 1997), et *Pseudomonas sutzeri* (*nirSTBMCFDLGH* et *nirJEN*).



Figure 69 : Organisation de l'opéron de la nitrite réductase (*cd₁Nir*) de *R. gelatinosus*.

Le premier gène du cluster *nirE* a probablement une fonction dans la voie de biosynthèse de l'hème *d₁*. Contrairement à *P. denitrificans*, le gène *nirE* est localisé en amont du gène *nirS*. Il code pour une protéine soluble (272 résidus) et présente une similitude élevée avec l'uroporphyrinogène III C-méthyltransférase impliquée dans la voie de biosynthèse des tétrapyrrols. La protéine NirE de *R. gelatinosus* présente une forte homologie avec la protéine correspondante de la souche japonaise IL144 de *R. gelatinosus* (96% d'identité) et de *L. cholodnii* SP-6 (identité de 76%).

La cd_1 -NIR est codée par le gène *nirS*. C'est une protéine soluble périplasmique de 557 résidus présentant un peptide signal en N-terminal. Elle est constituée d'un homodimère, chaque monomère comprend en N-terminal un petit domaine liant un hème de type *c* et un large domaine fixant un hème de type d_1 . Les électrons sont transférés d'un donneur d'électrons *via* l'hème *c* de NirS à l'hème d_1 où le nitrite lié est réduit en oxyde nitreux. NirS présente une forte homologie avec la protéine codée par *nirS* de la souche IL144 de *R. gelatinosus* (97% d'identité) et de *R. eutropha* H16 (69% d'identité).

Le gène *nirM* code pour un cytochrome c_{551} (9 kDa) soluble donneur d'électrons à NirS. Il présente une similitude de 96% avec NirM de la souche IL144 de *R. gelatinosus*. Le gène *nirC* code pour un cytochrome *c* monohémique périplasmique. NirC présente des identités avec les protéines correspondantes de la souche IL144 de *R. gelatinosus* (98%) et de *R. eutropha* H16 (58%).

En aval de *nirC*, on trouve les gènes *nirF*, *nirDL*, *nirG*, *nirH* et *nirJ* qui semblent avoir un rôle important dans la biosynthèse de l'hème d_1 . En effet, un mutant *nirF* ou *nirH* de *P. stutzeri* ne produit pas d'hème de type d_1 .

Enfin, le gène *nirN* code pour une protéine soluble (382 résidus) qui possède une similitude avec les protéines correspondantes de *R. gelatinosus* IL144 (96% d'identité) et de *R. eutropha* H16 (58% d'identité). Elle possède un motif conservé CXXCH de fixation d'un hème de type *c* et un large domaine fixant un hème de type d_1 . Des études menées chez *P. aeruginosa* montrent que NirN ne serait pas impliquée ni dans la biosynthèse de l'hème d_1 ni dans la dénitrification mais suggèrent qu'elle pourrait avoir un rôle dans la conservation de l'énergie dans le système de dénitrification (Kawasaki, Arai et al. 1997).

Pour inactiver le gène *nirS* chez *R. gelatinosus*, ce gène a été cloné à partir du plasmide pB36-81 en utilisant les amorces *nirS-F5* et *nirS-R1* permettant l'obtention du plasmide pNirS1. Le gène a été ensuite inactivé par insertion de cassettes de résistance à la Tp au niveau du site unique SphI dans la phase codante pour NirS (Figure 70A) pour donner le plasmide pNirS2 (Figure 70B).

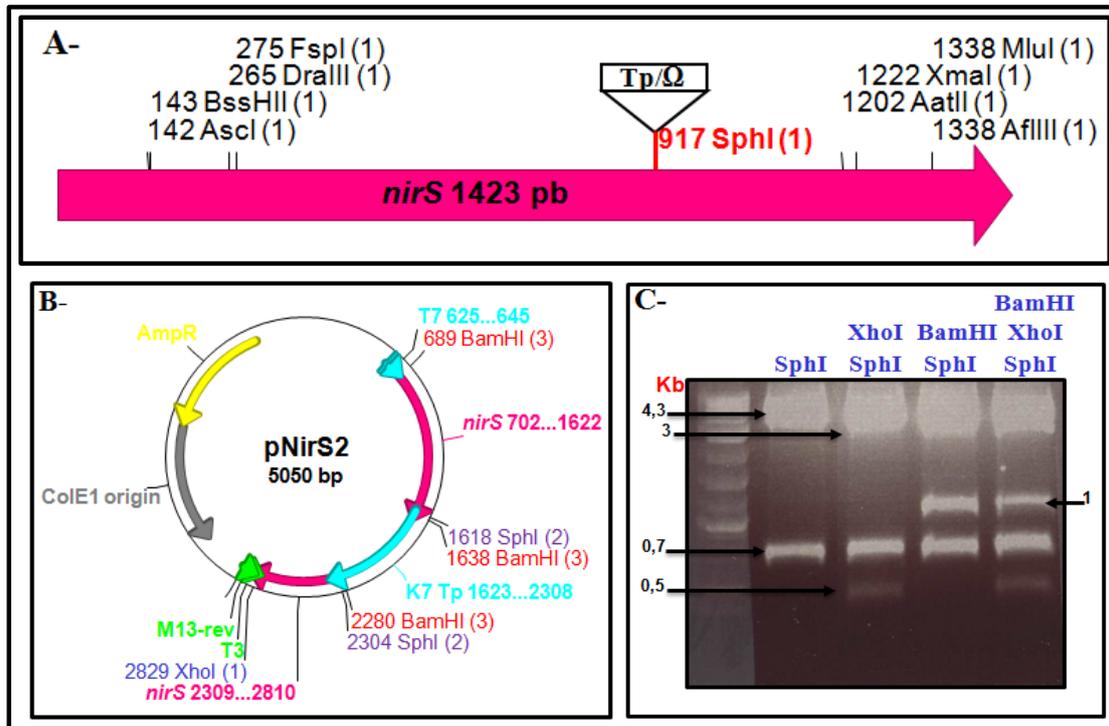


Figure 70 : Etapes de clonage et d'inactivation du gène *nirS*.

- **A-** clonage par PCR d'un fragment de 1423 pb du gène *nirS* et inactivation du gène par insertion du marqueur de résistance à la Tp au niveau du site SphI – **B** - Carte du plasmide pNirS2(Tp) – **C** - Profil de digestion des plasmides pNirS2(Tp) par SphI, XhoI/SphI, BamHI/SphI et BamHI/XhoI/SphI.

Comme précédemment, ce plasmide a été vérifié par séquençage et par digestion enzymatique en réalisant des simple, double et triple digestions. Les résultats de la digestion observée sur gel (Figure 70C) correspondent bien au profil attendu à savoir deux bandes de 4,3 et 0,5 Kb avec l'enzyme SphI, trois bandes de 3,8, 0,7 et 0,5 Kb par XhoI/SphI, trois fragments de 0,7 ; 1 et 3 Kb avec la digestion BamHI/SphI et enfin quatre bandes obtenues de 0,5 ; 0,7 ; 1 et 3 Kb par la triple digestion BamHI/XhoI/SphI. L'ensemble des résultats indiquent que la construction du plasmide pNirS2 est correcte.

Nous avons utilisé ce plasmide pour inactiver le gène *nirS* chez *R. gelatinosus* en transformant la souche sauvage par électroporation. Après incubation, nous avons sélectionné les transformants ampicilline-sensibles et Tp résistants qui auraient ainsi le gène sauvage de *nirS* inactivé par un gène de résistance à la Tp. Le mutant *nirS::Tp* a été également vérifié par PCR pour confirmer la présence du gène de résistance à la Tp au niveau du gène *nirS*. La souche *nirS::Tp* présente une croissance similaire à celle du sauvage en milieu malate aussi bien en photosynthèse qu'en respiration.

II-1.2.2- La nitrite réductase assimilatrice: NirB

Au cours de cette étude, la séquence du génome de *R. gelatinosus* a été obtenue suite au projet de séquençage effectué par le Génoscope. Nous avons pu identifier le reste des opérons impliqués dans la voie de dénitrification. Un deuxième opéron *nirBDC* qui code pour une nitrite réductase assimilatrice NAD(P)H dépendante a été ainsi identifié (Figure 71). Cet opéron est présent également chez *E. coli* K12, la nitrite réductase NirB est une enzyme cytoplasmique contenant un sirohème et qui utilise le NADH comme donneur d'électrons pour réduire le nitrite en ammonium (Peakman, Crouzet et al. 1990 ; Wang and Gunsalus 2000).

NirB est induite en anaérobie par FnrL en présence d'excès de nitrite dans le cytoplasme. Le rôle de NirB est de détoxifier le cytoplasme en nitrite et non de générer de l'énergie contrairement à la nitrite réductase NrfA formate dépendante (Page, Griffiths et al. 1990). Cette dernière représente la voie alternative de réduction du nitrite en ammonium chez *E. coli* induite en anaérobie en présence de faible quantité de nitrite dans le milieu (Wang and Gunsalus 2000).

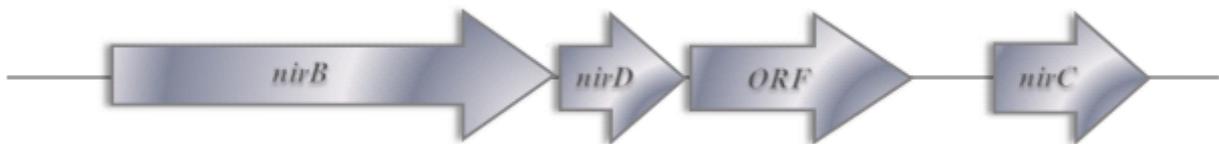


Figure 71 : Opéron *nirBDC* codant pour une nitrite réductase assimilatrice NAD(P)H dépendante chez *R. gelatinosus*

La protéine NirB de *R. gelatinosus* de 90 kDa présente une homologie de 59% avec sa correspondante d'*E. coli* K12. Elle montre également une similitude avec NirB de *L. cholodnii* SP-6 (77% d'identité), *Azoarcus* sp BH72 (74% d'identité) et 72% d'identité avec la grande sous-unité de la nitrite réductase assimilatrice NAD(P)H-dépendante « NasD » de *R. eutropha* H16.

Le gène *nirD* code pour la petite sous-unité de la nitrite réductase NAD(P)H dépendant contenant un domaine Rieske liant un cluster [2Fe-2S] et impliqué dans le transfert d'électrons ; dont la taille déduite de la séquence nucléotidique est de 12 kDa. Cette protéine montre une homologie avec les protéines correspondantes de NirD d'*E. coli* K12 (41%

d'identité), d'*Azoarcus* sp BH72 (55% d'identité), de *L. cholodnii* SP-6 (51% d'identité) et 57% avec la nitrite réductase NAD(P)H-dépendante « NasE » de *R. eutropha* H16.

L'analyse de la séquence de l'ORF localisée entre le gène *nirD* et *nirC* indique que le produit de ce gène serait un senseur du nitrate et du nitrite dans le milieu. Il s'agirait d'une protéine membranaire de 44 kDa présentant deux hélices transmembranaires et un large domaine « NIT » senseur du nitrate et du nitrite, ce domaine est présent chez diverses enzymes de transduction du signal de plusieurs espèces bactériennes. Le domaine NIT est notamment identifié dans la protéine NasR qui est un régulateur de l'expression des opérons qui codent pour la nitrate et la nitrite réductase assimilatrice (Shu, Ulrich et al. 2003 ; Boudes, Lazar et al. 2012).

Enfin, le gène *nirC* code pour une protéine membranaire de 29 kDa possédant sept hélices transmembranaires. Il s'agirait d'un transporteur de nitrite : son produit présente une homologie de 27% avec NirC de *S. typhimurium* LT2 et d'*E. coli* K12 (Rycovska, Hatahet et al. 2012 ; Jia, Tovell et al. 2009 ; Jia and Cole 2005).

Nous avons pu réaliser le clonage du gène codant la grande sous-unité *NirD* grâce à la séquence de l'ADN génomique de *R. gelatinosus* désormais disponible. Les amorces *nirD-F* et *nirD-R* ont été utilisées pour cloner le gène *nirD* dans le plasmide de clonage pDrive, le plasmide ainsi généré est annoté pNirD1. Le gène *nirD* a été inactivé en insérant la cassette Tp au niveau du site unique *StuI* localisé dans ce gène (Figure 72A). Le plasmide pNirD2 (Figure 72B) obtenu a été séquencé et digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* pour vérifier sa construction. Le profil de digestion de pNirD2 par *EcoRI* a été comparé à celui du plasmide pNirD1 utilisé comme témoin. La digestion par *EcoRI* permet d'extraire l'insert du plasmide, dans le cas de pNirD2 l'insert est de 2,2 Kb (contenant la cassette de 0,7 Kb) alors que pour pNirD1 la taille de l'insert est de 1,5 Kb avec une bande supplémentaire de 3,8 Kb correspondant à la taille du plasmide pDrive (Figure 72C). La digestion confirme ainsi que le plasmide a une construction correcte.

De la même manière, nous avons transformé la souche de *R. gelatinosus* et cherché parmi les transformants ceux qui sont ampicilline-sensibles et Tp-résistants. Ces transformants auront perdu le gène sauvage *nirD* et auraient acquis le gene inactivé par le marqueur de résistance à la Tp. Une PCR a été réalisée sur ces mutants pour vérifier

l'insertion du gène Tp au niveau du gène *nirD* comparé à la souche sauvage. Le produit amplifié attendu dans le wt a une taille de 1,5 Kb alors que dans le mutant *nirD::Tp*, la taille est de 2,2 Kb, les résultats observés sur gel correspondent bien à ceux prédits (Figure 72D).

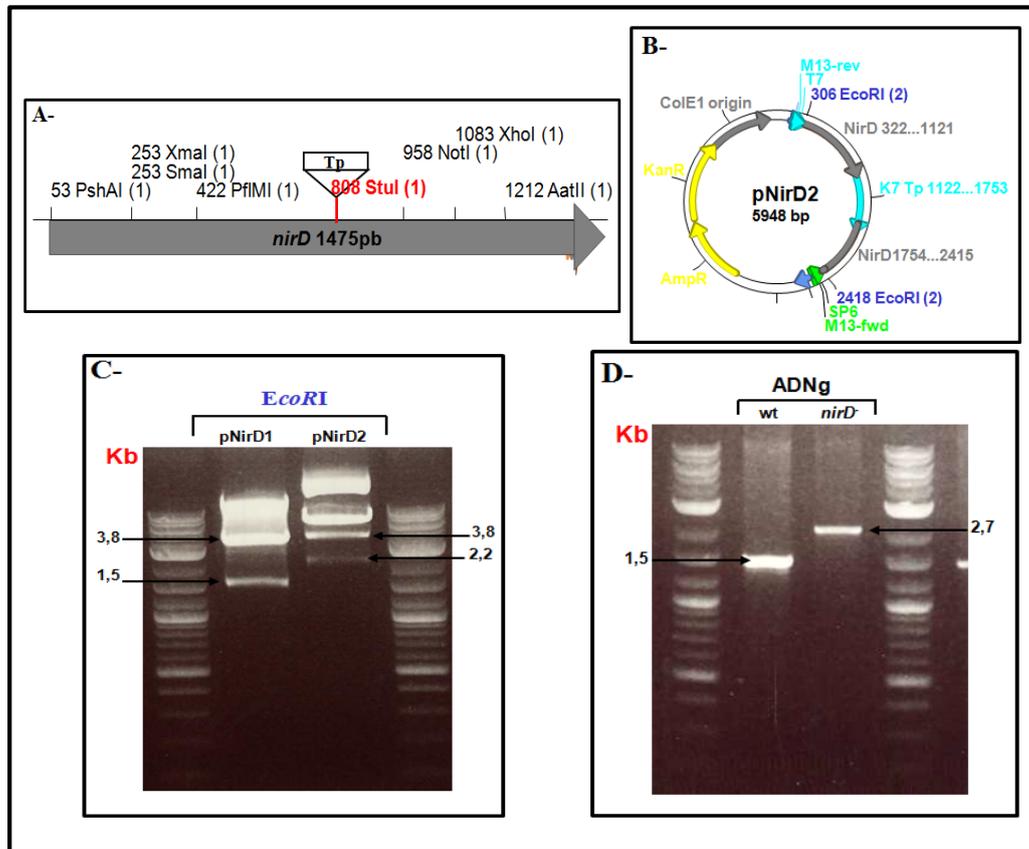


Figure 72 : Etapes de clonage et d'inactivation du gène *nirD*.

