



Quelques observations sur le rôle des ATPases à cuivre HMA1 et PAA1 dans le contrôle de l'homéostasie du cuivre chloroplastique

Sylvain Boutigny

► **To cite this version:**

Sylvain Boutigny. Quelques observations sur le rôle des ATPases à cuivre HMA1 et PAA1 dans le contrôle de l'homéostasie du cuivre chloroplastique. Biologie végétale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. <tel-00538124>

HAL Id: tel-00538124

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00538124>

Submitted on 12 Feb 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 JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie végétale

Soutenue le 28 octobre 2009

par

Sylvain BOUTIGNY

QUELQUES OBSERVATIONS SUR LE RÔLE DES
ATPASES À CUIVRE, HMA1 ET PAA1, DANS LE
CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DU CUIVRE
CHLOROPLASTIQUE

Directeur de thèse : Norbert ROLLAND
Co-directeur de thèse : Daphné SEIGNEURIN-BERNY

COMPOSITION DU JURY :

Eva PEBAY-PEYROULA, Présidente
Michel LEBRUN, Rapporteur
Alain VAVASSEUR, Rapporteur
Patrice CATTY, Examineur
Daphné SEIGNEURIN-BERNY, Examineur
Norbert ROLLAND, Examineur

J'exprime toute ma gratitude à Madame Marylin Vantard pour m'avoir témoigné sa confiance en m'accueillant dans son laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame Eva Pebay-Peyroula, professeur à l'université de Grenoble, Messieurs Alain Vavasseur, Michel Lebrun et Patrice Catty pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse.

Je tiens à remercier tout spécialement Daphné Seigneurin-Berny, et Norbert Rolland qui ont dirigé cette étude pour la confiance qu'ils m'ont accordé lors de cette thèse, leur écoute, leur extrême disponibilité, leurs conseils, leur recul et les discussions toujours enrichissantes que nous avons pu avoir ensemble. Daphné et Norbert ont fait plus que me donner leur savoir et me former pendant ces trois années de thèse.

J'associe à ces remerciements Monsieur Jacques Joyard, directeur de recherche au CNRS, responsable du groupe enveloppe des chloroplastes.

Je remercie tout particulièrement Annie Frelet-Barrand avec qui les collaborations sur le projet *Lactococcus lactis* ont été un succès, Daniel Salvi et Lucas Moyet pour tout le travail que nous avons pu faire ensemble, leurs précieux conseils et leur bonne humeur.

Un grand merci pour toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler ; Corine Rivasseau pour l'ICP-MS, Aurélien Deniaud pour la SSM, Alexandra Kraut pour le séquençage spectrométrie de masse, Patrice Catty pour les expériences de phosphorylation, Anne Chevalier et Alain Vavasseur pour les interactions que nous avons pu avoir ensemble et les expériences en collaboration à venir.

Enfin, j'exprime ma sympathie pour les membres du laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale.

Sommaire

INTRODUCTION – DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

HOMEOSTASIE ET TRANSPORT DES METAUX DANS LA CELLULE ET LE CHLOROPLASTE

1

I.	HOMEOSTASIE DES METAUX DANS LE CHLOROPLASTE	2
A.	Fonction des ions métalliques dans le chloroplaste	2
B.	Transporteurs de métaux associés à l'enveloppe des chloroplastes	4
1.	Transport du calcium : l'ATPase AtACA1 (At1g27770)	4
2.	Transport du fer : PIC1 (At2g15290)	4
3.	Transport du magnésium : AtMRS2-11 (At5g22830)	5
4.	Transport du cuivre : les ATPases HMA1 (At4g37270) et PAA1 (At4g33520)	5
II.	HOMEOSTASIE DES IONS CUIVRE, ZINC ET FER DANS LA CELLULE	5
A.	L'entrée des métaux dans la plante et transport longue distance	6
1.	Acquisition des métaux dans la cellule	7
2.	Transport des racines aux parties aériennes du fer, cuivre et zinc	8
B.	Acteurs principaux de l'homéostasie des métaux au sein des cellules végétales	9
1.	Distribution intracellulaire du cuivre	9
2.	Distribution intracellulaire du fer	12
3.	Distribution intracellulaire du zinc	14
C.	Régulation transcriptionnelle des acteurs de l'homéostasie du fer, zinc et cuivre	16
1.	Régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre	16
2.	Régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer	17
3.	Régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'homéostasie du zinc	18
III.	LES ATPASES DE TYPE P	18
A.	Classification	19
B.	Les domaines caractéristiques d'une ATPase	20
C.	Le cycle réactionnel	21
D.	Les ATPases de la sous-famille P1B	22
1.	Présentation générale	22
2.	Caractéristiques structurales des sous-groupes des ATPases de type P1B	23
a)	<i>Le sous-groupe P1B1</i>	23
b)	<i>Le sous-groupe P1B2</i>	23
c)	<i>Le sous-groupe P1B3</i>	24
d)	<i>Le sous-groupe P1B4</i>	25
e)	<i>Le sous-groupe P1B5</i>	25
f)	<i>Le sous-groupe P1B6</i>	26
3.	Les ATPases de type P1B d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
IV.	LES ATPASES DE TYPES P1B ASSOCIEES AU CHLOROPLASTE	27

A.	PAA1/HMA6, une ATPase de l'enveloppe des chloroplastes impliquée dans l'import du cuivre	27
1.	Impact de la délétion de PAA1 sur la photosynthèse	27
2.	Impact de la délétion de PAA1 sur le contenu en cuivre chloroplastique	28
3.	Impact de la délétion de PAA1 sur les isoformes des SOD	28
B.	PAA2/HMA8, une ATPase à cuivre associée aux thylacoïdes	29
1.	Impact de la délétion de PAA2 sur la photosynthèse	29
2.	PAA2 est requise pour le transport de cuivre vers les thylacoïdes	29
C.	HMA1, une ATPase à cuivre associée à l'enveloppe des chloroplastes	30
1.	Analyse fonctionnelle de l'ATPase HMA1, approche par expression en levure	30
2.	Analyse fonctionnelle de l'ATPase HMA1, approche <i>in planta</i>	31
3.	Rôles respectifs de HMA1 et PAA1 dans l'enveloppe des chloroplastes ?	32
V.	OBJECTIFS DU TRAVAIL	34
A.	Etude des rôles respectifs de HMA1 et PAA1 <i>in planta</i>	34
B.	Caractérisation <i>in vitro</i> des deux ATPases HMA1 et PAA1	35

