

TITRE DE LA PROPOSITION : HOMEOSTASIE DU CUIVRE CHEZ *Rubrivivax gelatinosus* : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE D'UNE NOUVELLE PROTEINE (CopI).

EQUIPE D'ACCUEIL :

Intitulé de l'Unité : I2BC –UMR 9198

Nom du responsable de l'Unité : Thierry Meinzel

Département : Microbiologie

Equipe d'accueil : Adaptation bactérienne aux changements environnementaux.

Site web de l'équipe : <http://www.i2bc.paris-saclay.fr/spip.php?rubrique101>

Nom du responsable de l'équipe : Soufian Ouchane

Adresse : CNRS avenue de la terrasse Bâtiment 26 - 91198 Gif sur Yvette

Responsable de l'encadrement de M2 : Anne Durand (MCF)

Tél : 01 69 82 31 65

Email : anne.durand@i2bc.paris-saclay.fr

Composition de l'équipe : 1 technicienne CNRS / 1 doctorante / 1 DR-CNRS / 1 CR1 CNRS/ 3 MCF Paris Sud/ 1 Pr émérite

RESUME DU PROJET :

Le **cuivre** est un métal biologique important ; c'est un cofacteur redox nécessaire à l'activité de plusieurs enzymes. Cependant, le cuivre est toxique à fortes concentrations. Il est d'ailleurs utilisé comme agent antimicrobien par le système immunitaire lors d'une infection, mais aussi en agriculture et en milieu hospitalier. Ainsi, pour faire face à la toxicité du cuivre, les bactéries ont développé des systèmes d'homéostasie diversifiés pour réguler le taux de cuivre intracellulaire.

Nos recherches ont notamment pour objectif d'identifier les protéines impliquées dans l'**homéostasie du cuivre** chez la bactérie photosynthétique environnementale *Rubrivivax gelatinosus*. Nous avons ainsi identifié 3 protéines impliquées dans ce mécanisme : (i) l'ATPase à cuivre CopA, assurant l'efflux du cuivre du cytoplasme vers le périplasme ; (ii) le régulateur transcriptionnel CopR et (iii) la nouvelle protéine à cuivre périplasmique **CopI** (*Rg_CopI*) dont la fonction est encore inconnue [Ref. 1 et 2]. CopI serait-elle une chaperone à cuivre ou une protéine de stockage du cuivre et/ou a-t-elle une activité d'oxydation du cuivre ?

Ce projet de stage propose donc de compléter la caractérisation fonctionnelle et biochimique de *Rg_CopI* pour identifier sa fonction et aussi d'initier l'étude de son homologue chez *Vibrio cholerae*.

La **1^{ère} partie** du projet porterait sur l'identification chez *Rg_CopI* des sites de liaison du cuivre et de leur importance fonctionnelle.

Les séquences des gènes codant pour des formes mutées des 3 sites potentiels de fixation du cuivre seront obtenues par mutagenèse dirigée ou par synthèse et sous-clonées dans un plasmide répliatif. Ces plasmides seront introduits dans le mutant *copI* de *R. gelatinosus* (sensible au cuivre) pour i) analyser leur capacité à restaurer un phénotype de croissance en présence de cuivre, ii) exprimer les formes mutées dans cette souche.

La protéine CopI sauvage (dont la purification est au point) et les protéines mutées exprimées à un taux suffisant seront alors purifiées et caractérisées par différentes approches : structurale (cristallographie collaboration avec P. Arnoux, CEA Cadarache) ; spectrale (UV-visible ; analyse RPE : collaboration avec Pierre Dorlet, I2BC CEA Saclay) ; détermination du potentiel redox ;

quantification du cuivre associé (ICP-MS : plateforme UVSQ). Actuellement, une de ces formes mutées est produite et la purification reste à optimiser.

La 2^{ème} partie du projet porte sur la caractérisation de l'homologue de *Rg_CopI* chez la bactérie pathogène *Vibrio cholerae* (32% d'identité avec *Rg_CopI*, protéine aussi impliquée dans la tolérance au cuivre, mais non caractérisée). En effet, parmi les systèmes d'homéostasie du cuivre bactériens décrits à ce jour celui de *V. cholerae* est le plus proche de celui de *R. gelatinosus*. Ainsi, le gène *copI* de *V. cholerae* sera synthétisé et exprimé chez *R. gelatinosus copI* pour vérifier sa capacité à restaurer un phénotype de croissance en présence de cuivre. La purification de *Vc CopI* sera réalisée pour une caractérisation à plus long terme de la protéine.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats permettrait i) d'identifier des résidus de CopI impliqués dans la fixation et dans la tolérance au cuivre, ii) d'identifier le rôle de la protéine CopI, iii) de proposer un nouveau mécanisme d'homéostasie du cuivre bactérien et iv) d'étendre ce modèle à *V. cholerae*.

Au cours de ce stage, l'étudiant(e) utilisera des techniques de microbiologie, biologie moléculaire, génétique et biochimie. Ce projet pourra être poursuivi et complété au cours d'un doctorat, pour identifier et caractériser des partenaires potentiels de CopI. Une partie du projet portera notamment sur la caractérisation de CopJ, une protéine de fonction inconnue, impliquée dans la tolérance au cuivre, co-induite avec CopI en réponse à un stress au cuivre et ayant aussi un homologue chez *V. cholerae* (41% d'identité avec *Rg_CopJ*) impliqué dans la tolérance au cuivre et non caractérisé.

MOTS-CLES : Nouvelle protéine périplasmique à cuivre – Homéostasie du cuivre - *Rubrivivax gelatinosus* - *Vibrio cholerae*

PUBLICATIONS DE L'EQUIPE Publications récentes de l'équipe associées à ce sujet.

1- **Durand A**, Azzouzi A, Bourbon ML, Steunou AS, Liotenberg S, Maeshima A, Astier C, Argentini M, Saito S, Ouchane S. *c*-Type Cytochrome Assembly Is a Key Target of Copper Toxicity within the Bacterial Periplasm. **MBio**. 2015 Sep 22;6(5):e01007-15.

2- Azzouzi A, Steunou AS, **Durand A**, Khalifaoui-Hassani B, Bourbon ML, Astier C, Bollivar DW, Ouchane S. Coproporphyrin III excretion identifies the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN as a copper target in the Cu⁺-ATPase mutant *copA*⁻ of *Rubrivivax gelatinosus*. **Mol Microbiol**. 2013 Apr;88(2):339-51.

3- Liotenberg S, Steunou AS, **Durand A**, Bourbon ML, Bollivar D, Hansson M, Astier C, Ouchane S. Oxygen-dependent copper toxicity: targets in the chlorophyll biosynthesis pathway identified in the copper efflux ATPase CopA deficient mutant. **Environ Microbiol**. 2015 Jun;17(6):1963-76.

Thèse de doctorat Asma Azzouzi (2013). L'homéostasie du cuivre chez la protéobactérie *Rubrivivax gelatinosus*.