A - clonage par PCR d'un fragment de 1475 pb du gène *nirD* et inactivation du gène par insertion du marqueur de résistance à la Tp au niveau du site *StuI* – B - Carte du plasmide pNirD2(Tp) – C - Profil de digestion des plasmides pNirD1et pNirD2(Tp) par *EcoRI* – D - Profil d'amplification par PCR sur la souche sauvage et mutante *nirD::Tp*.

II-1.3- L'oxyde nitrique réductase : Nor

Le monoxyde d'azote NO est par la suite réduit en N₂O (oxyde nitreux) par l'enzyme NOR. Le gène codant la sous-unité catalytique NorB, où a lieu la réduction du NO en N₂O, a été identifié par la séquence d'ADN génomique annotée de *R. gelatinosus*. L'opéron codant pour l'oxyde nitrique réductase chez *R. gelatinosus* est constitué de deux gènes *norBC* (Figure 73) contrairement à celui de *P. denitrificans* qui est composé de six gènes *norCBQDEF* (de

Boer, van der Oost et al. 1996). L'opéron *norBC* est localisé en aval de l'opéron *cd₁-nir* à une distance de 39 Kb chez *R. gelatinosus*.



Figure 73 : Organisation de l'opéron de l'oxyde nitrique réductase (*Nor*) de *R. gelatinosus*.

Le gène *norB* code pour une protéine membranaire contenant 12 hélices transmembranaires. Elle présente une homologie avec la sous-unité I catalytique de la famille des oxydases type hème-cuivre *cbb₃*. Cependant, NorB fixe deux hèmes de type *b* et un atome de fer non-hémique Fe_B. Elle est composée de 475 résidus de masse moléculaire de 53 kDa. Elle présente une forte homologie avec la protéine correspondante NorB de *L. cholodnii SP-6* (identité de 88%) par contre elle est absente chez *R. eutropha* H16 et *Azoarcus* sp BH72.

Le gène *norC* code pour une petite sous-unité de 16 kDa. C'est une protéine membranaire présentant une hélice α transmembranaire. Elle contient un hème de type *c* lié de manière covalente par le motif CXXCH. Ce domaine hème *c* pourrait interagir avec des donneurs d'électrons comme les cytochromes périplasmiques ou l'azurine et ainsi fournir les électrons à NorB.

En amont des gènes *norBC*, on trouve le gène *nirQ* qui code pour une protéine soluble de 30 kDa. En extrémité N-terminale, elle présente un domaine AAA contenant un motif conservé (G₅₆X₄G₆₁K₆₂T₆₃) responsable de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP. NirQ est un régulateur anaérobie de la nitrate réductase et présente 59% d'identité avec NorQ de *P. denitrificans* et 65% d'identité avec NirQ de *P. aeruginosa* (de Boer, van der Oost et al. 1996 ; Schreiber, Krieger et al. 2007 ; Arai, Igarashi et al. 1995).

Un fragment du gène codant NorB (1460 pb) a été cloné en utilisant des amorces (*norB-F* et *norB-R*) (Figure 74A) déterminées à partir du génome de *R. gelatinosus* donnant ainsi le plasmide pNorB1. Après délétion d'un fragment de 500 pb suite à une double digestion SacII-NcoI et traitement avec le fragment de klenow pour générer des bouts francs, la cassette Tp a été insérée dans le gène *norB* (plasmide pNorB2) (Figure 74B). Le plasmide a

été digéré par des enzymes de restriction en utilisant le plasmide pNorB1 comme témoin. Ce plasmide a permis l'obtention du mutant *NorB* dont la construction a été vérifiée par PCR.

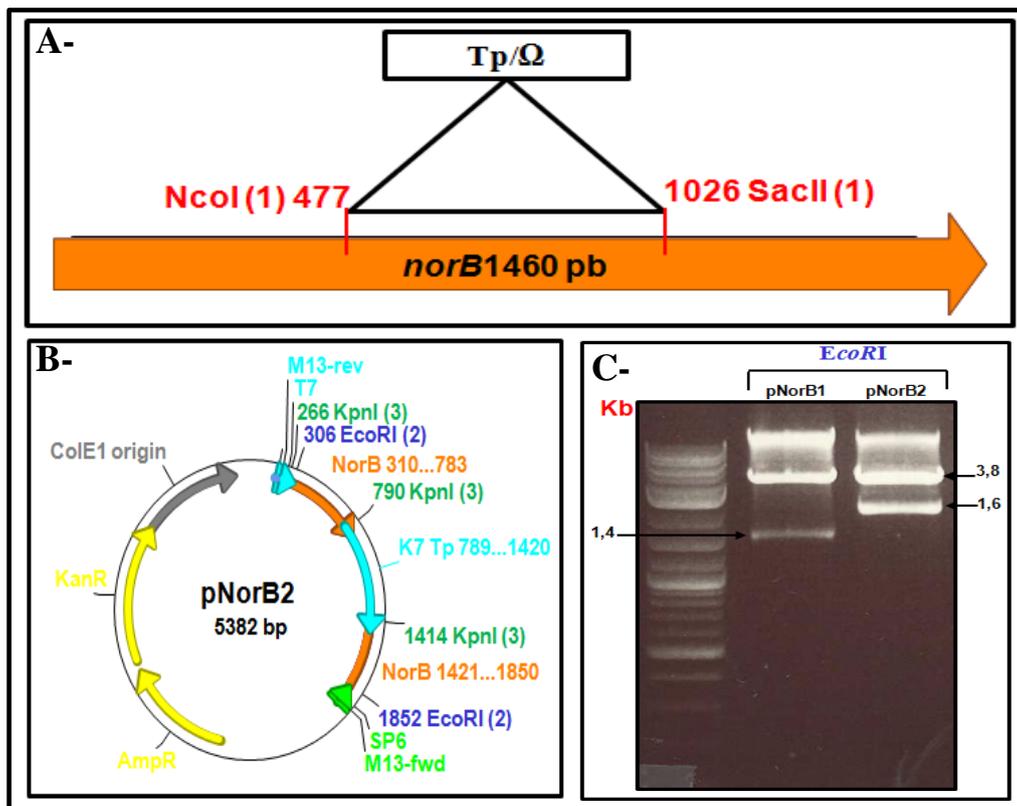


Figure 74 : Etapes de clonage et d'inactivation du gène *norB*.

A- clonage par PCR d'un fragment de 1460 pb du gène *norB* et inactivation du gène par insertion du marqueur de résistance à la *Tp* après délétion d'un fragment de 550 pb par digestion *NcoI*/*SacII* – B - Carte du plasmide *pNorB2*(*Tp*) – C - Profil de digestion des plasmides *pNorB1* et *pNorB2*(*Tp*) par *EcoRI*.

II-1.4- L'oxyde nitreux réductase : Nos

La dernière étape de dénitrification fait intervenir la N_2O réductase (NOS) pour réduire l'oxyde nitreux en diazote. L'opéron qui code pour la Nos a été identifié par Bahia Khalfaoui en se basant sur la séquence du gène *nosZ* de *R. eutropha* H16. L'opéron identifié présente une forte homologie au niveau de l'organisation, de composition en gènes et de séquences avec les bactéries *Ralstonia* et *L. cholodnii* SP-6. Le gène *nosR* code pour une protéine de type fer-soufre membranaire. *NosZ* est la sous-unité catalytique de la nitrous oxyde réductase, elle fait 69 kDa. Elle montre une similitude élevée avec les protéines

correspondantes de NosZ de *R.eutropha* H16 (84% d'identité) et de *L. cholodnii* SP-6 (81% d'identité). L'opéron contient également les gènes *nosD* et *nosF* qui coderaient pour deux sous-unités du transporteur ABC, NosDFY impliqué probablement dans la mise en place du soufre dans NosZ (centre CuZ). En amont du gène *nosZ* se trouve le gène *nosC* qui code pour une protéine impliquée dans le transfert d'électrons. Les gènes *nosY* et *nosL* sont situés en aval du gène *nosF*. NosL est une lipoprotéine de la membrane externe et présente une affinité élevée pour le Cu(I), cette protéine aurait le rôle de chaperonne à cuivre. Elle délivrerait le cuivre à la protéine NosZ (Zumft 1997).

Le mutant *NosZ* a été déjà construit au laboratoire par Bahia Khalfaoui.

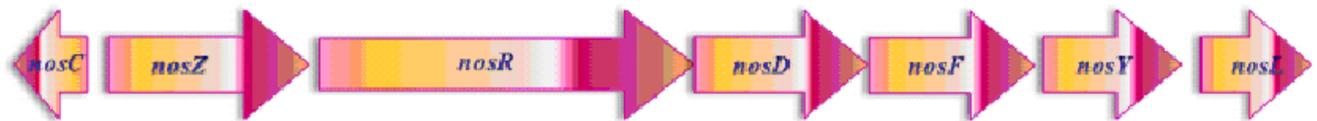


Figure 75 : Organisation de l'opéron de l'oxyde nitreux réductase (Nos) de *R. gelatinosus*

II-2- Résultats

Afin de caractériser la voie de dénitrification et d'étudier l'expression des différents opérons clonés au cours de cette étude, nous avons cherché à obtenir les conditions adéquates permettant la croissance en anaérobie obscurité *via* la dénitrification dans la souche sauvage. Dans ce but, nous avons cherché un milieu minimum ne permettant pas la croissance ni en photosynthèse ni en respiration aérobie, mais où la mise en place de la croissance par la dénitrification en microaérobie ou en anaérobie est conditionnée par l'addition d'une source d'azote (nitrate, nitrite, ammonium).

Dans ce but, le premier milieu à être testé est le basal medium (M-1) utilisé pour la croissance des bactéries photosynthétiques non sulfureuse. Ainsi, la souche sauvage de *R. gelatinosus* a été inoculée dans le milieu M-1 en absence et en présence de nitrate (KNO₃) ou nitrite (KNO₂) et incubée dans différentes conditions d'oxygénation (aérobie, microaérobie,

anaérobie photosynthèse, anaérobie obscurité). Cependant, aucune croissance n'a été observée même en respiration aérobie ou en photosynthèse. A la lumière de ces résultats, nous avons décidé de repartir sur le milieu malate, habituellement utilisé pour la mise en croissance au laboratoire de *R. gelatinosus*, en réalisant quelques modifications dans sa composition : en le déplaçant de toute source d'azote (sans Yeast extract, sans Casamino-acide, sans NH₄) (milieu annoté M-N-Y-C). De la même manière que dans le milieu M-1, des tests de croissance pour la souche sauvage ont été réalisés avec et sans nitrate et nitrite en aérobie, microaérobie, anaérobie lumière/obscurité. Après incubation dans ces différentes conditions, une légère croissance en photosynthèse en présence de nitrate a été perçue.

D'après différentes études réalisées chez diverses bactéries, la mise en place de la dénitrification peut dépendre de la source de carbone présente dans le milieu notamment le formate. Il est à noter que l'analyse du génome de *R. gelatinosus* révèle notamment la présence de deux formates déshydrogénases localisées dans la membrane interne. Dans ce contexte, nous avons remplacé le malate par le formate comme source de carbone en gardant la composition du milieu (M-N-Y-C) précédemment utilisé. Ce milieu a été testé en présence de nitrate, nitrite et ammonium sous différentes conditions d'oxygénation. Cependant, aucune croissance n'a été observée quelque soient les conditions.

Devant la difficulté d'obtenir un milieu de culture minimum adéquat permettant l'observation d'une croissance en microaérobie ou anaérobie obscurité conditionné par la présence d'une source d'azote, l'analyse des différents mutants (*NapA*⁻, *NirS*⁻, *NirB*⁻, *NorB*⁻ et *NosZ*) dans la dénitrification n'a pas pu être effectuée. Il est à noter que ces mutants ne présentent aucun phénotype particulier en photosynthèse ou en respiration aérobie comparé au wt dans le milieu standard utilisé (le malate). Nous n'avons pas encore assigné une fonction à ces enzymes.

II-3- Discussion

Les approches utilisées au cours de ces recherches n'ont pas permis la caractérisation des conditions adéquates permettant la croissance *via* la dénitrification mais des mutants pour chacune des enzymes de cette voie ont été obtenus. En conséquence, il faudrait poursuivre cette étude en exploitant les mutants (*NapA*⁻, *NirS*⁻, *NirB*⁻, *NorB*⁻ et *NosZ*) construits en

réalisant un western blot sur le sauvage comparé à ces mutants en utilisant des anticorps spécifiques à chaque enzyme. Cette expérience révélera si ces protéines s'expriment ou non car la présence des opérons codant pour ces différentes enzymes de la voie de dénitrification ne signifie pas que ces protéines s'expriment. De la même façon, il serait intéressant d'étudier l'expression des gènes codant pour ces différentes réductases par RT-PCR dans la souche wt et dans ces mutants sous différentes conditions d'oxygénation. Cette méthode peut nous permettre de décerner à quelles conditions d'oxygénation ces enzymes s'expriment le plus.

Par ailleurs, il est possible que ces enzymes soient mutées et qu'elles ne soient plus actives et fonctionnelles pour assurer la croissance *via* la dénitrification. Des tests d'activité sur gel natif sur ces mutants et la souche sauvage, nous permettront de savoir si ces enzymes s'expriment et surtout si elles sont actives. De plus, la sous-unité NorC ainsi que la nitrite réductase NirS contiennent du cytochrome de type *c*, ce type de cytochrome a une activité peroxydase et peut être visualisé en présence de substrat tel que le 3,3', 5,5'- tétraméthylbenzidine (TMBZ). Nous pouvons ainsi analyser la présence de ces cytochromes *c* de la *cd1-Nir* et de la *Nor* en comparant entre la souche sauvage et les mutants *NirS* et *NorB* par coloration au TMBZ après séparation des protéines sur un gel SDS.

Il est également possible que *R. gelatinosus* n'effectue pas la dénitrification même si ces enzymes sont exprimées et fonctionnelles. En effet, selon la littérature, chez les bactéries dénitrifiantes comme *E. coli*, le transporteur soluble d'électrons entre les différents complexes impliqués dans la dénitrification est la ménaquinone plutôt que l'ubiquinone. Il semble que *R. gelatinosus* n'a pas de ménaquinone, ce qui pourrait expliquer l'incapacité de notre bactérie à effectuer la dénitrification. Il pourrait également s'agir d'un problème de donneur d'électrons inadéquat, même si chez *E. coli* le formate est l'un des donneurs d'électrons nécessaire pour la mise en place de la dénitrification (Abou-Jaoude, Pascal et al. 1979).

Nous pouvons aussi suggérer que l'absence de la nitrate réductase respiratoire Nar chez *R. gelatinosus* représente un obstacle pour effectuer la respiration anaérobie *via* la dénitrification. Cependant, il a été montré chez certaines bactéries comme *E. coli*, *R. sphaeroides f. sp. denitrificans* ou encore chez *B. japonicum* que la nitrate réductase périplasmique (Nap) remplace la Nar et qu'elle est même importante pour la respiration anaérobie en présence de nitrate (Stewart, Lu et al. 2002 ; Delgado, Bonnard et al. 2003 ; Liu, Takio et al. 1999). Nap participerait indirectement à la respiration du nitrate, elle participerait

à la chaîne de transport d'électrons en s'associant à une enzyme de translocation de protons comme la NADH déshydrogénase ou encore la FDH-N déshydrogénase.