MATERIEL ET METHODES GENERALES **37**

I.	MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE	37
A.	Présentation du modèle végétal utilisé : <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
B.	Conditions de culture d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	37
1.	Conditions de culture <i>in vitro</i>	37
2.	Condition de culture en terre	37
3.	Conditions particulières de culture	38
C.	Croisement entre deux lignées d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	38
D.	Purification de chloroplastes intacts à partir de feuilles d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	39
II.	TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES	40
A.	Dosage des protéines	40
B.	Extraction des protéines membranaires totales de feuilles d'<i>Arabidopsis</i>	40
C.	Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	40
1.	Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes (Chua, 1980)	40
2.	Coloration d'un gel au bleu de Coomassie	40
D.	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et immunomarquage	41
1.	Technique de transfert	41
2.	Immunomarquage et détection à l'aide de conjugué	41
a)	<i>Immunomarquage</i>	41
b)	<i>Détection avec le conjugué Strep-tactin HRP</i>	41
c)	<i>Révélation par mesure de la chimiluminescence</i>	42
III.	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	42
A.	Extraction d'ADN génomique de plante	42
B.	Synthèse d'oligonucléotides	42
C.	Amplification <i>in vitro</i> de fragments d'ADN	42
D.	Technique de séquençage de l'ADN	43

E.	Préparation d'ADN de plasmides	43
F.	Digestion d'ADN par des endonucléases	43
G.	Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose	43
H.	Préparation et transformation des bactéries compétentes	43
	1. Méthode utilisant le traitement au CaCl ₂ / choc thermique	44
	2. Technique d'électroporation	44
I.	Mutagenèse dirigée	44
J.	Etude de l'expression de gènes par RT-PCR	45
IV.	EXPRESSION STABLE DE PROTEINES CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	47
A.	Construction des vecteurs d'expression	47
B.	Préparation d'<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
C.	Transformation d'<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
D.	Transformation des plantes par trempage d'inflorescences	48
E.	Vérification de la présence et de l'intégrité du gène d'intérêt dans les agrobactéries transformées	49
F.	Sélection des surexprimeurs	49
V.	TECHNIQUES SPECIFIQUES AU SYSTEME D'EXPRESSION PROCARYOTE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>	49
A.	Souches, plasmides et milieux de culture spécifiques au système <i>Lactococcus</i>	50
B.	Construction des vecteurs d'expression	51
	1. Clonage direct dans le vecteur d'expression pNZ8148	51
	2. Clonage utilisant la technologie Gateway®	52
	a) Clonage dans le vecteur d'entrée Gateway pENTR TM /D-TOPO®	52
	b) Clonage dans le vecteur navette, pBluescript-RfA	52
	c) Clonage dans le vecteur d'expression pNZ8148	53
C.	Transformation des bactéries <i>Lactococcus</i>	53
1.	Préparation des bactéries <i>Lactococcus</i> électrocompétentes	53
2.	Transformation par électroporation	54
3.	Préparation de l'ADN plasmidique	54
D.	Stock glycérol	54
E.	Induction de l'expression des protéines recombinantes chez <i>Lactococcus</i>	55
	1. Préparation de la nisine	55
	2. Expression de protéines	55
F.	Extraction des protéines membranaires de <i>L. lactis</i>	55
	1. Extraction des protéines membranaires après utilisation de la presse de French	56
	2. Extraction des protéines membranaires après utilisation du disrupteur	56
G.	Solubilisation et purification de protéines membranaires issues de <i>L. lactis</i>	57
	1. Solubilisation des protéines membranaires en présence de détergent	57
	2. Purification par affinité sur résine Strep- <i>Tactin</i>	57
VI.	TECHNIQUES D'ETUDE DES ATPASES DE TYPE P	58
A.	Mesure de l'activité ATPasique	58
	1. Mesure de l'activité ATPase grâce à un système couplé	58
	a) Description du système expérimental	58
	b) Mode opératoire	58

2.	Mesure de l'activité ATPase par dosage du phosphate inorganique	59
a)	<i>Description du système expérimental</i>	59
b)	<i>Mode opératoire</i>	59
B.	Protéolyse limitée à la trypsine	59
C.	Mesure de phosphorylation par incorporation de Pi radioactif	60
VII.	AUTRE TECHNIQUE : DOSAGE DE METAUX PAR ICP-MS	60

CHAPITRE I

ETUDE DES ROLES RESPECTIFS DE HMA1 ET DE PAA1

IN PLANTA

63

I.	ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES PAA1 ET HMA1	64
A.	Effet de l'intensité lumineuse et de la concentration en cuivre dans le milieu de culture sur l'expression de gènes liés à l'homéostasie du cuivre	65
B.	Effet de l'intensité lumineuse et de la concentration en zinc sur l'expression des gènes liés à l'homéostasie du cuivre	67
C.	Conclusion	69
II.	RECHERCHE DE NOUVELLES FONCTIONS DE HMA1 IN PLANTA	70
A.	Effet d'un stress salin sur des plantes exprimant différenciellement HMA1	70
B.	Analyse de la croissance du mutant <i>hma1</i> en condition photoautotrophe	75
C.	Conclusion	77
III.	MISE EN EVIDENCE D'UNE TROISIEME VOIE D'IMPORT DU CUIVRE DANS LE CHLOROPLASTE	79
A.	Stratégie utilisée pour l'obtention du double mutant	79
B.	Obtention du double mutant homozygote	82
C.	Caractérisation phénotypique du double mutant <i>hma1/paa1</i>	84
1.	Comparaison de la croissance du double mutant <i>hma1/paa1</i> par rapport à celle des simples mutants <i>hma1</i> et <i>paa1</i> .	84
2.	Le double mutant <i>paa1/hma1</i> est plus photosensible que le simple mutant <i>paa1</i>	85
3.	Croissance du double mutant <i>hma1/paa1</i> en condition photoautotrophe	87
D.	Conclusion	89
IV.	IMPACT DE LA SUREXPRESSION DE HMA1 DANS UN FOND GENETIQUE MUTANT PAA1	90
A.	Obtention de surexprimeurs homozygotes	91
B.	Phénotype des surexprimeurs HMA1 et HMA1ΔHIS dans <i>paa1</i>	92
C.	Dosages de métaux dans les chloroplastes des mutants <i>paa1-1</i> surexprimant HMA1 et HMA1ΔHIS	95

D.	Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du cuivre dans les mutants <i>paa1</i> exprimant HMA1 et HMA1ΔHIS	96
E.	Conclusion	99
V.	CONCLUSION - DISCUSSION	100
A.	Une nouvelle fonction pour HMA1	100
B.	La fonction de HMA1 est liée à l'homéostasie du cuivre	100
C.	La perte de fonction de PAA1 induit une modification profonde du contrôle de l'homéostasie du cuivre au sein de la cellule	101
D.	Mise en évidence d'une troisième voie d'import de cuivre dans le chloroplaste	102