Devant la difficulté de trouver le milieu de culture adéquat pour l'expression de cette voie, cette partie de mon projet de recherche a été abandonnée.

Discussion générale et perspective

La majorité des microorganismes s'adaptent à leur environnement en fonction de différents paramètres telle que la salinité, le pH ou encore selon les sources d'énergie et de nutriments en oxygène, carbone, azote, métaux.... En effet, les bactéries ont la capacité de croître dans divers milieux suivant la disponibilité de ces substrats en mettant en place des métabolismes énergétiques adéquats. A titre d'exemple, en présence d'oxygène, *E. coli* effectue la respiration aérobie alors qu'en anaérobie en présence de nitrate ou de DMSO, elle met en place la nitrate réductase ou la DMSO réductase pour pouvoir produire l'ATP *via* la respiration anaérobie. Les protéobactéries photosynthétiques ont aussi la capacité de s'adapter rapidement aux variations environnementales. En présence de lumière et en absence d'oxygène, elles puisent leur énergie grâce à la chaîne photosynthétique. En présence d'oxygène, elles utilisent la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP alors qu'en présence de substrat comme le nitrate, elles mettent en place la respiration anaérobie quand l'oxygène n'est plus disponible. Ces voies bioénergétiques reposent sur l'activité de complexes énergétiques variés (complexes photosynthétiques et respiratoires). L'assemblage et l'activité de ces complexes nécessitent la disponibilité d'au moins trois métaux : le magnésium, le fer et le cuivre. Le fer et le magnésium sont essentiels pour la biosynthèse des porphyrines, hèmes et bactériochlorophylles, cofacteurs des différents cytochromes et complexes photosynthétiques. Dans la chaîne respiratoire aérobie, le besoin en cuivre est restreint à l'assemblage et l'activité des oxydases terminales, soit les cytochromes *c* oxydases soit les quinols oxydases. Il est aussi requis dans la chaîne respiratoire anaérobie puisqu'il est le cofacteur de la nitrite réductase et de la N₂O réductase.

Les bactéries s'approvisionnent en ces métaux à partir de leur environnement grâce à des systèmes d'import spécifiques ou pas, identifiés et caractérisés chez plusieurs bactéries. Les études menées sur le magnésium indiquent la présence de systèmes d'imports spécifiques (MgtA/B, MgtE et CorA). Ces systèmes d'import sont régulés selon les besoins des cellules en Mg²⁺, par le système à double composantes PhoP/PhoQ (Maguire and Cowan 2002). Ce métal n'est pas très toxique et la concentration intracellulaire peut atteindre 15 à 25 mM selon les espèces. Par ailleurs aucun système d'efflux de Mg²⁺ n'a été identifié, de toute évidence les cellules n'ont pas besoin de chasser le Mg²⁺.

Concernant le fer, les bactéries doivent synthétiser et sécréter des chélateurs ferriques appelés sidérophores, qui une fois chargé en fer, sont transportés à travers les membranes

grâce à des systèmes spécifiques (FecA/FecB, FhuA/ FhuB,..) (Andrews, Robinson et al. 2003). De la même manière que le Mg^{2+} , aucun système d'efflux du fer n'est identifié et les systèmes d'import sont rigoureusement contrôlés selon les besoins en fer. Les bactéries gèrent ainsi le niveau cellulaire du Fe et du Mg^{2+} en contrôlant leur import.

I-Les systèmes de transport du cuivre

Les besoins des bactéries en cuivre sont relativement limités comparées au fer et au magnésium. En effet, on le trouve principalement dans quelques protéines membranaires. Le cuivre est en revanche très toxique lorsqu'il est en excès. Très peu de données sont disponibles sur les systèmes d'import de ce métal chez les bactéries. Des études réalisées chez *E. coli* ainsi que l'approche de la mutagenèse par transposition effectuées chez *R. gelatinosus* indiquent que l'entrée du cuivre dans la cellule se ferait probablement de manière non spécifique. En effet, le cuivre diffuserait de manière passive à travers la membrane *via* des porines telles que OmpC et OmpF chez *E. coli* (Li, Nikaido et al. 1997 ; Rensing and Grass 2003) et *via* autres systèmes non spécifiques de la membrane externe comme la porine LamB ou le système Nik chez *R. gelatinosus*.

Ce manque de contrôle d'import est compensé par les systèmes d'efflux du cuivre afin de gérer et limiter la concentration intracellulaire en ce métal. La diffusion passive du cuivre pourrait d'ailleurs être à l'origine de l'apparition et de l'évolution des systèmes d'efflux chez les bactéries

Mon travail de thèse a permis d'identifier le système d'efflux et de tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus*. Ce système est constitué de l'ATPase CopA et des protéines solubles périplasmiques CopI et CopJ. Ces dernières présentent de nombreux résidus histidines et méthionines qui pourraient soit fixer le cuivre et de le séquestrer au niveau du périplasma, soit l'oxyder, soit le transférer vers un système d'efflux de la membrane externe afin de le chasser de la cellule.

Afin de trancher entre ces différentes hypothèses sur la fonction de CopI et CopJ dans le système de tolérance au cuivre des expériences supplémentaires sont nécessaires.

Si CopI et CopJ fixent le cuivre, nous pouvons purifier ces protéines et utiliser des approches biophysiques de quantification du cuivre (RPE/ICP-MS) pour déterminer si ces protéines fixent ou non le cuivre. Il serait intéressant alors de déterminer les sites de fixation

du cuivre en modifiant les résidus conservés histidines, cystéines et méthionines susceptibles d'être impliquées dans la coordination du métal. Pour CopI, nous pouvons mutés entre autres les résidus conservés (His39, Cys83, His86 et Met91). Pour la protéine CopJ, il faudrait muter par exemple le motif conservés C₃₇GCC₄₀ (Figure 33). Ces protéines ainsi mutées seront utilisée pour des testes de complémentation des souches mutantes *copI* et *copJ* chez *R. gelatinosus*.

Par contre, pour savoir si ces protéines ont une fonction dans l'oxydation du cuivre, nous pouvons tester l'activité cu-oxydase en utilisant le 2,6-dimethoxyphenol (DMP) comme substrat. Les extraits cellulaires de la souche sauvage (wt) et des mutants *copI* et *copJ* seront incubés en présence du DMP et de CuSO₄ (100 µM) et l'oxydation du DMP peut être suivit par spectrophotométrie à 468 nm (Solano, F et al 2001).

La possibilité d'avoir un éventuel système d'efflux de la membrane externe, différent de Cus, pour extraire le cuivre vers le milieu extracellulaire chez *R. gelatinosus* n'est pas exclu. L'analyse *in silico* ne permet pas d'identifier un tel système. En revanche, l'approche génétique (perte de fonction suite à la transposition Tn5) peut conduire à l'identification, s'il existe, d'un tel système d'efflux de la membrane externe. En effet, il suffit de sélectionner et analyser tous les mutants Tn sensibles au cuivre.

II- Régulation du système de tolérance du cuivre chez *R. gelatinosus*

Les mécanismes de régulation du système de tolérance du cuivre chez *R. gelatinosus* ont été partiellement caractérisés au cours de ce travail. En effet, nous avons montré que l'expression des protéines CopA et CopI sont sous le contrôle du métallorégulateur CopR. Comme pour le régulateur CueR d'*E. coli*, CopR on peut supposer que CopR détecterait l'augmentation de la concentration intracellulaire en cuivre et induirait l'expression du système d'efflux en réponse à cette augmentation. Cependant, mes résultats indiquent qu'il existe autres facteurs que CopR impliqués dans la régulation de CopA et CopI. En effet, nous avons constaté que le mutant *copR*⁻ présente une tolérance au cuivre plus importante que celle du mutant *copA*⁻ et que l'ATPase CopA est exprimée et même induite dans un fond génétique *copR*⁻. Nous avons suggéré, en raison de forte homologues avec CopR, que l'expression de *copA* et *copI* pourrait être induite par CadR, un autre régulateur de type Mer impliqué dans la tolérance au cadmium.

Afin de déterminer si CadR joue un rôle dans l'induction de CopA et CopI, nous avons donc utilisé une approche indirecte qui consiste à étudier l'expression de CopA-H6 et CopI dans le mutant *copR*⁻ en réponse à un excès en cuivre ou en cadmium. Le but est d'induire l'expression de CadR uniquement par le cadmium pour voir si Cd-CadR induit à son tour l'expression de CopA et CopI ou si cela nécessite la présence du cuivre (Cu-CadR).

Dans la Figure 76, nous pouvons observer que dans la souche CopA-H₆ l'expression de CopA-H6 et CopI est aussi induite par le cadmium (1 mM CdCl) mais à un niveau inférieur à celui observé avec le cuivre (1 mM CuSO₄) en présence de CopR. De même, dans un fond génétique *copR*⁻ (CopA-H₆-*copR*⁻), l'expression de CopA-H6 et CopI est moins induite par le cuivre (0.2 mM) comparé à l'induction observée avec du cadmium (1 mM et 1.5 mM de CdCl). Ces résultats montrent que l'expression de CopA et CopI est induite aussi bien par le cadmium (CdCl) que par le cuivre en absence de CopR, ceci peut être due à un effet direct (*via* CadR) ou indirect de la cellule en réponse au stress généré par le cadmium qui pourrait affecter l'import d'autres métaux, notamment celui du cuivre. Toute fois la construction du mutant *cadR*⁻ et du double mutant *cadR*⁻-*copR*⁻ est indispensable pour confirmer ces résultats.

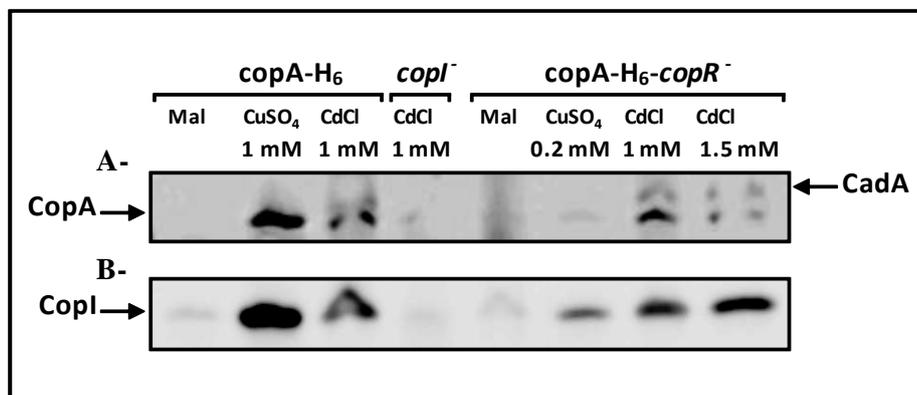


Figure 76 : Analyse de l'expression de CopA et CopI dans la souche CopA-H₆ et *copR*⁻ en réponse au cuivre et au cadmium par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce).

A – Expression de CopA-H₆ et de CadA. - B – Expression de CopI

Il est à noter qu'en présence de cadmium, une bande qui correspondrait à CadA (l'ATPase à cadmium) est aussi révélé sur le blot. Comme pour CopI, la protéine CadA présente une séquence de 14 histidines en N-terminale qui pourrait être révélée par la sonde HRP-probe. Un mutant *cadA*⁻ est d'ores et déjà disponible, la nature de cette bande peut être donc vérifiée.

II- Un système de tolérance au cuivre différent d'*E. coli*

Les recherches menées chez *R. gelatinosus* ainsi que les données disponibles dans la littérature sur le métabolisme du cuivre suggèrent la présence d'au moins deux systèmes différents de tolérance du cuivre chez les bactéries. Le premier met en jeu, en plus de l'ATPase d'efflux de la membrane interne CopA, un système d'efflux de la membrane externe équivalent au complexe Cus d'*E. coli* (Outten FW, Huffman DL, et al 2001) permettant l'extraction du cuivre dans le milieu extracellulaire (Figure 77A).

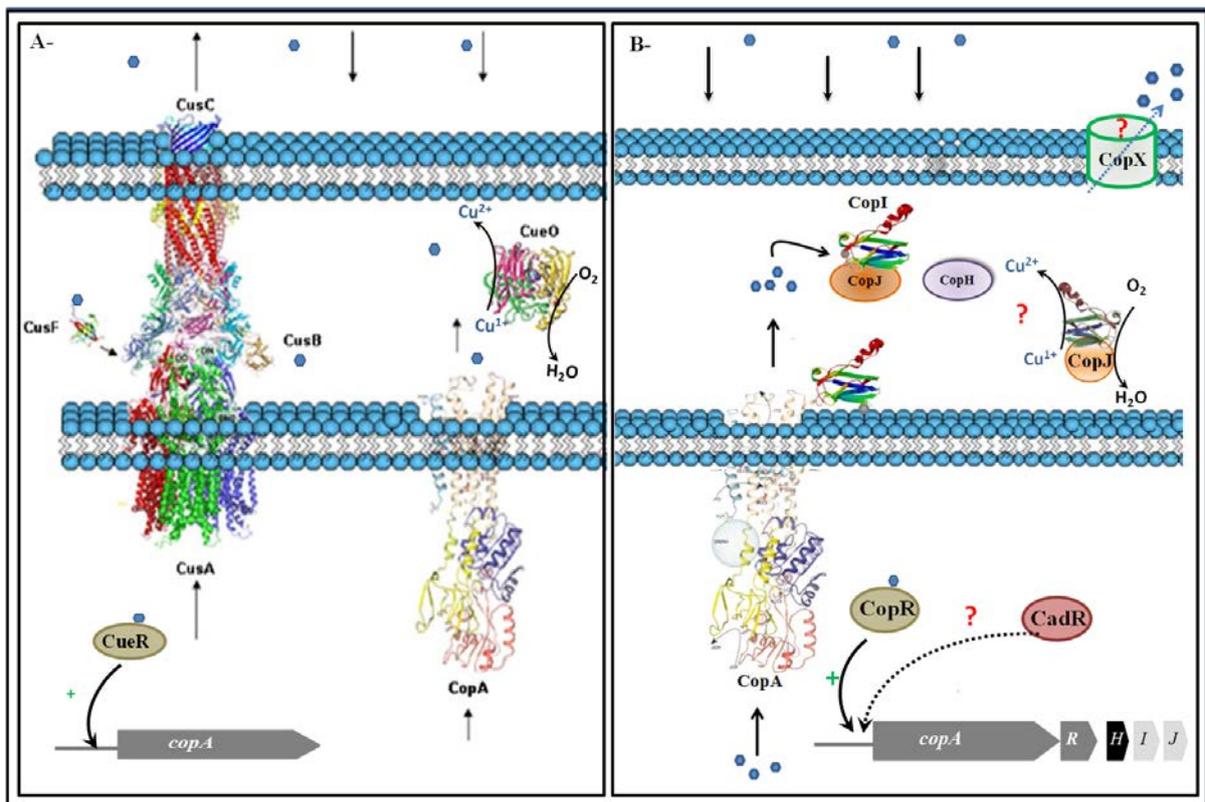


Figure 77 : Deux systèmes différents de tolérance du cuivre chez les bactéries.

- A- Systèmes similaire à celui à *E. coli* met en jeu système d'efflux CusABCF. Le gène *copA* chez *E. coli* est régulé par CueR.
- B- Systèmes de *P. aeruginosa* et *R. gelatinosus* met en place des protéines périplasmiques qui pourraient soit séquestrer, soit oxyder soit transporter le cuivre vers un système d'efflux de la membrane externe. Les gènes *copA* et *copI* sont régulés par CopR et probablement par CadR

Le second système identifié chez certaines bactéries comme *Salmonella* ou encore *P. aeruginosa* PAO1 et *R. gelatinosus* ne présente pas de système d'efflux de la membrane externe mais ferait intervenir des protéines périplasmiques telle que CueP, PA2807, CopI et CopJ. Ces protéines pourraient soit séquestrer le cuivre au niveau du périplasm, soit l'oxyder

pour le rendre moins toxique, soit le transporter vers un système d'efflux de la membrane externe différent de *Cus* mais encore non identifié (Figure 77B). Pontel avait d'ailleurs suggéré que les bactéries Gram négatifs ne possédant pas de complexe *Cus* ont au moins un gène codant pour une protéine périplasmique riche en histidine cystéines et méthionine qui pourrait séquestrer le cuivre (Pontel and Soncini 2009). Il a également montré que la protéine *CueP* pouvait restaurer partiellement la résistance au cuivre d'un mutant *cus⁻* d'*E. coli* (Pontel and Soncini 2009).

Nous avons également transformé le mutant *cus⁻* d'*E. coli* avec un plasmide contenant le gène codant pour la protéine *CopI* de *R. gelatinosus*, cependant aucune tolérance acquise par cette souche n'a été observée comparé à un mutant *cus⁻*. Ceci peut s'expliquer par les différences de séquences entre *CopA* d'*E. coli* et de *R. gelatinosus*. Entre *CopA* de *Salmonella* et *E. coli*, la similitude est de 95%. Cette différence de séquence peut empêcher l'interaction *CopI* avec *CopA* de se faire et donc le transfert du cuivre à *CopI* n'aurait pas lieu. Il est également possible qu'une interaction entre *CopI*, *CopH* et *CopJ* soit nécessaire afin que *CopI* remplisse son rôle dans la séquestration du cuivre. Il faudrait alors exprimer les trois protéines dans le mutant *cus⁻* d'*E. coli* et tester sa tolérance au cuivre.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse me permet de proposer pour la première fois un modèle dans la tolérance au cuivre chez une protéobactérie. Le système de tolérance du cuivre chez *R. gelatinosus* est bien différent de celui d'*E. coli* (Rensing C, Fan B et al 2000) et se rapproche de celui de *P. aeruginosa*. Quelles que soient les conditions d'oxygénation, l'ATPase à cuivre *CopA* se met en place pour transporter le cuivre en excès du cytoplasme vers le périplasma. Cette ATPase agirait de concert avec les protéines périplasmiques *CopI*, *CopJ*, et probablement *CopH*, à la mise en place de processus de détoxification du cuivre. Le cuivre transporté par *CopA* serait pris en charge par *CopI* et/ou *CopJ* probablement par une interaction protéine-protéine. Une fois le cuivre fixé, l'interaction *CopA/CopI* serait rompue. Ainsi *CopI* se localise dans le périplasma. Le niveau d'induction de l'expression de *CopI* en présence de cuivre est en faveur du rôle de *CopI* dans la séquestration du cuivre plutôt que dans le transport du cuivre vers un système d'efflux de la membrane externe. De plus, le phénotype sévère du mutant *copI* et *copJ* dans la tolérance au cuivre en anaérobiose suggère que ces protéines n'auraient pas de fonction dans l'oxydation du cuivre qui nécessite la présence d'oxygène.

IV- L'effet du cuivre excédentaire sur les cellules

En présence d'oxygène, le cuivre en excès peut induire un stress oxydatif par la formation du ROS où les ions du Cu (I) réagissent avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour former des radicaux hydroxyles (Gunther, Hanna et al. 1995). Par ailleurs, il est connu que certains métaux tels que le cuivre sont aussi toxiques en absence d'oxygène, cependant les mécanismes de toxicité ont été longtemps inconnus. Macomber (Macomber and Imlay 2009) a montré que le cuivre s'attaquerait aux clusters 4F-4S des déshydratases chez *E. coli* en anaérobie. Mon travail a permis d'identifier une nouvelle cible du cuivre, une autre protéine à cluster 4F-4S de la voie de biosynthèse des porphyrines (hèmes et chlorophylles) en microaérobie et anaérobie. Cet effet du cuivre a des répercussions importantes sur tous les métabolismes et processus physiologiques utilisant les porphyrines comme cofacteur qui sont très nombreux, comme les complexes respiratoires ou photosynthétiques. En absence de CopA chez *R. gelatinosus*, la toxicité du cuivre est plus importante dans les conditions de croissance de microaérobie ou de photosynthèse anaérobie. L'accumulation de la coproporphyrine III, un intermédiaire de la voie de biosynthèse des porphyrines, est dû au fait que l'excès du cuivre affecte HemN probablement en déstabilisant (la coproporphyrine III oxydase). Ces résultats obtenus chez *R. gelatinosus* sont en accord avec les résultats publiés par Macomber sur l'effet du cuivre sur les clusters [4Fe-4S] des déshydratases chez *E. coli* (Macomber and Imlay 2009). Dans ces protéines, le cluster est coordonné par trois résidus cystéines, par conséquent le quatrième atome de fer dans ces enzymes est exposé au solvant et il est ainsi facilement accessible au cuivre (Macomber et Imlay, 2009). Notre étude montre que le cuivre excédentaire affecte d'autres types d'enzyme à cluster [4Fe-4S] faisant partie de la famille des radical-SAM (Layeret al., 2003). Les protéines de cette famille d'enzymes possèdent un centre [4Fe-4S], coordonné aussi par trois cystéines conservées (selon le motif CxxxCxxC), et le quatrième atome de fer interagit avec la S-Adénosylméthionine (SAM). Dans la structure de HemN, malgré que le cluster [4Fe-4S] soit enfoui dans la protéine, les ions métalliques peuvent avoir accès à ce cluster grâce à la présence d'une grande fente permettant l'entrée du substrat (la coproporphyrinogène III) au site actif (Layeret al., 2003).

Ces résultats sont confortés par le fait que l'effet toxique du cuivre sur les tétrapyrrolles n'est pas observé à forte aération en raison de la substitution de HemN par HemF. Contrairement à HemN, HemF tolère et utilise l'oxygène, notre étude suggère qu'elle tolère aussi le cuivre.

L'émergence chez les microorganismes de certaines enzymes comme AscF et HemF à centres bimétalliques serait la conséquence, d'après différentes études, de l'apparition de l'oxygène sur Terre au cours de l'évolution (Imlay 2006 ; Ouchane, Steunou et al. 2004 ; Blankenship 2010).

Ces enzymes à centres bimétalliques ont permis aux cellules de s'adapter à ce nouvel environnement en maintenant des voies métaboliques jusqu'à lors strictement anaérobies. Les résultats obtenus sur les cibles du cuivre en anaérobiose lors de cette étude ainsi que celle d'Imlay, laissent envisager que les métaux ont peut-être aussi joué un rôle dans l'apparition des enzymes à clusters bimétalliques afin de s'adapter et évoluer en contact de certains métaux dans l'environnement.

Avec l'apparition de l'oxygène, les métaux sont devenus solubles et disponibles, nous pouvons imaginer que certaines enzymes à cluster 4Fe-4S étaient ainsi potentiellement des cibles de métaux comme le cuivre. La biodisponibilité des métaux peut avoir généré une pression de sélection à l'origine de l'émergence de certaines enzymes à clusters bimétalliques.

Nous pouvons tester d'ailleurs l'effet d'autres métaux en excès sur les clusters [4Fe-4S] en absence de leur système d'efflux respectifs. Dans ce sens, nous disposons au laboratoire d'un mutant pour l'ATPase d'efflux du cadmium CadA, l'effet d'excès du cadmium sur les protéines à cluster Fe-S, notamment ceux impliqués dans la voie de biosynthèse des porphyrines, peut alors être examiné. Il serait aussi possible d'inactiver d'autres systèmes d'efflux d'autres métaux comme celui du nickel ou du cobalt pour tester cette hypothèse.

Il serait aussi intéressant d'étudier d'avantage la toxicité du cuivre sur d'autres protéines à cluster [Fe-S] de *R. gelatinosus* comme la protéine Rieske du complexe *bc₁*. Il faudrait exprimer et purifier ces protéines afin d'étudier leur stabilité ou activité en présence de cuivre. Toutefois, des résultats préliminaires obtenus chez *R. gelatinosus* indiquent que le cluster [Fe-S] de la protéine Rieske n'est pas affecté par le cuivre. De la même manière, des résultats similaires ont été observés par Macomber sur la NADH déshydrogénase traité avec du cuivre (communication personnelle).

V- Mécanisme d'entrée et de circulation du cuivre dans la cellule

Afin de contrôler la concentration intracellulaire en métaux, les cellules ont deux alternatives ; soit elles bloquent l'entrée du métal en réprimant les gènes impliqués dans leur import, soit elles induisent les systèmes d'efflux pour l'excréter dans le milieu extracellulaire.

Le fer, un métal vital, est également toxique à forte concentration cependant, aucun système d'efflux de ce métal n'est connu jusqu'à ce jour. Les cellules gèrent la concentration cellulaire en fer en modulant son import et en contrôlant la synthèse des sidérophores et des systèmes d'import (Fec, FhuA, ..etc) par le régulateur Fur sensible au fer. Pour le cuivre, aucun système d'entrée spécifique n'est identifié jusqu'à présent et il est probable que le cuivre passe dans la cellule à travers les porines ou des systèmes d'import d'autres métaux, rendant l'entrée du cuivre dans la cellule difficilement contrôlable. En revanche, les mécanismes d'efflux spécifique du cuivre, particulièrement l'ATPase CopA, sont répandus et présents chez toutes les bactéries

Selon des résultats obtenus par notre laboratoire (phénotype des mutants *copA⁻* et *ctpA⁻*) ainsi que les données bibliographiques, ces systèmes de transports du cuivre s'approvisionneraient en cuivre à partir du compartiment cytoplasmique. En particulier, CtpA doit récupérer le cuivre dans le cytoplasme pour le délivrer aux cuproprotéines de la membrane. On peut légitimement se poser la question pourquoi le cuivre doit passer par le cytoplasme pour ressortir vers la membrane ? Une revue récente propose que c'est la rareté du cuivre dans les milieux de culture, parce qu'il est probablement complexé par d'autres molécules (amino acides...), qui fait que les bactéries doivent stocker du cuivre dans le cytoplasme.

D'autres hypothèses peuvent être considérées. Nous pensons que le cuivre passe par le cytoplasme, simplement par ce qu'il diffuse rapidement à travers la membrane. En effet, il est établi que le cuivre est plus nocif au niveau du compartiment périplasmique, pour éviter cette toxicité, il est alors possible que le cuivre traversant la membrane externe diffuse rapidement à travers la membrane interne ou alors il est fortement complexé et donc non utilisable. Au niveau du cytoplasme, l'effet toxique du cuivre peut être neutralisé grâce aux chélateurs de métaux comme le glutathion. Ce passage du cuivre vers le cytoplasme empêcherait les cuproprotéines de s'approvisionner en ce métal indispensable à leurs activités d'où la nécessité de l'ATPase pour le remettre à la disponibilité des cuproprotéines.

Par ailleurs, l'état d'oxydation du cuivre varie entre le périplasma et le cytoplasme. Il n'est pas exclu donc que l'état d'oxydation du cuivre dans le périplasma empêche sa prise en charge par des chaperonnes et les cuproprotéines. Le passage vers le cytoplasme permettrait de le réduire en Cu(I) et l'ATPase CtpA le prendra en charge par la suite.

Une autre étude chez *P. aeruginosa* est arrivée aux mêmes conclusions que les nôtres. Le cuivre doit passer par le cytoplasme où il serait pris en charge soit par une ATPase à efflux

pour l'éliminer en cas d'excès et par des systèmes qui l'achemine à des cuproprotéines membranaires (*cbb₃*, *NosZ*). Nos travaux ont montré que les bactéries mettent en place deux ATPases du cuivre homologues (*CopA* et *CtpA*) qui remplissent deux rôles physiologiques différents dans la cellule (Hassani, et al. 2010 ; Azzouzi et al. 2013).

La protéine *CtpA* a un rôle dans l'acquisition et l'insertion du cuivre au sein des cuproprotéines (*NosZ*, *cbb₃*, *caa₃*) alors que *CopA* est impliquée dans la tolérance au cuivre. Des résultats similaires (*CopA1/CopA2*) ont été publiés chez *P. aeruginosa* (Gonzalez-Guerrero, Raimunda et al. 2010). La différence de fonction entre ces ATPases (*CopA* et *CtpA*) peut s'expliquer par une interaction spécifique entre ces transporteurs et les protéines chaperonnes au niveau du périplasma. Dans ce sens, il a été proposé que *Sco1* et *Cox11* seraient des chaperonnes associées à l'ATPase *CtpA* dans la biogenèse de l'oxydase *cbb₃*. Ces protéines chaperonnes prendraient en charge le cuivre au niveau du périplasma pour le délivrer à *cbb₃*. Pour mettre en évidence l'existence d'une telle interaction, il faudrait construire des souches contenant *CtpA* et *Sco1* taggées afin de réaliser des expériences de copurification sur des colonnes d'affinités. Les fractions d'élutions seront analysées par la suite sur des gels natifs et des gels SDS et la présence de *Sco1* et de *CtpA* sera vérifiée par des analyses de spectrométrie de masse (Figure 78).

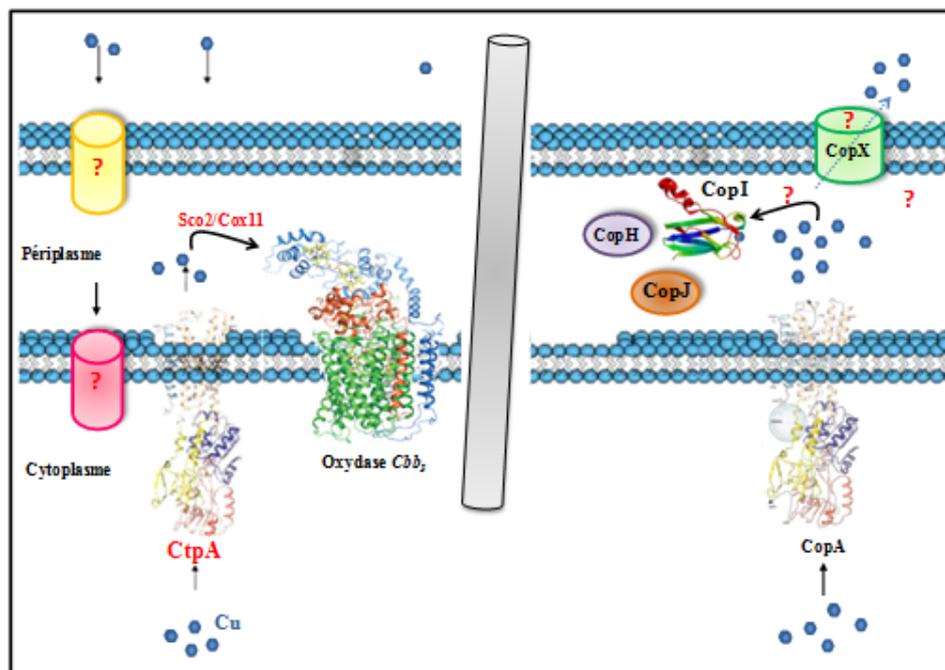


Figure 78 : CtpA et CopA deux ATPases homologues deux rôles physiologiques distinctes dans la cellule.

Mon travail a permis d'identifier de potentiels partenaires à CopA dans l'efflux du cuivre qui délivrerait le cuivre aux protéines périplasmiques CopI, CopJ ou encore CopH. Pour révéler l'interaction de CopA avec ces protéines périplasmiques, nous devons construire des souches CopA et CopI étiquetées avec un tag différents de ceux générées précédemment afin de purifier ces protéines (CopA et CopI) éventuellement complexées avec d'autres partenaires (CopH, CopJ...). De la même manière que pour Sco1 et CtpA, les fractions purifiées seront analysées sur gels SDS et sur gels natifs, les bandes seront par la suite analysées par spectrométrie de masse.