CHAPITRE II

PRODUCTION DE HMA1 ET DE PAA1 EN SYSTEME HETEROLOGUE

103

I.	MISE EN PLACE DU SYSTEME D'EXPRESSION <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>	104
A.	Détermination des conditions d'expression	105
B.	Impact de la nisine sur le niveau d'expression de HMA1	106
C.	Extraction des protéines membranaires totales	108
II.	PRODUCTION DE DIFFERENTES FORMES DE HMA1 ET DE PAA1	109
A.	Impact des séquences <i>att</i> sur le niveau d'expression de HMA1	109
B.	Obtention de formes mutées de HMA1 et expression de PAA1	110
C.	<i>Lactococcus</i> : un système adapté pour l'expression d'ATPases de type P1B de plantes	112
D.	Conclusion	113
III.	SOLUBILISATION ET PURIFICATION DE HMA1 ET PAA1	113
A.	Solubilisation de HMA1 et de PAA1 à partir de membranes de <i>Lactococcus</i>	113
B.	Purification des protéines HMA1 et PAA1	117
C.	Conclusion	119
IV.	CONCLUSION - DISCUSSION	119

CHAPITRE III

VERS LA CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE HMA1 ET PAA1

121

I.	IMPACT DE L'EXPRESSION DE HMA1 SUR LA CROISSANCE DE <i>L. LACTIS</i>	121
A.	Impact de l'expression de HMA1 et de PAA1 sur la sensibilité au	

	cuivre de <i>L. lactis</i>	121
B.	Impact de l'expression de HMA1 et de PAA1 sur la concentration intracellulaire de cuivre de <i>L. lactis</i>.	126
C.	Analyse du niveau d'expression de <i>CopA</i> et <i>CopB</i> en réponse à l'expression des protéines HMA1 ou de PAA1 chez <i>L. lactis</i>	128
D.	Identification par spectrométrie de masse de protéines potentiellement induites par l'expression de HMA1 chez <i>L. lactis</i>	129
E.	Conclusion	131
II.	MESURE DE L'ACTIVITE ATPASIQUE DE HMA1 ET DE PAA1	133
A.	Mesure d'activité ATPase à l'aide d'un système couplé	133
	1. Mesure d'activité ATPase sur des extraits de protéines membranaires issus de souches de <i>L. lactis</i> après expression de HMA1	133
	2. Mesure d'activité ATPase sur des extraits fortement enrichis en HMA1 et en PAA1	135
B.	Dosage du phosphate inorganique libéré par hydrolyse de l'ATP	136
	1. Mesure d'activité ATPase sur des extraits membranaires bruts	136
	2. Mesure d'activité ATPase sur des fractions purifiées de HMA1 ; PAA1 et de HMA1-AKT	139
C.	Conclusion	142
III.	CAPACITE DE HMA1 ET DE PAA1 A LIER LEURS SUBSTRATS	144
A.	Protéolyse limitée à la trypsine	145
B.	Incorporation de Pi radioactif	148
	1. Etude de la phosphorylation de HMA1	151
	2. Etude de la phosphorylation de PAA1	152
C.	Conclusion	154
IV.	DISCUSSION	156
A.	Etude sur l'organisme <i>L. lactis</i> entier	157
B.	Mesure de l'activité ATPase sur membranes brutes de <i>Lactococcus</i> exprimant les ATPases recombinantes ou sur fractions purifiées de HMA1 et PAA1,	157
C.	Capacité de HMA1 et de PAA1 à lier leurs substrats	158

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **161**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **169**

ANNEXES **189**

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

A	Alanine
aa	Acide aminé
ADN (ADNc)	Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
ADN-T	ADN de Transfert
ADP (ATP)	Adénosine 5'-di(tri)phosphate
ARNm (ARNt)	Acide ribonucléique messenger (de transfert)
Asp	Aspartate
BLAST	<i>Basic Local alignment search tool</i>
C ₁₂ E ₈	Octaéthylène glycol monododécyl ether
Col	Columbia
C-terminal	Carboxy terminal
Cys	Cystéine
D	Aspartate
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimide
DDM	n-dodécyl-β-D-maltoside
dNTP	Désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétraacétique
Fe-S	Fer-soufre
G	Glycine
GFP	<i>Green fluorescente protein</i>
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
Hepes	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
His	Histidine
HRP	<i>Horse radish peroxydase</i>
K	Lysine
kb (pb)	Kilopaire de bases (paire de bases)
kDa	Kilo Dalton
KO	<i>Knock Out</i>
LDH	Lactate deshydrogénase
Lys	Lysine
MBD	<i>Metal binding domain</i>
NAD(H)	Nicotiamide adénine dinucléotide (réduit)
NICE	<i>NIsin Controlled gene Expression</i>
nt	Nucléotide
N-terminal	Amino terminal
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>

PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PC	Phosphatidylcholine
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEP	Phosphoénolpyruvate
PI	Phosphatidylinositol
Pi	Phosphate inorganique
PK	Pyruvate kinase
RNase	Ribonucléase
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAB	Sérum Albumine Bovine
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SOD	Superoxyde dismutase
T	Thréonine
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris Buffer Saline
TBST	Tris Buffer Saline Triton
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TM	Transmembranaire
Triose P	Triose phosphate
Tris	Acide N-tris(hydroxyl)méthyl-2-aminoéthane sulphonique
Triton X-100	Polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetraméthylbutyl)-phenyl ether
WS	Wassilewskija

Données bibliographiques

HOMEOSTASIE ET TRANSPORT DES METAUX DANS LA CELLULE ET LE CHLOROPLASTE

INTRODUCTION

Les chloroplastes sont des organites caractéristiques des cellules eucaryotes photo-autotrophes limités par une enveloppe constituée de deux membranes distinctes (Figure 1). Les chloroplastes possèdent des fonctions qui leur sont propres, comme la photosynthèse. Ils sont aussi impliqués dans la synthèse d'acides aminés, d'acides gras, de pigments, de vitamines (pour revue, voir Joyard *et al.*, 1998). Les chloroplastes assurent donc un rôle primordial dans le métabolisme de la cellule végétale et doivent entretenir des échanges permanents avec les autres compartiments de la cellule. Ceux-ci se font au niveau de l'enveloppe des chloroplastes, site privilégié d'interaction entre le stroma des chloroplastes et le cytosol de la cellule. Outre son rôle dans la biosynthèse de nombreux constituants spécifiques du plaste (lipides, prénylquinones, pigments ; pour revue, voir Block *et al.*, 2007), l'enveloppe est le siège de nombreuses activités de transport : système d'import des protéines chloroplastiques codées par le génome nucléaire (pour revue, voir Jarvis, 2008), transports de métabolites impliqués dans les voies biosynthétiques, ainsi que des systèmes de transport de cations et d'anions (pour revue, voir Weber *et al.*, 2005).