Conclusion

Comme signalé précédemment, la stratégie de la mutagenèse au transposon Tn5 a permis d'identifier des systèmes potentiels d'import du cuivre comme les systèmes d'import du fer (Feo) et du nickel (Nik). Cependant, l'inactivation de ces systèmes dans un fond génétique CopA- n'engendre pas une résistance au cuivre égale à celle de la souche sauvage. Ces résultats indiquent que ces systèmes d'imports du fer et du nickel contribuent mais, avec un rôle minoritaire, au transport du cuivre et que probablement le cuivre passe par plusieurs transporteurs. Nous pouvons également conclure, qu'il n'y aurait pas de système spécifique d'import du cuivre et que sa diffusion passive à travers la membrane justifie la présence de systèmes d'efflux de cuivre pour contrer cette diffusion.

Mon travail de thèse a permis d'identifier le système d'homéostasie du cuivre chez la bactérie photosynthétique *R. gelatinosus* qui met en jeu l'ATPase CopA et au moins deux protéines périplasmiques. Ce système de tolérance du cuivre est différent de celui décrit chez *E. coli* en mettant en jeu les protéines périplasmique CopI et CopJ pour remplacer probablement le complexe CusCFBA. Il serait intéressant par conséquent de poursuivre le travail sur ces protéines périplasmiques afin de mieux caractériser leurs rôles dans le système de tolérance du cuivre.

Enfin, nous avons identifié une nouvelle cible du cuivre qui est la voie de biosynthèse des tétrapyrrolles en affectant la coproporphyrinogène III oxydase (HemN). Ceci explique la forte toxicité du cuivre en anaérobie puisque l'ensemble des enzymes utilisant l'hème ou la chlorophylle seront affectées.

Mes recherches sur le projet sur la voie de dénitrification chez *R. gelatinosus* a permis d'identifier les gènes codants pour les différentes enzymes de la chaîne de dénitrification et de

généraler des mutants pour chacun de ces gènes. Cependant, le travail reste à finir en regardant l'expression de ces gènes et en déterminant les conditions permettant l'expression et ou le fonctionnement de cette voie.

REFERENCES

- Abdel-Ghany, S. E. (2009). "Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes." Planta **229**(4): 767-79.
- Abdel-Ghany, S. E., P. Muller-Moule, et al. (2005). "Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts." Plant Cell **17**(4): 1233-51.
- Abou-Jaoude, A., M. C. Pascal, et al. (1979). "Formate-nitrite reduction in *Escherichia coli* K12. 2. Identification of components involved in the electron transfer." Eur J Biochem **95**(2): 315-21.
- Agalidis, H. and F. Reiss-Husson (1991). "Resolution of *Rhodocyclus gelatinosus* photoreceptor unit components by temperature-induced phase separation in the presence of decyltetraoxyethylene." Biochem Biophys Res Commun **177**(3): 1107-12.
- Agalidis, I., S. Othman, et al. (1999). "Purification, redox and spectroscopic properties of the tetraheme cytochrome c isolated from *Rubrivivax gelatinosus*." Eur J Biochem **261**(1): 325-36.
- Alberti, M., D. H. Burke, et al. (1995). Structure and Sequence of the Photosynthesis Gene Cluster. Advances in Photosynthesis. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. **2**: 1083-1106.
- Allen, G. S., C. C. Wu, et al. (2011). "The architecture of CopA from *Archeaoglobus fulgidus* studied by cryo-electron microscopy and computational docking." Structure **19**(9): 1219-32.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson, et al. (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 215-37.
- Arai, H., Y. Igarashi, et al. (1995). "Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR." FEBS Lett **371**(1): 73-6.
- Arai, H., M. Mizutani, et al. (2003). "Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **149**(Pt 1): 29-36.
- Arguello, J. M., E. Eren, et al. (2007). "The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases." Biomaterials **20**(3-4): 233-48.
- Arguello, J. M., M. Gonzalez-Guerrero, et al. (2011). "Bacterial transition metal P(1B)-ATPases: transport mechanism and roles in virulence." Biochemistry **50**(46): 9940-9.
- Arnesano, F., L. Banci, et al. (2003). "A redox switch in CopC: an intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3814-9.
- Ascone, I., A. Longo, et al. (1993). "An X-ray absorption study of the reconstitution process of bovine Cu,Zn superoxide dismutase by Cu(I)-glutathione complex." FEBS Lett **322**(2): 165-7.
- Attallah, C. V., E. Welchen, et al. (2007). "Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome c oxidase biogenesis." Plant Mol Biol **65**(3): 343-55.
- Bagai, I., C. Rensing, et al. (2008). "Direct metal transfer between periplasmic proteins identifies a bacterial copper chaperone." Biochemistry **47**(44): 11408-14.
- Baker, S. C., S. J. Ferguson, et al. (1998). "Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1046-78.
- Bartnikas, T. B., I. E. Tosques, et al. (1997). "Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3." J Bacteriol **179**(11): 3534-40.
- Bauer, C., J. Buggy, et al. (1993). "Control of photosystem genes in *Rhodobacter capsulatus*." Trends Genet **9**(2): 56-60.

- Berks, B. C., D. J. Richardson, et al. (1995). "The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*." Biochem J **309** (Pt 3): 983-92.
- Bersch, B., A. Favier, et al. (2008). "Molecular structure and metal-binding properties of the periplasmic CopK protein expressed in *Cupriavidus metallidurans* CH34 during copper challenge." J Mol Biol **380**(2): 386-403.
- Blaby-Haas, C. E. and S. S. Merchant (2012). "The ins and outs of algal metal transport." Biochim Biophys Acta **1823**(9): 1531-52.
- Blankenship, R. E. (2010). "Early evolution of photosynthesis." Plant Physiol **154**(2): 434-8.
- Boal, A. K. and A. C. Rosenzweig (2009). "Structural biology of copper trafficking." Chem Rev **109**(10): 4760-79.
- Boudes, M., N. Lazar, et al. (2012). "The structure of the NasR transcription antiterminator reveals a one-component system with a NIT nitrate receptor coupled to an ANRAR RNA-binding effector." Mol Microbiol **85**(3): 431-44.
- Brondijk, T. H., D. Fiegen, et al. (2002). "Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinol oxidation." Mol Microbiol **44**(1): 245-55.
- Brondijk, T. H., A. Nilavongse, et al. (2004). "NapGH components of the periplasmic nitrate reductase of *Escherichia coli* K-12: location, topology and physiological roles in quinol oxidation and redox balancing." Biochem J **379**(Pt 1): 47-55.
- Brown, N. L., J. V. Stoyanov, et al. (2003). "The MerR family of transcriptional regulators." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 145-63.
- Buschmann, S., E. Warkentin, et al. (2010). "The structure of cbb3 cytochrome oxidase provides insights into proton pumping." Science **329**(5989): 327-30.
- Cabello, P., M. D. Roldan, et al. (2004). "Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea." Microbiology **150**(Pt 11): 3527-46.
- Cartron, M. L., S. Maddocks, et al. (2006). "Feo--transport of ferrous iron into bacteria." Biometals **19**(2): 143-57.
- Castresana, J., M. Lubben, et al. (1994). "Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen." Embo J **13**(11): 2516-25.
- Castruita, M., D. Casero, et al. (2011). "Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps." Plant Cell **23**(4): 1273-92.
- Cha, J. S. and D. A. Cooksey (1991). "Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 8915-9.
- Chillappagari, S., A. Seubert, et al. (2010). "Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **192**(10): 2512-24.
- Choudhary, M. and S. Kaplan (2000). "DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." Nucleic Acids Res **28**(4): 862-7.
- Cogdell, R. J., N. W. Isaacs, et al. (1999). "How photosynthetic bacteria harvest solar energy." J Bacteriol **181**(13): 3869-79.
- Colangelo, E. P. and M. L. Guerinot (2006). "Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants." Curr Opin Plant Biol **9**(3): 322-30.
- Cox, D. W. and S. D. Moore (2002). "Copper transporting P-type ATPases and human disease." J Bioenerg Biomembr **34**(5): 333-8.
- D'Mello, R., S. Hill, et al. (1996). "The cytochrome bd quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity in vivo by oxygen inhibition." Microbiology **142** (Pt 4): 755-63.

- Dai, Y. and F. W. Outten "The E. coli SufS-SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS-IscU." FEBS Lett **586**(22): 4016-22.
- Darrouzet, E. and F. Daldal (2003). "Protein-protein interactions between cytochrome b and the Fe-S protein subunits during QH2 oxidation and large-scale domain movement in the bc1 complex." Biochemistry **42**(6): 1499-507.
- Darrouzet, E., M. Valkova-Valchanova, et al. (2000). "Uncovering the [2Fe2S] domain movement in cytochrome bc1 and its implications for energy conversion." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4567-72.
- Dashper, S. G., C. A. Butler, et al. (2005). "A novel Porphyromonas gingivalis FeoB plays a role in manganese accumulation." J Biol Chem **280**(30): 28095-102.
- de Boer, A. P., W. N. Reijnders, et al. (1994). "Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene cluster involved in nitrite reduction in Paracoccus denitrificans." Antonie Van Leeuwenhoek **66**(1-3): 111-27.
- de Boer, A. P., J. van der Oost, et al. (1996). "Mutational analysis of the nor gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from Paracoccus denitrificans." Eur J Biochem **242**(3): 592-600.
- de Pina, K., C. Navarro, et al. (1995). "Purification and characterization of the periplasmic nickel-binding protein NikA of Escherichia coli K12." Eur J Biochem **227**(3): 857-65.
- Deisenhofer, J. and H. Michel (1989). "Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium Rhodospseudomonas viridis." Embo J **8**(8): 2149-70.
- Delgado, M. J., N. Bonnard, et al. (2003). "The Bradyrhizobium japonicum napEDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration." Microbiology **149**(Pt 12): 3395-403.
- Donohue, T. J. and S. Kaplan (1991). "Genetic techniques in rhodospirillaceae." Methods Enzymol **204**: 459-85.
- Dosanjh, N. S. and S. L. Michel (2006). "Microbial nickel metalloregulation: NikRs for nickel ions." Curr Opin Chem Biol **10**(2): 123-30.
- Ducluzeau, A. L., S. Ouchane, et al. (2008). "The cbb3 oxidases are an ancient innovation of the domain bacteria." Mol Biol Evol **25**(6): 1158-66.
- Dupont, C. L., G. Grass, et al. (2011). "Copper toxicity and the origin of bacterial resistance--new insights and applications." Metallomics **3**(11): 1109-18.
- Eitinger, T. and M. A. Mandrand-Berthelot (2000). "Nickel transport systems in microorganisms." Arch Microbiol **173**(1): 1-9.
- Elsen, S., S. N. Ponnampalam, et al. (1998). "CrtJ bound to distant binding sites interacts cooperatively to aerobically repress photopigment biosynthesis and light harvesting II gene expression in Rhodobacter capsulatus." J Biol Chem **273**(46): 30762-9.
- Espariz, M., S. K. Checa, et al. (2007). "Dissecting the Salmonella response to copper." Microbiology **153**(Pt 9): 2989-97.
- Fan, B. and B. P. Rosen (2002). "Biochemical characterization of CopA, the Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase." J Biol Chem **277**(49): 46987-92.
- Feissner, R. E., C. L. Richard-Fogal, et al. (2006). "ABC transporter-mediated release of a haem chaperone allows cytochrome c biogenesis." Mol Microbiol **61**(1): 219-31.
- Ferguson, S. J. (1998). "Nitrogen cycle enzymology." Curr Opin Chem Biol **2**(2): 182-93.
- Francki, K. T., B. J. Chang, et al. (2000). "Identification of genes associated with copper tolerance in an adhesion-defective mutant of Aeromonas veronii biovar sobria." FEMS Immunol Med Microbiol **29**(2): 115-21.
- Franke, S., G. Grass, et al. (2001). "The product of the ybdE gene of the Escherichia coli chromosome is involved in detoxification of silver ions." Microbiology **147**(Pt 4): 965-72.

- Franke, S., G. Grass, et al. (2003). "Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*." J Bacteriol **185**(13): 3804-12.
- Fuchs, B. M., S. Spring, et al. (2007). "Characterization of a marine gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(8): 2891-6.
- Gall, A., R. J. Cogdell, et al. (2003). "Influence of carotenoid molecules on the structure of the bacteriochlorophyll binding site in peripheral light-harvesting proteins from *Rhodobacter sphaeroides*." Biochemistry **42**(23): 7252-8.
- Gavira, M., M. D. Roldan, et al. (2002). "Regulation of nap gene expression and periplasmic nitrate reductase activity in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM158." J Bacteriol **184**(6): 1693-702.
- Giraud, E., D. Pignol, et al. (2003). "Two PpsR proteins with antagonist activity control photosynthesis in *Bradyrhizobium*." 11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes.
- Gomelsky, M. and S. Kaplan (1997). "Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." J Bacteriol **179**(1): 128-34.
- Gonzalez-Guerrero, M., D. Raimunda, et al. (2010). "Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **78**(5): 1246-58.
- Gonzalez, P. J., C. Correia, et al. (2006). "Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction." J Inorg Biochem **100**(5-6): 1015-23.
- Gourdon, P., X. Y. Liu, et al. (2011). "Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase." Nature **475**(7354): 59-64.
- Grass, G. and C. Rensing (2001). "CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **286**(5): 902-8.
- Grass, G. and C. Rensing (2001). "Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*." J Bacteriol **183**(6): 2145-7.
- Green, G. N., H. Fang, et al. (1988). "The nucleotide sequence of the cyd locus encoding the two subunits of the cytochrome d terminal oxidase complex of *Escherichia coli*." J Biol Chem **263**(26): 13138-43.
- Grotz, N. and M. L. Guerinot (2006). "Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants." Biochim Biophys Acta **1763**(7): 595-608.
- Gunther, M. R., P. M. Hanna, et al. (1995). "Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin-trapping study." Arch Biochem Biophys **316**(1): 515-22.
- Gupta, S. D., B. T. Lee, et al. (1995). "Identification of cutC and cutF (nlpE) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*." J Bacteriol **177**(15): 4207-15.
- Hartig, E. and W. G. Zumft (1999). "Kinetics of nirS expression (cytochrome cd1 nitrite reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the transition from aerobic respiration to denitrification: evidence for a denitrification-specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system." J Bacteriol **181**(1): 161-6.
- Hassani, B. K., C. Astier, et al. (2010). "CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes." J Biol Chem **285**(25): 19330-7.
- Hassani, B. K., A. S. Steunou, et al. (2010). "Adaptation to oxygen: role of terminal oxidases in photosynthesis initiation in the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*." J Biol Chem **285**(26): 19891-9.
- Hill, J. J., J. O. Alben, et al. (1993). "Spectroscopic evidence for a heme-heme binuclear center in the cytochrome bd ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5863-7.

- Hill, K. L., R. Hassett, et al. (1996). "Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability." Plant Physiol **112**(2): 697-704.
- Hill, K. L. and S. Merchant (1995). "Coordinate expression of coproporphyrinogen oxidase and cytochrome c6 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in response to changes in copper availability." Embo J **14**(5): 857-65.
- Himelblau, E., H. Mira, et al. (1998). "Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*." Plant Physiol **117**(4): 1227-34.
- Hohmann-Marriott, M. F. and R. E. Blankenship (2011). "Evolution of photosynthesis." Annu Rev Plant Biol **62**: 515-48.
- Imlay, J. A. (2006). "Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen." Mol Microbiol **59**(4): 1073-82.
- Imlay, K. R. and J. A. Imlay (1996). "Cloning and analysis of sodC, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*." J Bacteriol **178**(9): 2564-71.
- Isaacs, N. W., R. J. Cogdell, et al. (1995). "Light-harvesting mechanisms in purple photosynthetic bacteria." Curr Opin Struct Biol **5**(6): 794-7.
- Jamers, A., K. Van der Ven, et al. (2006). "Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis." Aquat Toxicol **80**(3): 249-60.
- Jia, W. and J. A. Cole (2005). "Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*." Biochem Soc Trans **33**(Pt 1): 159-61.
- Jia, W., N. Tovell, et al. (2009). "A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake." Biochem J **417**(1): 297-304.
- Jormakka, M., B. Byrne, et al. (2003). "Protonmotive force generation by a redox loop mechanism." FEBS Lett **545**(1): 25-30.
- Junemann, S. (1997). "Cytochrome bd terminal oxidase." Biochim Biophys Acta **1321**(2): 107-27.
- Katoh, H., N. Hagino, et al. (2001). "Iron-binding activity of FutA1 subunit of an ABC-type iron transporter in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803." Plant Cell Physiol **42**(8): 823-7.
- Kawasaki, S., H. Arai, et al. (1997). "Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (nir) from *Pseudomonas aeruginosa*: sequencing and identification of a locus for heme d1 biosynthesis." J Bacteriol **179**(1): 235-42.
- Kern, M. and J. Simon (2008). "Characterization of the NapGH quinol dehydrogenase complex involved in *Wolinella succinogenes* nitrate respiration." Mol Microbiol **69**(5): 1137-52.
- Kershaw, C. J., N. L. Brown, et al. (2005). "The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations." Microbiology **151**(Pt 4): 1187-98.
- Keyer, K. and J. A. Imlay (1996). "Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13635-40.
- Kim, B. E., T. Nevitt, et al. (2008). "Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation." Nat Chem Biol **4**(3): 176-85.
- Kim, E. H., D. H. Nies, et al. (2011). "Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis." J Bacteriol **193**(10): 2381-7.
- Kim, H., H. Lee, et al. (2012). "The FeoA protein is necessary for the FeoB transporter to import ferrous iron." Biochem Biophys Res Commun **423**(4): 733-8.
- Kittleson, J. T., I. R. Loftin, et al. (2006). "Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI." Biochemistry **45**(37): 11096-102.

- Knablein, J., K. Mann, et al. (1996). "Isolation, cloning, sequence analysis and localization of the operon encoding dimethyl sulfoxide/trimethylamine N-oxide reductase from *Rhodobacter capsulatus*." J Mol Biol **263**(1): 40-52.
- Koch, H. G., O. Hwang, et al. (1998). "Isolation and characterization of *Rhodobacter capsulatus* mutants affected in cytochrome cbb3 oxidase activity." J Bacteriol **180**(4): 969-78.
- Koch, H. G., C. Winterstein, et al. (2000). "Roles of the ccoGHIS gene products in the biogenesis of the cbb(3)-type cytochrome c oxidase." J Mol Biol **297**(1): 49-65.
- Komiya, H., T. O. Yeates, et al. (1988). "Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: symmetry relations and sequence comparisons between different species." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9012-6.
- Koronakis, V., A. Sharff, et al. (2000). "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export." Nature **405**(6789): 914-9.
- Kropat, J., S. Tottey, et al. (2005). "A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18730-5.
- Lang, H. P. and C. N. Hunter (1994). "The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LH2 complex in *Rhodobacter sphaeroides*." Biochem J **298** (Pt 1): 197-205.
- Laratta, W. P., P. S. Choi, et al. (2002). "Involvement of the PrrB/PrrA two-component system in nitrite respiration in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3: evidence for transcriptional regulation." J Bacteriol **184**(13): 3521-9.
- Layer, G., J. Moser, et al. (2003). "Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes." Embo J **22**(23): 6214-24.
- Layer, G., K. Verfurth, et al. (2002). "Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*." J Biol Chem **277**(37): 34136-42.
- LeBlanc, H., A. S. Lang, et al. (1999). "Transcript cleavage, attenuation, and an internal promoter in the *Rhodobacter capsulatus* puc operon." J Bacteriol **181**(16): 4955-60.
- Li, X. Z., H. Nikaido, et al. (1997). "Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins." J Bacteriol **179**(19): 6127-32.
- Liotenberg, S., A. S. Steunou, et al. (2008). "Organization and expression of photosynthesis genes and operons in anoxygenic photosynthetic proteobacteria." Environ Microbiol **10**(9): 2267-76.
- Liu, H. P., S. Takio, et al. (1999). "Involvement in denitrification of the napKEFDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase system in the denitrifying phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*." Biosci Biotechnol Biochem **63**(3): 530-6.
- Lohmeyer, E., S. Schroder, et al. (2012). "The ScoI homologue SenC is a copper binding protein that interacts directly with the cbb(3)-type cytochrome oxidase in *Rhodobacter capsulatus*." Biochim Biophys Acta **1817**(11): 2005-15.
- Lu, Z. H. and M. Solioz (2001). "Copper-induced proteolysis of the CopZ copper chaperone of *Enterococcus hirae*." J Biol Chem **276**(51): 47822-7.
- Luque-Almagro, V. M., A. J. Gates, et al. (2011). "Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation." Biochem Soc Trans **39**(6): 1838-43.
- Macomber, L. and J. A. Imlay (2009). "The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8344-9.
- Macomber, L., C. Rensing, et al. (2007). "Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*." J Bacteriol **189**(5): 1616-26.
- Magnani, D. a. S., M (2007). "How Bacteria Handle Copper." Microbiology Monographs.

- Maguire, M. E. and J. A. Cowan (2002). "Magnesium chemistry and biochemistry." Biomaterials **15**(3): 203-10.
- Marrero, K., A. Sanchez, et al. (2012). "Periplasmic proteins encoded by VCA0261-0260 and VC2216 genes together with copA and cueR products are required for copper tolerance but not for virulence in *Vibrio cholerae*." Microbiology **158**(Pt 8): 2005-16.
- Masuda, S. and C. E. Bauer (2002). "AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*." Cell **110**(5): 613-23.
- Mercer, J. F. and R. M. Llanos (2003). "Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1481S-4S.
- Merchant, S. S., M. D. Allen, et al. (2006). "Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*." Biochim Biophys Acta **1763**(7): 578-94.
- Mira, H., M. Vilar, et al. (2001). "Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH)." Biochem J **357**(Pt 2): 545-9.
- Moir, J. W. and N. J. Wood (2001). "Nitrate and nitrite transport in bacteria." Cell Mol Life Sci **58**(2): 215-24.
- Monchy, S., M. A. Benotmane, et al. (2006). "Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34." Microbiology **152**(Pt 6): 1765-76.
- Moore, L. J. and P. J. Kiley (2001). "Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor." J Biol Chem **276**(49): 45744-50.
- Moreno-Vivian, C., P. Cabello, et al. (1999). "Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases." J Bacteriol **181**(21): 6573-84.
- Moreno-Vivian, C. and S. J. Ferguson (1998). "Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways." Mol Microbiol **29**(2): 664-6.
- Morozkina, E. V. and R. A. Zvyagilskaya (2007). "Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors." Biochemistry (Mosc) **72**(10): 1151-60.
- Moskvin, O. V., L. Gomelsky, et al. (2005). "Transcriptome analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* PpsR regulon: PpsR as a master regulator of photosystem development." J Bacteriol **187**(6): 2148-56.
- Moura, I. and J. J. Moura (2001). "Structural aspects of denitrifying enzymes." Curr Opin Chem Biol **5**(2): 168-75.
- Multhaup, G., D. Strausak, et al. (2001). "Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of *Enterococcus hirae* assessed by surface plasmon resonance." Biochem Biophys Res Commun **288**(1): 172-7.
- Murray, L., R. H. Pires, et al. (1999). "Models for structure and function in quinone-binding sites: the *Escherichia coli* quinol oxidase, cytochrome bo3." Biochem Soc Trans **27**(4): 581-5.
- Myllykallio, H. and U. Liebl (2000). "Dual role for cytochrome cbb3 oxidase in clinically relevant proteobacteria?" Trends Microbiol **8**(12): 542-3.
- Narita, S., S. Taketani, et al. (1999). "Oxidation of protoporphyrinogen IX in *Escherichia coli* is mediated by the aerobic coproporphyrinogen oxidase." Mol Gen Genet **261**(6): 1012-20.
- Narita, S. and H. Tokuda (2006). "An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals." FEBS Lett **580**(4): 1164-70.
- Nelson, N. (1999). "Metal ion transporters and homeostasis." Embo J **18**(16): 4361-71.

- Ng, S. P., E. A. Palombo, et al. (2012). "The heavy metal tolerant soil bacterium *Achromobacter* sp. AO22 contains a unique copper homeostasis locus and two mer operons." J Microbiol Biotechnol **22**(6): 742-53.
- Noinaj, N., M. Guillier, et al. (2010). "TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function." Annu Rev Microbiol **64**: 43-60.
- Odermatt, A., H. Suter, et al. (1993). "Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*." J Biol Chem **268**(17): 12775-9.
- Ollagnier, S., E. Mulliez, et al. (1996). "The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center." J Biol Chem **271**(16): 9410-6.
- Olson, J. A. (1993). "Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **39 Suppl**: S57-65.
- Osman, D. and J. S. Cavet (2008). "Copper homeostasis in bacteria." Adv Appl Microbiol **65**: 217-47.
- Osman, D., C. J. Patterson, et al. (2012). "The copper supply pathway to a *Salmonella* Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P(1B)-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP." Mol Microbiol **87**(3): 466-77.
- Osman, D., K. J. Waldron, et al. (2010). "Copper homeostasis in *Salmonella* is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex." J Biol Chem **285**(33): 25259-68.
- Ouchane, S., I. Agalidis, et al. (2002). "Natural resistance to inhibitors of the ubiquinol cytochrome c oxidoreductase of *Rubrivivax gelatinosus*: sequence and functional analysis of the cytochrome bc(1) complex." J Bacteriol **184**(14): 3815-22.
- Ouchane, S., W. Nitschke, et al. (2005). "Multiple Rieske genes in prokaryotes: exchangeable Rieske subunits in the cytochrome bc-complex of *Rubrivivax gelatinosus*." Mol Microbiol **57**(1): 261-75.
- Ouchane, S., M. Picaud, et al. (1995). "A new mutation in the *pufL* gene responsible for the terbutryn resistance phenotype in *Rubrivivax gelatinosus*." FEBS Lett **374**(1): 130-4.
- Ouchane, S., M. Picaud, et al. (1996). "Development of gene transfer methods for *Rubrivivax gelatinosus* S1: construction, characterization and complementation of a *puf* operon deletion strain." Mol Gen Genet **252**(4): 379-85.
- Ouchane, S., M. Picaud, et al. (2007). "Global regulation of photosynthesis and respiration by FnrL: the first two targets in the tetrapyrrole pathway." J Biol Chem **282**(10): 7690-9.
- Ouchane, S., M. Picaud, et al. (1997). "Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*." Embo J **16**(15): 4777-87.
- Ouchane, S., M. Picaud, et al. (1997). "Pleiotropic effects of *puf* interposon mutagenesis on carotenoid biosynthesis in *Rubrivivax gelatinosus*. A new gene organization in purple bacteria." J Biol Chem **272**(3): 1670-6.
- Ouchane, S., A. S. Steunou, et al. (2004). "Aerobic and anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclases in purple bacteria: a strategy adopted to bypass the repressive oxygen control system." J Biol Chem **279**(8): 6385-94.
- Outten, F. W., D. L. Huffman, et al. (2001). "The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*." J Biol Chem **276**(33): 30670-7.
- Outten, F. W., C. E. Outten, et al. (2000). "Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*." J Biol Chem **275**(40): 31024-9.
- Page, L., L. Griffiths, et al. (1990). "Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria." Arch Microbiol **154**(4): 349-54.

- Page, M. D., J. Kropat, et al. (2009). "Two Chlamydomonas CTR copper transporters with a novel cys-met motif are localized to the plasma membrane and function in copper assimilation." *Plant Cell* **21**(3): 928-43.
- Palmer, C. M. and M. L. Guerinot (2009). "Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants." *Nat Chem Biol* **5**(5): 333-40.
- Palmgren, M. G. and P. Nissen (2011). "P-type ATPases." *Annu Rev Biophys* **40**: 243-66.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, et al. (1997). "A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria." *FEMS Microbiol Lett* **156**(1): 1-8.
- Peakman, T., J. Crouzet, et al. (1990). "Nucleotide sequence, organisation and structural analysis of the products of genes in the nirB-cysG region of the Escherichia coli K-12 chromosome." *Eur J Biochem* **191**(2): 315-23.
- Pearson, I. V., M. D. Page, et al. (2003). "A mutant of Paracoccus denitrificans with disrupted genes coding for cytochrome c550 and pseudoazurin establishes these two proteins as the in vivo electron donors to cytochrome cd1 nitrite reductase." *J Bacteriol* **185**(21): 6308-15.
- Peters, A., C. Kulajta, et al. (2008). "Stability of the cbb3-type cytochrome oxidase requires specific CcoQ-CcoP interactions." *J Bacteriol* **190**(16): 5576-86.
- Petersen, C. and L. B. Moller (2000). "Control of copper homeostasis in Escherichia coli by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR." *Gene* **261**(2): 289-98.
- Phung, L. T., G. Ajlani, et al. (1994). "P-type ATPase from the cyanobacterium Synechococcus 7942 related to the human Menkes and Wilson disease gene products." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9651-4.
- Pilon, M., S. E. Abdel-Ghany, et al. (2006). "Copper cofactor delivery in plant cells." *Curr Opin Plant Biol* **9**(3): 256-63.
- Pinta, V., M. Picaud, et al. (2002). "Rubrivivax gelatinosus acsF (previously orf358) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester." *J Bacteriol* **184**(3): 746-53.
- Pitcher, R. S. and N. J. Watmough (2004). "The bacterial cytochrome cbb3 oxidases." *Biochim Biophys Acta* **1655**(1-3): 388-99.
- Pontel, L. B., M. E. Audero, et al. (2007). "GolS controls the response to gold by the hierarchical induction of Salmonella-specific genes that include a CBA efflux-coding operon." *Mol Microbiol* **66**(3): 814-25.
- Pontel, L. B. and F. C. Soncini (2009). "Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria." *Mol Microbiol* **73**(2): 212-25.
- Poole, A. M., D. T. Logan, et al. (2002). "The evolution of the ribonucleotide reductases: much ado about oxygen." *J Mol Evol* **55**(2): 180-96.
- Potter, L., P. Millington, et al. (2000). "Survival of bacteria during oxygen limitation." *Int J Food Microbiol* **55**(1-3): 11-8.
- Preisig, O., R. Zufferey, et al. (1996). "The Bradyrhizobium japonicum fixGHIS genes are required for the formation of the high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase." *Arch Microbiol* **165**(5): 297-305.
- Puig, S., N. Andres-Colas, et al. (2007). "Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications." *Plant Cell Environ* **30**(3): 271-90.
- Puig, S. and D. J. Thiele (2002). "Molecular mechanisms of copper uptake and distribution." *Curr Opin Chem Biol* **6**(2): 171-80.

- Py, B., P. L. Moreau, et al. "Fe-S clusters, fragile sentinels of the cell." Curr Opin Microbiol **14**(2): 218-23.
- Quaranta, D., R. McCarty, et al. (2007). "The copper-inducible cin operon encodes an unusual methionine-rich azurin-like protein and a pre-Q0 reductase in *Pseudomonas putida* KT2440." J Bacteriol **189**(14): 5361-71.
- Quaranta, D., M. M. McEvoy, et al. (2009). "Site-directed mutagenesis identifies a molecular switch involved in copper sensing by the histidine kinase CinS in *Pseudomonas putida* KT2440." J Bacteriol **191**(16): 5304-11.
- Rabin, R. S. and V. Stewart (1993). "Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **175**(11): 3259-68.
- Rae, T. D., P. J. Schmidt, et al. (1999). "Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase." Science **284**(5415): 805-8.
- Raimunda, D., M. Gonzalez-Guerrero, et al. (2010). "The transport mechanism of bacterial Cu(+)-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function." Biomaterials.
- Rensing, C., B. Fan, et al. (2000). "CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 652-6.
- Rensing, C. and G. Grass (2003). "*Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 197-213.
- Reyes, F., M. Gavira, et al. (1998). "Periplasmic nitrate-reducing system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: transcriptional and mutational analysis of the napKEFDABC gene cluster." Biochem J **331** (Pt 3): 897-904.
- Richardson, D., H. Felgate, et al. (2009). "Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle - could enzymic regulation hold the key?" Trends Biotechnol **27**(7): 388-97.
- Richardson, D. J. (2000). "Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment." Microbiology **146** (Pt 3): 551-71.
- Richardson, D. J. and N. J. Watmough (1999). "Inorganic nitrogen metabolism in bacteria." Curr Opin Chem Biol **3**(2): 207-19.
- Roberts, S. A., A. Weichsel, et al. (2002). "Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2766-71.
- Rock, J. D. and J. W. Moir (2005). "Microaerobic denitrification in *Neisseria meningitidis*." Biochem Soc Trans **33**(Pt 1): 134-6.
- Roh, J. H. and S. Kaplan (2000). "Genetic and phenotypic analyses of the rdx locus of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." J Bacteriol **182**(12): 3475-81.
- Romero, A., B. De la Cerda, et al. (1998). "The 2.15 Å crystal structure of a triple mutant plastocyanin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." J Mol Biol **275**(2): 327-36.
- Rycovska, A., L. Hatahet, et al. (2012). "The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter." Biochim Biophys Acta **1818**(5): 1342-50.
- Sabaty, M., C. Schwintner, et al. (1999). "Nitrite and nitrous oxide reductase regulation by nitrogen oxides in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. denitrificans IL106." J Bacteriol **181**(19): 6028-32.
- Sancenon, V., S. Puig, et al. (2004). "The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development." J Biol Chem **279**(15): 15348-55.
- Sancenon, V., S. Puig, et al. (2003). "Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*." Plant Mol Biol **51**(4): 577-87.