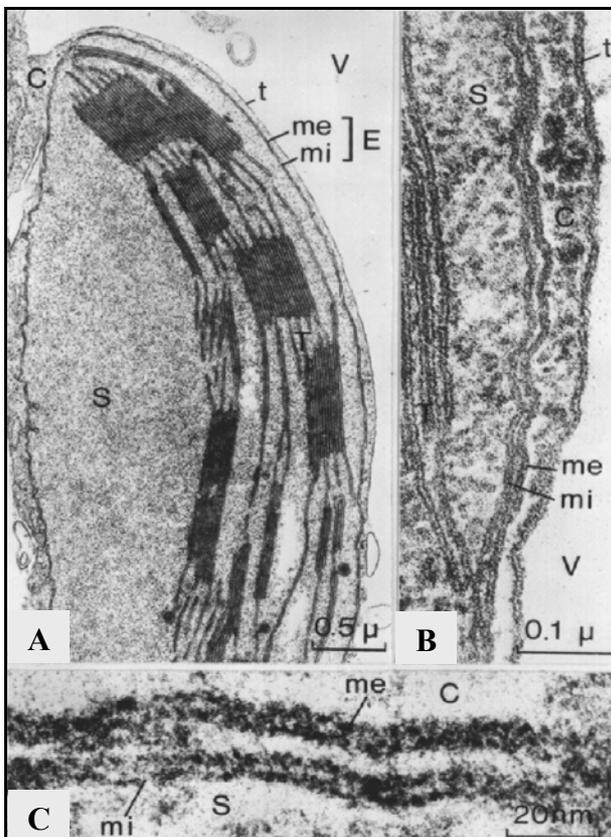


Figure 1 : Observation en microscopie électronique de l'enveloppe de chloroplastes d'épinard à différents grossissements.

L'enveloppe est formée de deux membranes distinctes qui se colorent avec la même intensité. A fort grossissement (B et C) et après traitement à l'acide tannique, la structure tripartite de chaque membrane est bien visible (Carde *et al.*, 1982).

Les figures A, B et C représentent des micrographies électroniques prises à divers grossissements.

Abréviations : C : cytosol, S : stroma, V : vacuole, E : enveloppe, T : thylacoïdes, me : membrane externe, mi : membrane interne, t : tonoplaste.

Les ions sont indispensables au fonctionnement d'une cellule ; ils sont impliqués dans toutes les fonctions cellulaires et métaboliques. Ils doivent être transportés à partir du sol dans les racines puis distribués à travers la totalité de la plante dans une grande diversité de compartiments, en traversant ainsi la membrane plasmique, le tonoplaste, l'enveloppe... Ceci est réalisé par un ensemble de systèmes de transports regroupant des protéines très diverses incluant les canaux ioniques, les perméases, les échangeurs ioniques.

Dans le chloroplaste, de nombreuses espèces d'ions sont présentes (H^+ , K^+ , Na^{2+} , Cl^- , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ...), ions tous essentiels au développement et au fonctionnement de l'organite. Par exemple, le pH du stroma et sa teneur en Mg^{2+} doivent rester élevés pour permettre un fonctionnement optimal à la lumière des enzymes du cycle de Benson et Calvin. D'autre part, les flux d'ions à travers les membranes du chloroplaste sont essentiels à la cellule. En effet, les transports d'ions présents dans les membranes chloroplastiques sont impliqués dans le développement et la régulation des gradients de protons et des potentiels de membrane à travers ces mêmes membranes (Neuhaus & Wagner, 2000). Malgré l'importance des flux d'ions dans le métabolisme du chloroplaste, peu de systèmes de transports ioniques ont déjà été identifiés et caractérisés dans cet organite.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à l'homéostasie et au transport des ions métalliques dans la cellule et le chloroplaste, et plus particulièrement au transport du cuivre, du zinc et du fer. Dans un premier temps, nous décrivons les connaissances actuelles sur les métaux de transition présents dans les chloroplastes et les systèmes de transport connus. Nous nous intéressons ensuite à l'homéostasie des ions cuivre, zinc et fer dans la cellule, à travers trois aspects : le transport à longue distance, la distribution intracellulaire et la régulation transcriptionnelle. Nous terminons cette partie bibliographique par une description générale de la famille des ATPases de type P, puis de la sous-famille des ATPases de type P_{1B} et enfin des ATPases de type P_{1B} associées au chloroplaste.

I. HOMEOSTASIE DES METAUX DANS LE CHLOROPLASTE

A. Fonction des ions métalliques dans le chloroplaste

Parmi les ions présents dans le chloroplaste, les ions métalliques (Zn, Cu, Ni, Co, Fe, Mn, Mg et Ca) ont des rôles clés dans de nombreux processus. Ces métaux sont le plus souvent liés à des protéines dans lesquelles ils ont des rôles structuraux et catalytiques : constituants de sites actifs d'enzymes, ils stabilisent les conformations tertiaires et quaternaires des protéines, ils forment des liaisons faibles avec les substrats contribuant à leur orientation lors de réactions chimiques. Ci-dessous sont décrites brièvement quelques fonctions de ces métaux dans les chloroplastes.

Le magnésium est l'atome central de la molécule de chlorophylle. La teneur en magnésium dans le stroma du chloroplaste contrôle l'association à l'enveloppe de la Mg-chélatase, protéine impliquée dans la synthèse de la chlorophylle (Nakayama *et al.*, 1998). Le Mg est aussi utilisé pour contrebalancer le gradient électrochimique formé de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes lors de la photosynthèse (Pour revue, voir Shaul, 2002).

Le manganèse a un rôle clé dans l'étape d'oxydation de la molécule d'eau lors de la photosynthèse (au niveau du PSII ; pour revue, voir Pittman, 2005).

Le calcium est principalement connu pour son rôle en tant que messager secondaire. Récemment une étude a montré que le chloroplaste joue un rôle important dans la signalisation calcique (Weinl *et al.*, 2008). D'autre part, le calcium fait partie du complexe d'oxydation de l'eau (ou Oxygen Evolving Complex) qui est constitué d'un cluster Mn_4Ca et de plusieurs protéines du PSII.