- Schreiber, K., R. Krieger, et al. (2007). "The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration." *J Bacteriol* **189**(11): 4310-4.
- Sears, H. J., P. J. Little, et al. (1997). "Identification of an assimilatory nitrate reductase in mutants of *Paracoccus denitrificans* GB17 deficient in nitrate respiration." *Arch Microbiol* **167**(1): 61-6.
- Shaw, A. L., G. R. Hanson, et al. (1996). "Cloning and sequence analysis of the dimethylsulfoxide reductase structural gene from *Rhodobacter capsulatus*." *Biochim Biophys Acta* **1276**(3): 176-80.
- Shu, C. J., L. E. Ulrich, et al. (2003). "The NIT domain: a predicted nitrate-responsive module in bacterial sensory receptors." *Trends Biochem Sci* **28**(3): 121-4.
- Silver, S. and L. T. Phung (1996). "Bacterial heavy metal resistance: new surprises." *Annu Rev Microbiol* **50**: 753-89.
- Simon, J., R. J. van Spanning, et al. (2008). "The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems." *Biochim Biophys Acta* **1777**(12): 1480-90.
- Simpson, P. J., D. J. Richardson, et al. (2010). "The periplasmic nitrate reductase in *Shewanella*: the resolution, distribution and functional implications of two NAP isoforms, NapEDABC and NapDAGHB." *Microbiology* **156**(Pt 2): 302-12.
- Singh, S. K., S. A. Roberts, et al. (2011). "Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper(I) and silver(I): functional role of a methionine-rich sequence." *J Biol Chem* **286**(43): 37849-57.
- Solano, F., P. Lucas-Elio, et al. (2001). "Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins." *FEMS Microbiol Lett* **204**(1): 175-81.
- Solioz, M., H. K. Abicht, et al. (2010). "Response of gram-positive bacteria to copper stress." *J Biol Inorg Chem* **15**(1): 3-14.
- Solioz, M., A. Odermatt, et al. (1994). "Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man." *FEBS Lett* **346**(1): 44-7.
- Solioz, M. and J. V. Stoyanov (2003). "Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*." *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 183-95.
- Sommer, F., J. Kropat, et al. (2010). "The CRR1 nutritional copper sensor in *Chlamydomonas* contains two distinct metal-responsive domains." *Plant Cell* **22**(12): 4098-113.
- Spiro, S. (1994). "The FNR family of transcriptional regulators." *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**(1-3): 23-36.
- Steunou, A. S., C. Astier, et al. (2004). "Regulation of photosynthesis genes in *Rubrivivax gelatinosus*: transcription factor PpsR is involved in both negative and positive control." *J Bacteriol* **186**(10): 3133-42.
- Steunou, A. S., S. Ouchane, et al. (2004). "Involvement of the C-terminal extension of the alpha polypeptide and of the PucC protein in LH2 complex biosynthesis in *Rubrivivax gelatinosus*." *J Bacteriol* **186**(10): 3143-52.
- Stewart, V., Y. Lu, et al. (2002). "Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* **184**(5): 1314-23.
- Stoof, J., E. J. Kuipers, et al. (2010). "An ABC transporter and a TonB ortholog contribute to *Helicobacter mustelae* nickel and cobalt acquisition." *Infect Immun* **78**(10): 4261-7.
- Storz, G. and J. A. Imlay (1999). "Oxidative stress." *Curr Opin Microbiol* **2**(2): 188-94.
- Stoyanov, J. V. and N. L. Brown (2003). "The *Escherichia coli* copper-responsive copA promoter is activated by gold." *J Biol Chem* **278**(3): 1407-10.
- Stoyanov, J. V., J. L. Hobman, et al. (2001). "CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA." *Mol Microbiol* **39**(2): 502-11.

- Swem, D. L. and C. E. Bauer (2002). "Coordination of ubiquinol oxidase and cytochrome cbb(3) oxidase expression by multiple regulators in *Rhodobacter capsulatus*." J Bacteriol **184**(10): 2815-20.
- Swem, D. L., L. R. Swem, et al. (2005). "Involvement of SenC in assembly of cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus*." J Bacteriol **187**(23): 8081-7.
- Swem, L. R., S. Elsen, et al. (2001). "The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*." J Mol Biol **309**(1): 121-38.
- Swem, L. R., B. J. Kraft, et al. (2003). "Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine." Embo J **22**(18): 4699-708.
- Tabata, A., I. Yamamoto, et al. (2005). "Differential regulation of periplasmic nitrate reductase gene (napKEFDABC) expression between aerobiosis and anaerobiosis with nitrate in a denitrifying phototroph *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*." Arch Microbiol **184**(2): 108-16.
- Teitzel, G. M., A. Geddie, et al. (2006). "Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **188**(20): 7242-56.
- Tetaz, T. J. and R. K. Luke (1983). "Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*." J Bacteriol **154**(3): 1263-8.
- Thompson, A. K., J. Gray, et al. (2012). "The roles of *Rhodobacter sphaeroides* copper chaperones PCu(A)C and Sco (PrrC) in the assembly of the copper centers of the aa(3)-type and the cbb(3)-type cytochrome c oxidases." Biochim Biophys Acta **1817**(6): 955-64.
- Thony-Meyer, L. (1997). "Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **61**(3): 337-76.
- Thorgersen, M. P. and D. M. Downs (2007). "Cobalt targets multiple metabolic processes in *Salmonella enterica*." J Bacteriol **189**(21): 7774-81.
- Tichy, H. V., K. U. Albién, et al. (1991). "Analysis of the *Rhodobacter capsulatus* puc operon: the pucC gene plays a central role in the regulation of LHII (B800-850 complex) expression." Embo J **10**(10): 2949-55.
- Tokuda, H. and S. Matsuyama (2004). "Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*." Biochim Biophys Acta **1693**(1): 5-13.
- Tosques, I. E., J. Shi, et al. (1996). "Cloning and characterization of nnrR, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3." J Bacteriol **178**(16): 4958-64.
- Totter, S., D. R. Harvie, et al. (2005). "Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones." Acc Chem Res **38**(10): 775-83.
- Totter, S., P. R. Rich, et al. (2001). "Two Menkes-type atpases supply copper for photosynthesis in *Synechocystis* PCC 6803." J Biol Chem **276**(23): 19999-20004.
- Totter, S., K. J. Waldron, et al. (2008). "Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding." Nature **455**(7216): 1138-42.
- Troup, B., C. Hungerer, et al. (1995). "Cloning and characterization of the *Escherichia coli* hemN gene encoding the oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase." J Bacteriol **177**(11): 3326-31.
- Tsukahara, J., K. Mukaiyama, et al. (2009). "Dissection of LolB function--lipoprotein binding, membrane targeting and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers." Febs J **276**(16): 4496-504.
- Waldron, K. J., S. J. Firbank, et al. (2010). "Structure and metal loading of a soluble periplasm cuproprotein." J Biol Chem **285**(42): 32504-11.

- Waldron, K. J., S. Tottey, et al. (2007). "A periplasmic iron-binding protein contributes toward inward copper supply." J Biol Chem **282**(6): 3837-46.
- Wang, H. and R. P. Gunsalus (2000). "The *nrfA* and *nirB* nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite." J Bacteriol **182**(20): 5813-22.
- Wiethaus, J., G. F. Wildner, et al. (2006). "The multicopper oxidase CutO confers copper tolerance to *Rhodobacter capsulatus*." FEMS Microbiol Lett **256**(1): 67-74.
- Winstedt, L., K. Yoshida, et al. (1998). "Cytochrome bd biosynthesis in *Bacillus subtilis*: characterization of the *cydABCD* operon." J Bacteriol **180**(24): 6571-80.
- Wintz, H., T. Fox, et al. (2003). "Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis." J Biol Chem **278**(48): 47644-53.
- Wood, N. J., T. Alizadeh, et al. (2002). "Two domains of a dual-function NarK protein are required for nitrate uptake, the first step of denitrification in *Paracoccus pantotrophus*." Mol Microbiol **44**(1): 157-70.
- Xue, Y., A. V. Davis, et al. (2008). "Cu(I) recognition via cation- π and methionine interactions in CusF." Nat Chem Biol **4**(2): 107-9.
- Yamasaki, H., S. E. Abdel-Ghany, et al. (2007). "Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*." J Biol Chem **282**(22): 16369-78.
- Yang, Z. M. and C. E. Bauer (1990). "*Rhodobacter capsulatus* genes involved in early steps of the bacteriochlorophyll biosynthetic pathway." J Bacteriol **172**(9): 5001-10.
- Ye, R. W., D. Haas, et al. (1995). "Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr." J Bacteriol **177**(12): 3606-9.
- Youvan, D. C., E. J. Bylina, et al. (1984). "Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction-center, B870 antenna, and flanking polypeptides from *R. capsulata*." Cell **37**(3): 949-57.
- Zeilstra-Ryalls, J., M. Gomelsky, et al. (1998). "Control of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **180**(11): 2801-9.
- Zeilstra-Ryalls, J. H. and S. Kaplan (1995). "Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene." J Bacteriol **177**(22): 6422-31.
- Zeilstra-Ryalls, J. H. and S. Kaplan (2004). "Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photosynthetic bacterial paradigm." Cell Mol Life Sci **61**(4): 417-36.
- Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido (1999). "Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7190-5.
- Zhang, L., M. Koay, et al. (2006). "Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms." J Am Chem Soc **128**(17): 5834-50.
- Zumft, W. G. (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol Mol Biol Rev **61**(4): 533-616.

ANNEXES

Tableau I : Amorces utilisées dans le chapitre II

Gène	Amorces	Séquence 5' to 3'
<i>copI</i>	copI-For copI-Rev	AGATGATCCGCCACTACGAGCGC CGTCGATCAGCTGGACCTGTCCGT
<i>copI</i>	copI-NcoI copI-XhoI	CTCTTGGAGCCCTCCATGGAGAACCGAAT CAGTTCGCGCCGCTCGAGTCGCACCACCAC
RT-PCR		
<i>copI</i>		ACCTCGTGCAGTTCCTGAAG CGACGAAGAAGCTGGAGAAG

Tableau II : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans le chapitre II

	Caractéristiques	Source
Souches		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK- , mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
BL21 (DE3)	F-ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)	Invitrogen
<i>R. gelatinosus</i> Souche S1	La souche sauvage (WT)	
<i>copITp</i>	La souche mutante <i>copI</i> (<i>copI::Tp</i>)	Ce travail
<i>copA copI</i>	Le double mutant <i>copA- copI</i> (<i>copA::Km</i> et <i>copI::Tp</i>)	Ce travail
COPI-H6	Souche exprimant CopI fusionnée avec 6 His	Ce travail
<i>copJTP</i>	La souche mutante <i>copJ</i> (<i>copJ::Tp</i>)	Ce travail
Plasmides		
pDrive	Vecteur de clonage (Amp ^R Km ^R)	Qiagen
pBleuscript KS ⁺	Vecteur de clonage (Amp ^R)	Pharmacia
pUC4K	Plasmide contenant le cassette Km (Amp ^R Km ^R)	
p34S-Tp	Plasmide contenant le cassette Tp (Tp ^R)	
pDW9	Plasmide contenant le cassette Ω (Sp ^R , Sm ^R)	
pET28b	Vecteur d'expression (his6 tag, Km ^R)	
pB79-1	Plasmide pBBR1MSC-4 isolé de la banque génomique de S1 contenant un insert de 5 kb insert renfermant les gènes <i>cop</i>	Ce travail
pSI1	pDrive contenant 2.3 kb de la région des gènes <i>cop</i> dont <i>copI</i>	Ce travail
pSI2	A partir du plasmide pSI1, déletion d'un fragment de 0.73kb par digestion SacII-SacII localisé dans le gène <i>copI</i> , traité au fragment de klenow puis ligation avec la cassette Tp	Ce travail
pCopIH6	Le gène <i>copI</i> est cloné dans le plasmide pET28b au niveau des sites NcoI-XhoI.	Ce travail
pSJ1	La cassette Tp est insérée au niveau du site MscI localisé dans le gène <i>copJ</i> dans pSI1	Ce travail
pSJ2	Un fragment de 1,58 kb obtenu par digestion du pSJ1 avec EcoRI-SmaI puis cloné dans le plasmide KS ⁺	Ce travail

Amp^R, ampicilline résistant, Km^R, kanamycine résistant, Tp^R, triméthoprimine résistant, Tc^R, tetracycline résistant, Ω (Sp^R, Sm^R, spectinomycine et streptomycine résistant).

Tableau III : Amorces utilisées dans le chapitre III

Gène	Amorces	Sequence 5' to 3'
<i>napA</i>	napA-F1 napA-R1	ACCACCGGCCAGCGCAGGCCGCG GACGGCAAGCTCAAGTGCTACTGG
<i>napA</i>	napA-F1 napA-R2	ACCACCGGCCAGCGCAGGCCGCG ATGCGCACCTTCGGCATCGACGA
<i>nirS</i>	nirS-F1 nirS-R1	GGGCTTCTTCATGCGCAGC ACCGGCTTGCTCATCGGCA
<i>nirS</i>	nirS-F5 nirS-R1	CTGCCACGGCGCCCAGCGCACCC ACCGGCTTGCTCATCGGCA
<i>norB</i>	norB-F norB-R	ACCTCGTGCAGTTCCTGAAG CGACGAAGAAGCTGGAGAAG
<i>nirB</i>	nirB-F nirB-R	AGCCGGTGAAGTGTGTCTC AGCACCAGCTTCTGTAGACG

Tableau IV : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans le chapitre III

	Caractéristiques	Source
Souches <i>Escherichia coli</i> DH5 α BL21 (DE3) <i>R. gelatinosus</i> Souche S1 <i>napATp</i> <i>napAΩ</i> <i>nirSTp</i> <i>nirSΩ</i> <i>nirBTp</i> <i>norBTp</i>	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 F-ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3) Souche sauvage (WT) Le mutant <i>napA</i> (<i>napA::Tp</i>) Le mutant <i>napA</i> (<i>napA::Ω</i>) Le mutant <i>nirS</i> (<i>nirS::Tp</i>) Le mutant <i>nirS</i> (<i>nirS::Ω</i>) Le mutant <i>nirB</i> (<i>nirB::Tp</i>) Le mutant <i>norB</i> (<i>norB::Tp</i>)	Invitrogen Invitrogen Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail
Plasmides pDrive pBleuscript KS ⁺ pUC4K p34S-Tp pDW9 pB164-50 pNapA1 pNapA2 pNapA3 Pb36-81 pNirS1 pNirS2 pNirS3 pNirS4 pNirB1 pNirB2 pNorB1 pNorB2	Vecteur de clonage (Amp ^R Km ^R) Vecteur de clonage (Amp ^R) Plasmide contenant le cassette Km (Amp ^R Km ^R) Plasmide contenant le cassette Tp (Tp ^R) Plasmide contenant le cassette Ω (Sp ^R , Sm ^R) Plasmide pBBR1MSC-4 isolé de la banque génomique de S1 contenant un insert de 7,8 kb renfermant les gènes <i>nap</i> pDrive contenant 1.5 kb du gène <i>napA</i> La cassette Tp insérée au niveau du site BglII dans le gène <i>napA</i> dans pNapA1 La cassette Ω insérée au niveau du site BglII dans le gène <i>napA</i> dans pNapA1 Plasmide pBBR1MSC-4 isolé de la banque génomique de S1 contenant un insert de 6 kb renfermant les gènes <i>nir</i> pDrive contenant 1.4 kb du gène <i>nirS</i> Un fragment de 1,4 kb obtenu par digestion avec XhoI-BamHI à partir de pNirS1 est cloné dans KS ⁺ La cassette Tp insérée au niveau du site HindIII dans le gène <i>nirS</i> dans pNirS2 La cassette Ω insérée au niveau du site HindIII dans le gène <i>nirS</i> dans pNirS2 pDrive contenant un fragment de 1.47 kb du gène <i>nirB</i> PCR La cassette Tp insérée au niveau du site StuI dans le gène <i>nirB</i> dans pNirB1 pDrive contenant un fragment de 1.46 kb du gène <i>norB</i> Déletion d'un fragment de 0.55kb par digestion SacII-NcoII, traitement avec fragment de klenow puis ligation avec lacassette Tp au niveau du gène <i>nirB</i> dans le plasmide pNirB1	Qiagen Pharmacia Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail

Amp^R, ampicilline résistant, Km^R, kanamycine résistant, Tp^R, triméthoprime résistant, Tc^R, tétracycline résistant, Ω (Sp^R, Sm^R, spectinomycine et streptomycine résistant).

Listes des figures et des tableaux

Listes des figures :

Figure 1 : Les complexes membranaires impliqués dans le transport du Mg^{2+}	17
Figure 2 : Les systèmes de transports du fer	20
Figure 3 : Les mécanismes d'homéostasie du cuivre chez <i>Escherichia coli</i> : les systèmes <i>Cue</i> et <i>Cus</i>	25
Figure 4 : Représentation schématique d'une ATPase de type P	28
Figure 5 : Structure cristallographique de <i>CopA</i> de <i>Legionella pneumophila</i>	29
Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme de transport des ATPases de type P1B.	30
Figure 7 : Modèle fonctionnel du complexe <i>Cus</i> dans l'efflux du cuivre.....	33
Figure 8 : Mécanisme de détoxification du cuivre assuré par les protéines <i>Pco</i>	35
Figure 9 : Le système d'homéostasie du cuivre chez la cyanobactérie <i>Synechocystis</i> PCC6803.	38
Figure 10 : Modèle d'homéostasie du cuivre chez <i>E. hirae</i>	40
Figure 11 : Transport du cuivre dans les différentes cellules eucaryotes.	47
Figure 12 : Représentation schématique des complexes énergétiques mis en jeu lors de la photosynthèse.....	52
Figure 13 : Vue cytoplasmique de la structure de l'antenne LH2 de <i>R. acidophila</i> 10050.....	53
Figure 14: Structure cristallographique du centre réactionnel de <i>R. viridis</i>	55
Figure 15 : Voie de biosynthèse des tétrapyrolles.	57
Figure 16 : La voie de biosynthèse de la chlorophylle <i>a</i> et de la bactériochlorophylle <i>a</i>	59
Figure 17 : Organisation du cluster photosynthétique chez <i>R. gelatinosus</i>	61
Figure 18 : Les complexes énergétiques de la chaîne respiratoire aérobie.	63
Figure 19: Le complexe <i>bc₁</i>	64
Figure 20: Structure de l'oxydase <i>cbb₃</i> de <i>P. stutzeri</i>	68
Figure 21 : Organisation des gènes de l'opéron qui code pour l'oxydase <i>cbb₃</i> de <i>R. gelatinosus</i>	69
Figure 22 : Présentation schématique des différentes chaînes de transports d'électrons chez <i>P. denitrificans</i> . .	71
Figure 23 : Les nitrates réductases bactériennes <i>NAR</i> , <i>NAP</i> et <i>NAS</i>	73
Figure 24 : Représentation schématique des nitrites réductases la <i>cd₁-NIR</i> et la <i>Cu-NIR</i>	77
Figure 25 : Représentation schématique de la nitrique oxyde réductase (<i>Nor</i>).	79
Figure 26 : Représentation schématique de la nitrous oxyde réductase (<i>NosZ</i>).	80
Figure 27 : La chaîne de transport des électrons au cours de la dénitrification.	82
Figure 28 : Représentation schématique de la régulation par <i>FnrL</i>	84
Figure 29 : Contrôle de l'activité de <i>PpsR</i> par la formation d'un pont disulfure.....	85
Figure 30 : Effet de différents métaux sur la croissance du mutant <i>copA</i>	97
Figure 31 : Expression de <i>ctpA</i> et <i>copA</i> en réponse au cuivre	98
Figure 32 : Alignement de séquence de <i>CopR</i> de <i>R. gelatinosus</i> avec <i>CueR</i> d' <i>E. coli</i>	99
Figure 33 : Alignement de séquence de <i>CopR</i> avec <i>CadR</i> de <i>R. gelatinosus</i>	100
Figure 34 : Effet de cuivre sur le cluster [4Fe-4S] de <i>HemN-H6</i> et <i>BchE-H6</i> de <i>R. gelatinosus</i>	101
Figure 35 : Spectres l'absorption dans UV-visible après l'ajout du dithionite de sodium.....	102
Figure 36 : Effet de l'excès de cuivre (1200 μ M) sur l'expression des protéines solubles.....	111
Figure 37 : Les gènes codant les protéines <i>CopI</i> et <i>CopJ</i> sont localisés en aval du gène <i>copA</i>	111
Figure 38 : Identification de <i>CopI</i> et <i>CopJ</i> par spectrométrie de masse.	112
Figure 39 : Modélisation de la structure de <i>CopI</i> dans SWISS-MODEL.....	114
Figure 40 : Alignement de séquences de la protéine <i>CopI</i> de <i>R. gelatinosus</i> (<i>R.gelat-CopI</i>) avec ses homologues chez <i>C. metallidurans</i> CH34 (<i>C.met-CopI</i>), <i>Aeromonas</i> (<i>A.</i>) <i>veronii</i> (<i>A.ver-CopC</i>), <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (PA2807) et la plastocyanine de <i>Synechocystis</i>	115
Figure 41 : Alignement de séquences de la protéine <i>CopJ</i> de <i>R. gelatinosus</i> (<i>RG_CopJ</i>) avec ses homologues chez <i>L. cholodnii</i> SP-6 (<i>Lcho_1268</i>), chez <i>Achromobacter</i> sp. AO22 (<i>AO22_CopG</i>), et <i>C. metallidurans</i> CH34 (<i>CopG</i>).	117
Figure 42 : Alignement de séquences de la protéine <i>CopH</i> de <i>R. gelatinosus</i> (<i>RG_CopH</i>) avec ses homologues chez <i>L. cholodnii</i> SP-6 (<i>Lcho_1263</i>), chez <i>R. gelatinosus</i> IL144 (<i>RG_IL144</i>), et <i>R. benzoatilyticus</i> JA2 (<i>RB_JA2</i>).	118
Figure 43 : Effet du cuivre sur l'expression de <i>copI</i> par RT-PCR.....	120
Figure 44 : Effet du cuivre sur l'expression de la protéine <i>CopI</i> par Western blot.....	121
Figure 45 : Effet du cuivre sur l'expression de <i>CopI</i> dans la souche <i>copR::Tp</i>	122
Figure 46 : Effet du cuivre sur la croissance du mutant <i>copI</i>	123
Figure 47 : L'effet du cuivre sur la croissance mutant <i>copI</i> en milieu liquide dans des conditions photosynthétiques anérobies (A) et respiratoires aérobies (B).....	124

Figure 48 : Effet du cuivre sur la croissance du mutant <i>copA⁻copI</i>	125
Figure 49 : Détection de l'expression de la protéine CopI dans la fraction soluble isolée à partir de la souche sauvage de <i>R. gelatinosus</i> cultivée en micro-aérobie en présence de 1,6 et 1000 μM CuSO_4	127
Figure 50 : Western blot des différentes fractions obtenues après traitement au Tris/HCL et du Tris/HCL avec du NaCl des membranes du wt cultivé en présence de 1,2 mM Cu en micro-aérobie en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce).....	128
Figure 51 : Protocole de purification de CopI en utilisant différentes colonnes de chromatographie (DEAE, CM et GF).....	129
Figure 52 : Analyse des fractions non retenues et des fractions éluées de la DEAE sur un gel dénaturant SDS-PAGE et par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce).....	130
Figure 53 : Fractions d'éluions de la CM obtenues à partir de la fraction non retenue de la DEAE analysées sur un gel dénaturant SDS.....	131
Figure 54 : Densité optique à 280, 439 et 581 nm enregistrée au cours de la filtration sur gel (GF) en fonction du volume « d'éluion ».....	132
Figure 55 : Analyse des fractions de la GF sur un gel dénaturant SDS-PAGE 14% coloré au bleu de coomassie (A) et par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce) (B).....	133
Figure 56 : Analyse des fractions de la GF réalisées à partir du produit d'éluion de la CM1 sur un gel SDS-Page coloré au bleu de coomasie.....	135
Figure 57 : Effet du cuivre sur la croissance du mutant <i>copI</i>	136
Figure 58 : Effet du cuivre sur la croissance mutant <i>copI</i> en milieu liquide dans des conditions photosynthétiques anérobies (A) et respiratoires aérobies (B).....	137
Figure 59 : Modèle proposé chez <i>R. gelatinosus</i> concernant l'efflux du cuivre.....	147
Figure 60 : Transfert du cuivre et toxicité du cuivre en anaérobie microaérobie chez la souche sauvage wt et les mutants <i>copA⁻</i> , <i>copI</i> et <i>copA⁻copI</i>	149
Figure 61 : Stratégie de la mutagenèse par le transposon au Tn5.....	157
Figure 62 : Sensibilité au cuivre des supresseurs <i>scopA</i> comparée à la souche <i>copA⁻</i>	157
Figure 63 : Système LolABCDE impliqué dans l'adressage des lipoprotéines vers la membrane externe	158
Figure 64 : Système FeoABC.....	160
Figure 65 : Système de transport du nickel de type ABC.....	161
Figure 66 : La chaîne de dénitrification.....	166
Figure 67 : Organisation de l'opéron du nitrate réductase périplasmique (Nap).....	167
Figure 68 : Etapes de clonage et d'inactivation du gène <i>napA</i>	170
Figure 69 : Organisation de l'opéron de la nitrite réductase (<i>cd₁Nir</i>) de <i>R. gelatinosus</i>	171
Figure 70 : Etapes de clonage et d'inactivation du gène <i>nirS</i>	173
Figure 71 : Opéron <i>nirBDC</i> codant pour une nitrite réductase assimilatrice NAD(P)H dépendante chez <i>R. gelatinosus</i>	174
Figure 72 : Etapes de clonage et d'inactivation du gène <i>nirD</i>	176
Figure 73 : Organisation de l'opéron de l'oxyde nitrique réductase (Nor) de <i>R. gelatinosus</i>	177
Figure 74 : Etapes de clonage et d'inactivation du gène <i>norB</i>	178
Figure 75 : Organisation de l'opéron de l'oxyde nitreux réductase (Nos) de <i>R. gelatinosus</i>	179
Figure 76 : Analyse de l'expression de CopA et CopI dans la souche <i>CopA-H6</i> et <i>copI⁻</i> en réponse au cuivre et au cadmium par western blot en utilisant la sonde HisProbe-HRP (Pierce).....	187
Figure 77 : Deux systèmes différents de tolérance du cuivre chez les bactéries.....	188
Figure 78 : CtpA et CopA deux ATPases homologues deux rôles physiologiques distinctes dans la cellule.....	193

Listes des tableaux :

Tableau I : Amorces utilisées dans le chapitre II	214
Tableau II : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans le chapitre II	215
Tableau III : Amorces utilisées dans le chapitre III	216
Tableau IV : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans le chapitre III	217

Résumé

L'adaptabilité des cellules aux changements environnementaux repose sur leur capacité à mettre en place des complexes enzymatiques qui régulent leurs différentes voies métaboliques. Ces complexes protéiques nécessitent des cofacteurs (hème et métaux) comme le cuivre. En effet, le cuivre est un oligoélément essentiel pour la survie des organismes vivants, il est notamment présent dans des complexes tels que la cytochrome *c* oxydase de la chaîne respiratoire aérobie. Cependant, l'excès de Cu est aussi néfaste pour la cellule. Il génère du stress oxydatif responsable de divers dommages cellulaires. Il est donc nécessaire aux cellules de contrôler la prise en charge du cuivre afin d'assurer la régulation de sa concentration intracellulaire.

Dans ce travail, nous avons étudié le système de tolérance au cuivre chez *Rubrivivax gelatinosus*. J'ai identifié plusieurs gènes impliqués dans ce système, un de ces gènes code pour un transporteur de cuivre CopA (homologue aux ATP7A/ATP7B de l'homme). Les autres gènes codent pour : un régulateur de ce système sensible aux variations du cuivre CopR et deux protéines solubles (CopI et CopJ) fortement induites dans des conditions d'excès de cuivre. J'ai également montré que malgré l'homologie de séquence entre les pompes à cuivre CopA et CtpA (identifiées auparavant au laboratoire) ; elles remplissent deux rôles physiologiques différents dans la cellule. CopA est vitale pour la tolérance au Cu alors que CtpA a un rôle dans l'insertion du Cu au sein des cuproprotéines. Par ailleurs, j'ai montré qu'en absence de CopA, la toxicité du cuivre est plus importante dans les conditions de croissance en microaérobie ou en photosynthèse anaérobie. En effet, l'excès du Cu affecte la voie de biosynthèse des porphyrines (hèmes et bactériochlorophylles) reflété par l'accumulation d'un intermédiaire de cette voie, la coproporphyrine III. Cette accumulation résulte de l'effet de l'excès du cuivre sur la coproporphyrine III oxydase (HemN) probablement en déstabilisant son cluster [4Fe-4S]. Ces résultats sont soutenus par le fait que l'effet toxique du cuivre sur les tétrapyrrolles n'est pas observé à forte aération en raison de la substitution de HemN par une enzyme à centre bimétalliques HemF. Cette dernière tolère et utilise l'oxygène, notre étude suggère qu'elle tolère aussi le cuivre. Les résultats obtenus sur les cibles du cuivre en anaérobie au cours de cette étude ainsi que celle publiés par Macomber (Macomber and Imlay 2009), suggèrent que les métaux ont pu éventuellement jouer un rôle dans l'émergence des enzymes à clusters bimétalliques lors du passage à une atmosphère oxygénique permettant une adaptation à l'augmentation de la toxicité de certains métaux.

L'ensemble des résultats obtenus à partir de l'analyse des différents mutants au cours de cette étude sur la tolérance au cuivre chez *R. gelatinosus* me permet de proposer un modèle d'efflux du cuivre différent de celui d'*E. coli*. Je propose d'attribuer un rôle crucial aux protéines solubles CopI et CopJ qui fixeraient probablement le cuivre grâce aux nombreux résidus histidines et méthionines. Leurs rôles seraient soit de séquestrer le cuivre au niveau du périplasme, soit de l'oxyder ou encore de l'excréter vers un système d'efflux de la membrane externe afin de le chasser de la cellule.