Le fer est un composant des centres Fer-Soufre. Le chloroplaste possède de nombreuses protéines Fe-S qui sont impliquées dans les réactions de transfert d'électrons photosynthétiques (centre Fe-S du cytochrome b_6/f , de la ferredoxine, du photosystème I), dans l'assimilation de l'azote et du sulfate... (pour revue, voir Ye *et al.*, 2006). Le fer est aussi un cofacteur de la superoxyde dismutase (SOD) à fer, localisée exclusivement dans le stroma des chloroplastes.

Le zinc a des rôles catalytiques et structuraux au sein d'enzymes. Dans le chloroplaste, le zinc est associé à la méthionine synthase, l'anhydrase carbonique, la superoxyde dismutase Cu/Zn, aux métalloprotéases FtsH...

Le cuivre est impliqué dans la photosynthèse et dans la réponse au stress oxydant. En effet, le cuivre est le cofacteur de la SOD Cu/Zn chloroplastique (impliquée dans la détoxification des espèces activées de l'oxygène) et de la plastocyanine (qui intervient dans les réactions de transfert d'électrons photosynthétiques).

Les données disponibles sur la concentration en métaux dans les chloroplastes sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Mg^{2+}	Fe^{2+}	Zn^{2+}	$Cu^{+/2+}$	Mn^{2+}	Ca^{2+}
5 mM (a)	0,13 mM (b)	0,13 mM (b)	60 μ M (b)	33 μ M (b)	Total : 5 à 10 mM (a, b)

Tableau 1 : concentration de quelques ions métalliques dans le stroma des chloroplastes. (a) Portis & Heldt, 1976 ; (b) Joyard & Douce, 1976.

Bien que ces métaux jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement du chloroplaste, leur import dans l'organite est encore très mal connu. Le paragraphe suivant décrit les quelques transporteurs de métaux associés à l'enveloppe du chloroplaste qui ont été caractérisés.

B. Transporteurs de métaux associés à l'enveloppe des chloroplastes

La caractérisation des systèmes de transport associées à l'enveloppe est fortement limitée par leur caractère hydrophobe et leur faible représentation (donc difficile voire impossible de les purifier par des approches classiques de biochimie) mais aussi par leur localisation subcellulaire (pas d'exemple à ce jour d'identification directe par complémentarité fonctionnelle de mutants de levure). Cinq transporteurs de métaux ont déjà été identifiés dans l'enveloppe des chloroplastes, dont seulement trois ont été bien caractérisés à ce jour.

1. Transport du calcium : l'ATPase AtACA1 (At1g27770)

Cette protéine appartient à la famille des Ca^{2+} -ATPases. Elle a été localisée dans l'enveloppe des plastes d'*Arabidopsis* par Huang et collaborateurs (1993) par immunomarquage avec un anticorps dirigé contre un domaine de la protéine. Cependant, les auteurs n'ont pas détecté d'activité ATPase Ca^{2+} dépendante ou d'import de Ca^{2+} ATP-dépendant dans leur préparation de membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes de pois. Roh et collaborateurs (1998) ont effectué des mesures de flux de calcium à travers des vésicules de membrane interne d'enveloppe de pois (chargées avec la sonde Fura-2 ou en utilisant du ^{45}Ca) qui n'ont pas permis non plus de mesurer ce type d'activité. Par ailleurs, la protéine AtACA1 (ou PEA1) a été identifiée dans le réticulum endoplasmique (Dunkley *et al.*, 2006) et n'est pas retrouvée dans le protéome de l'enveloppe des chloroplastes (Ferro *et al.*, 2002 ; Ferro *et al.*, 2003, Froehlich *et al.*, 2003 ; Ferro *et al.*, soumis). Les mesures d'activité réalisées par Roh et collaborateurs suggèrent que le transport du calcium à travers l'enveloppe se ferait par un mécanisme d'uniprot stimulé par un gradient de potentiel ou de pH, encore non caractérisé à ce jour. Ainsi, la présence et le rôle de cette ATPase dans le chloroplaste sont controversés. Les mécanismes permettant l'import et l'export du calcium restent encore largement méconnus.

2. Transport du fer : PIC1 (At2g15290)

PIC1 (ou "Permease In Chloroplasts 1") est une protéine contenant 4 hélices transmembranaires prédits, localisée dans la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes. Elle présente des homologies de séquence (24 % d'identité) avec des perméases de cyanobactéries (Duy *et al.*, 2007). La perte de la fonction de cette protéine induit un phénotype chlorotique, un retard de croissance des plantes qui ne peuvent se développer qu'en condition hétérotrophe. Le développement des chloroplastes est aussi fortement altéré dans les mutants KO et les chloroplastes de ces mutants accumulent de la ferritine. Enfin, l'expression de PIC1 en système hétérologue levure entraîne une accumulation de fer. Les résultats de Duy et collaborateurs (2007) suggèrent donc que PIC1 fonctionne comme un transporteur de fer à travers l'enveloppe des chloroplastes et serait donc impliqué dans l'homéostasie des métaux dans la cellule. A nouveau, une controverse existe pour cette protéine puisque ces hypothèses concernant la fonction de PIC1 contredisent les résultats de Teng et collaborateurs (2006) qui

suggèrent que cette protéine (nommée Tic21 dans cette étude) est un composant essentiel de la machinerie d'import des protéines dans les plastes, et du complexe TIC (Translocon associé à la membrane Interne) en particulier.

3. Transport du magnésium : AtMRS2-11 (At5g22830)

Les protéines AtMRS2 (10 gènes chez *Arabidopsis*) font partie de la superfamille des transporteurs de magnésium CorA (Pour revue, voir Moomaw & Maguire, 2008). L'expression de AtMRS2-11 en levure permet de compléter fonctionnellement des souches déficientes dans l'acquisition du magnésium. Les données *in planta* indiquent que le promoteur de cette protéine est principalement actif dans les stomates et le mésophile de jeunes feuilles. Des analyses par RT-PCR montrent que le niveau de transcrite varie de façon circadienne avec une expression plus forte en présence de lumière. Enfin, l'expression *in planta* de MRS2-11 fusionnée à la GFP et des expériences d'immunolocalisation indiquent que cette protéine est localisée dans les chloroplastes (Drummond *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que cette protéine aurait un rôle dans le transport du magnésium dans les chloroplastes mais ne présentent pas de données *in planta* validant cette hypothèse (absence d'analyse de mutants KO et pas de phénotypes associés aux plantes surexprimant cette protéine).

4. Transport du cuivre : les ATPases HMA1 (At4g37270) et PAA1 (At4g33520)

Deux autres transporteurs de métaux associés à l'enveloppe des plastes ont été caractérisés à ce jour. Il s'agit des ATPases de type P_{1B} HMA1 et PAA1 localisées dans l'enveloppe du chloroplaste (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Shikanai *et al.*, 2003). PAA1 serait la voie principale d'import du cuivre dans le chloroplaste et permettrait notamment d'alimenter l'ATPase à cuivre PAA2 localisée dans les thylacoïdes (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Les données *in planta* obtenues sur HMA1 montrent que cette protéine est impliquée dans l'homéostasie du cuivre et du zinc (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2009). Les résultats obtenus en système hétérologue levure indiquent que la spécificité ionique de HMA1 serait beaucoup plus large. En effet, cette ATPase pourrait aussi être impliquée dans le transport du cadmium, du cobalt et du calcium (Moreno *et al.*, 2008). Le rôle de ces protéines est détaillé à la fin de ce chapitre et dans les chapitres de résultats.

II. HOMEOSTASIE DES IONS CUIVRE, ZINC ET FER DANS LA CELLULE

Les métaux dits de transition comme le cuivre, le zinc, le manganèse, le fer, le cobalt, le nickel sont dits essentiels car ils sont nécessaires pour le fonctionnement des cellules. Cependant, ils peuvent devenir toxiques lorsqu'ils sont présents en excès dans les cellules (pour revue, lire Briat et Lebrun, 1999). Par exemple, les ions cuivre, manganèse et fer peuvent exister sous plusieurs états rédox, pouvant ainsi donner ou accepter des électrons

(d'où leurs implications dans les chaînes de transfert d'électron ou des mécanismes de détoxification). Une concentration trop élevée de ces métaux induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la réaction de Fenton. Cette formation d'ions superoxydes entraîne ainsi des dommages oxydatifs. Le zinc en excès est toxique car il peut déplacer des ions dans le site actif de protéines, les rendant ainsi inactives (Pilon *et al.*, 2009). Il est donc primordial pour les cellules de contrôler très finement l'homéostasie de ces métaux afin de pouvoir faire face à une carence ou à un excès de ces ions.

Les principaux mécanismes régulant l'homéostasie de ces métaux incluent le transport (du sol à la plante entière et dans les différents compartiments subcellulaires), la chélation et la détoxification par efflux ou séquestration dans les organites. Le transport inclut une grande variété de protéines membranaires dont les pompes ioniques (ou canaux ioniques) qui requièrent une quantité d'énergie considérable pour permettre le transport d'ions contre un gradient de concentration. Les transporteurs (perméases, échangeurs ioniques) permettent le passage d'ions dans le sens du gradient de concentration et peuvent fonctionner comme uniport ou cotransporteur. Bien que la concentration de ces métaux dans les cellules soit de l'ordre de la centaine de micromolaire, la concentration en ions cuivre, fer et zinc libres est considérée comme nulle (Changela *et al.*, 2003; Outten & O'Halloran, 2001). En effet, ces métaux sont immédiatement complexés à des molécules ou des peptides lors de leur entrée dans la cellule. Ces chélateurs regroupent des molécules comme des phosphates, des phytates, des polyphénols, du glutathion ou encore des petits peptides comme les phytochélatines et des protéines comme les métallothionines (Haydon & Cobbett 2007). Les métallochaperonnes, quant à elles, sont des métalloprotéines pouvant lier des métaux essentiels spécifiques afin de les délivrer à des protéines cibles.

A. L'entrée des métaux dans la plante et transport longue distance

Dans un premier temps, la plante doit rendre mobilisables les métaux présents dans le sol (Figure 2). En effet, les métaux peuvent être inaccessibles car ils sont souvent sous forme insolubles. Le zinc et le cuivre sont insolubles dans les sols à cause de leur adsorption sur l'argile, le calcaire ou la matière organique, alors que le fer est principalement trouvé sous forme d'hydroxydes de fer (Palmer & Guerinot, 2009). L'insolubilité est d'autant plus importante pour les sols alcalins. Pour s'affranchir de ce problème, les plantes ont développé une stratégie consistant à acidifier le sol pour rendre ces métaux accessibles. Ceci est réalisé grâce à une ATPase à protons (de la famille des AHA, *Arabidopsis* H⁺ ATPase) qui exporte des protons dans la rhizosphère entraînant une diminution locale du pH.

Les ions sont ensuite capables de diffuser dans l'apoplaste (voie apoplastique) avant d'être bloqués dans les racines par la bande de Caspari localisée dans l'endoderme. A ce stade, les métaux doivent être transportés de façon active au travers de la membrane plasmique vers l'espace symplastique où ils peuvent se déplacer vers les couches internes des cellules pour un

chargement dans les tissus vasculaires. Les transports des métaux dans le symplaste sont pris en charge par différentes familles de transporteurs.

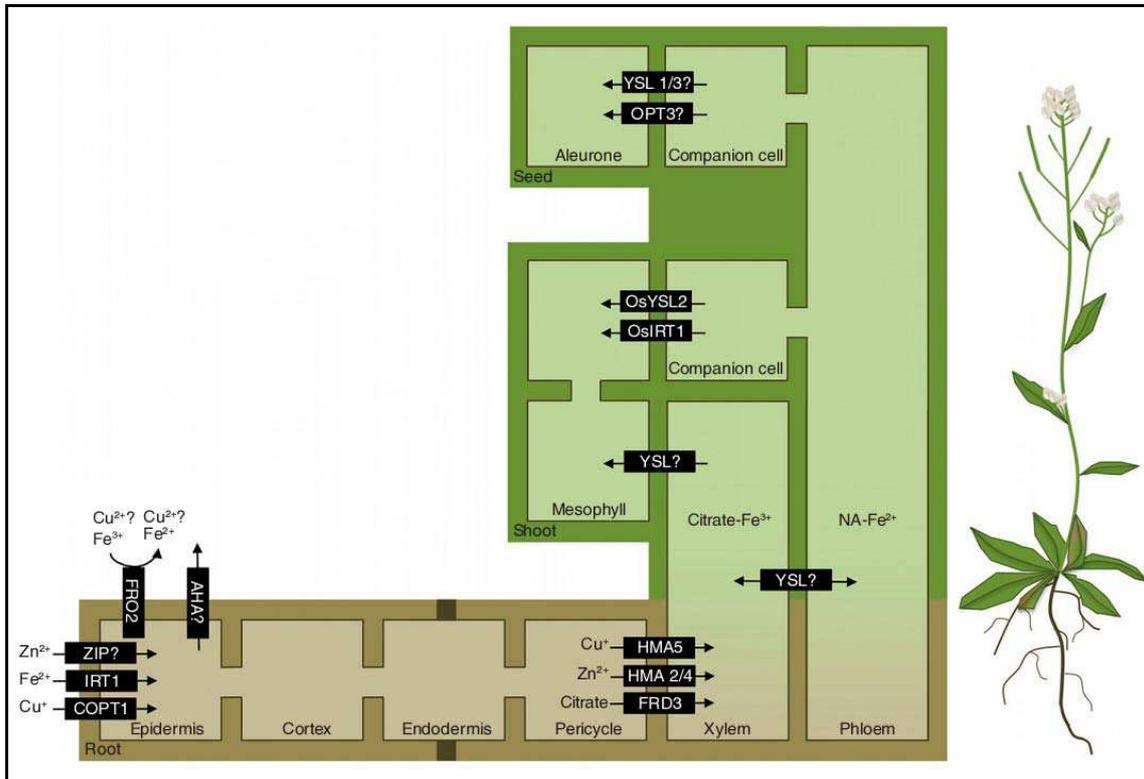


Figure 2 : Schéma représentant l'entrée du cuivre, du zinc et du fer dans la plante et leur transport à longue distance.

L'ATPase AHA permettrait d'acidifier la rhizosphère augmentant ainsi la solubilité des métaux. FRO2 est une réductase impliquée dans la réduction du fer et potentiellement du cuivre. Le fer, le zinc et le cuivre sont chargés dans le symplaste par des transporteurs présents dans l'épiderme (IRT1 pour le fer, un membre de la famille des ZIP pour le zinc et COPT1 pour le cuivre). Le transport vers le xylème impliquerait des protéines de la famille des ATPases de type P_{1B} et un transporteur de citrate (FRD3). Dans le xylème, les métaux sont transportés vers les parties aériennes par le flux lié à la transpiration et seraient ensuite livrés dans les parties aériennes par un transporteur de la famille des YSL. Les YSL pourraient aussi transférer les métaux vers le phloème, où ils pourraient être acheminés vers la graine. Les rectangles marron foncé représentent la bande Caspari. NA : nicotianamine. Schéma provenant de la revue de Palmer & Gueriot, 2009.

Ces systèmes de transport ont en général une affinité spécifique pour un métal dans un état d'oxydation particulier. Le zinc est toujours sous forme $2+$ dans les conditions physiologiques alors que le fer et le cuivre doivent être réduits avant leur import dans la cellule. Le Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} par les réductases FRO2 et FRO3. FRO2 est localisée dans la membrane plasmique et s'accumule en condition de carence en fer. Dans ces conditions, FRO2 est aussi capable de réduire le cuivre bien que son expression ne soit pas régulée par le cuivre. L'expression de FRO3 augmente lors de carence en fer et en cuivre suggérant un rôle de FRO3 dans l'acquisition du fer et du cuivre (pour revue, voir Puig *et al.*, 2007).

1. Acquisition des métaux dans la cellule

L'entrée du fer dans la cellule est prise en charge par IRT1 (Iron Regulated Transporter), membre de la famille des transporteurs d'ions divalents ZIP (ZRT, IRT-like Proteins). Ce

transporteur a été identifié par complémentation de mutants de levure. Des plantes déficientes pour cette protéine présentent une chlorose et d'importants défauts de croissance qui peuvent être supprimés par ajout de fer exogène. Les données obtenues en levure montrent que IRT1 est aussi capable de transporter le zinc, le manganèse, le cadmium mais pas le cuivre (Eide *et al.*, 1996 ; Korshunova *et al.*, 1999 ; Puig *et al.*, 2007).

Le cuivre est importé dans la cellule par le transporteur COPT1. Les protéines COPT sont les orthologues chez *Arabidopsis* du transporteur de levure CTR1. La famille conservée des CTR a pour fonction l'acquisition du cuivre à haute affinité de l'extérieur vers l'intérieur du cytoplasme des cellules eucaryotes (pour revue, voir Puig *et al.*, 2007). Les CTR sont de petites protéines intégrales avec trois hélices transmembranaires prédites (Dancis *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 2002) qui fonctionnent sous forme d'homotrimère. Les expériences de transport effectuée *in vivo* montrent que les protéines CTR sont spécifiques des ions Cu^+ avec un K_m inférieur au micromolaire (Eisses & Kaplan, 2002 ; Lee *et al.*, 2002). Les transporteurs COPT n'utilisent pas d'ATP pour l'import du cuivre mais leur capacité d'import est stimulée par le K^+ extracellulaire. COPT1 a été identifié par complémentation de mutants de levure. Les plantes exprimant des antisens *COPT1* présentent un contenu en cuivre réduit de 50 %, une augmentation de la taille des racines et un défaut de croissance sur milieu carencé en cuivre. L'expression de COPT1 augmente lors de carence en cuivre (pour revue, voir Puig *et al.*, 2007). D'autres membres de la famille COPT ont été identifiés par homologie de séquence, deux d'entre eux, COPT2 et COPT6 pourraient être aussi associés à la membrane plasmique. En plus de l'import du cuivre $1+$ par COPT1, le cuivre $2+$ pourrait être importé par des membres de la famille ZIP (Figure 3). En effet, les protéines AtZIP2 et AtZIP4 complètent des mutants de levure affectés dans l'import du cuivre et du zinc (Grotz *et al.*, 1998 ; Wintz *et al.*, 2003). D'autre part, chez *Arabidopsis*, l'expression de ces gènes est stimulée par une carence en cuivre et en zinc. Cependant, le rôle de ces protéines dans le transport de cuivre *in planta* nécessite de poursuivre leur caractérisation fonctionnelle. Ces 2 transporteurs seraient aussi impliqués dans le transport du zinc.

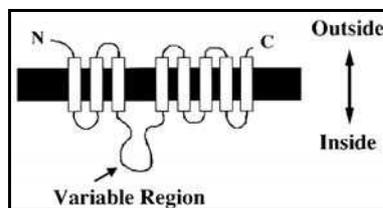


Figure 3 : Représentation schématique des protéines de la famille ZIP.

Ces protéines contiennent 8 hélices transmembranaires prédites et une région variable riche en histidines entre les segments transmembranaires 3 et 4. Image tirée de Guerinot, 2000.

2. Transport des racines aux parties aériennes du fer, cuivre et zinc

Une fois incorporés dans les racines, le fer, le cuivre et le zinc sont chargés dans le xylème pour permettre leur transport jusqu'aux parties aériennes de la plante.

Le zinc est exporté vers le xylème via les 2 ATPases de type P_{1B} HMA2 et HMA4 (Wong & Cobbett, 2009). Le double mutant *hma2-hma4* présente une accumulation du zinc dans les racines et une diminution de la quantité de ce métal dans les parties aériennes.

L'efflux de cuivre se ferait par HMA5, une autre ATPase de type P_{1B} (Andrés-Colás *et al.*, 2006). HMA5 est principalement exprimée dans les racines et un mutant déficient en HMA5 sur-accumule le cuivre dans les racines. On ne connaît pas pour l'instant de transporteur permettant le chargement direct du fer dans le xylème. Il est plutôt probable que le fer soit transporté sous forme chélatée à d'autres molécules dont le citrate. Récemment, il a été montré que le transporteur de citrate FRD3, appartenant à la famille des MATE (Multidrug And Toxin Efflux), exporte du citrate dans le xylème et est nécessaire pour le transport du fer dans les parties aériennes (Durrett *et al.*, 2007).

Ces métaux seraient ensuite transportés dans le phloème sous forme chélatée avec la nicotianamine (NA) (pour revue, voir Briat & Lebrun, 1999). Cette molécule est synthétisée dans la plante et aurait un rôle dans l'homéostasie du fer, du cuivre et du zinc (Haydon & Cobbett, 2007). Les transporteurs impliqués sont probablement YSL1 et YSL3, membres du groupe des YSL (Yellow Stripe-Like), une sous-famille des transporteurs OPT (OligoPeptide Transporter). Une étude récente montre que ces 2 transporteurs sont nécessaires pour une remobilisation du fer, du cuivre et du zinc vers les tissus foliaires (Waters *et al.*, 2007 ; Gendre *et al.*, 2007).

B. Acteurs principaux de l'homéostasie des métaux au sein des cellules végétales

Une fois transportés dans les différents tissus, les métaux doivent être correctement distribués dans l'ensemble des compartiments subcellulaires et à des concentrations non toxiques pour la cellule. Ceci peut se faire grâce à la présence de transporteurs spécifiques et de molécules ou protéines qui vont prendre en charge ces métaux. Le paragraphe suivant décrit succinctement les acteurs connus dans l'homéostasie du cuivre, du fer et du zinc.

1. Distribution intracellulaire du cuivre

Dans la cellule végétale, le cuivre est essentiel pour de nombreux processus comme la photosynthèse, la respiration, la perception de l'éthylène, le métabolisme des espèces activées de l'oxygène.... Le cuivre doit donc être acheminé dans de nombreux compartiments subcellulaires (Figure 4) comme le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, le chloroplaste et l'apoplaste (Marschner, 1995).

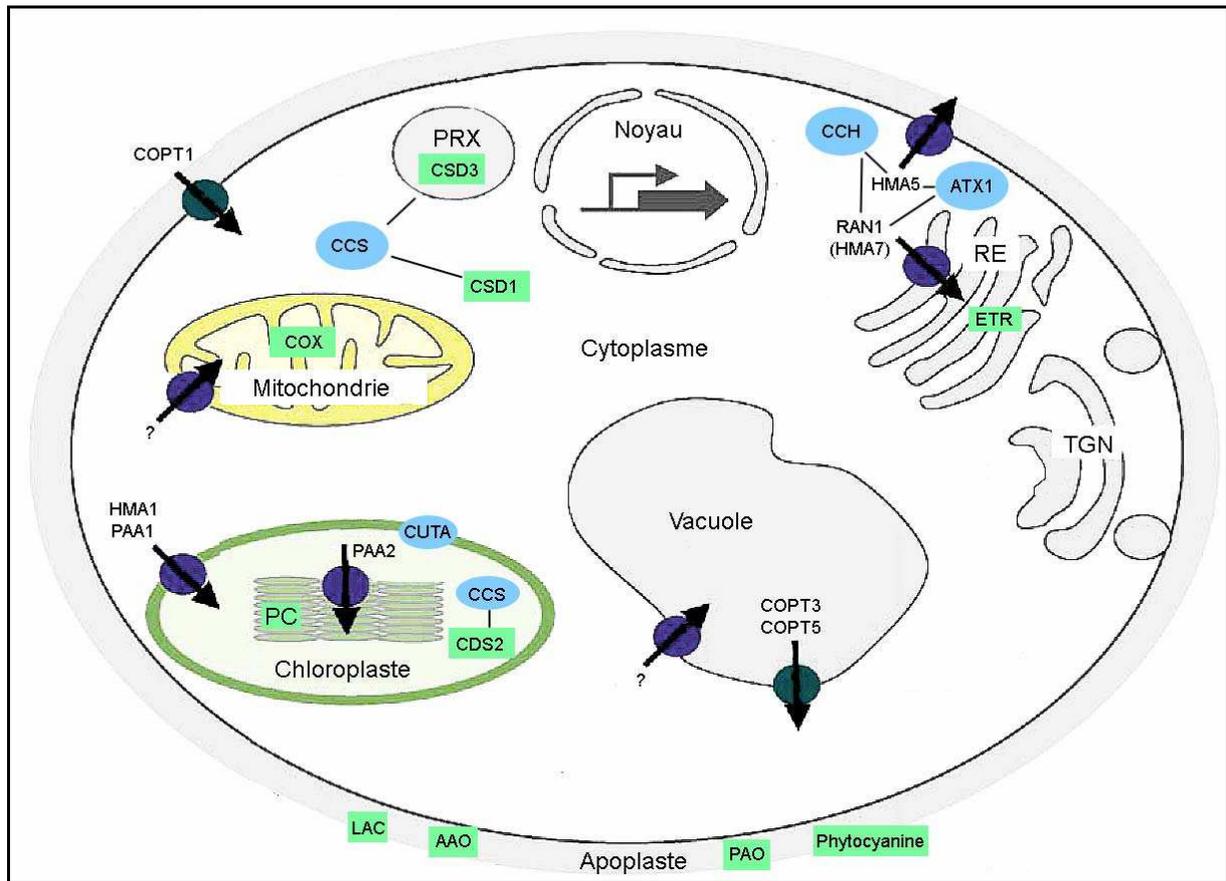


Figure 4 : Voies de transport du cuivre et principales protéines pouvant lier ce métal au sein d'une cellule type d'*Arabidopsis thaliana*.

PRX : peroxysomes, TGN : appareil de Golgi.

Les transporteurs de cuivre sont représentés par des flèches dans un rond violet ou vert, signifiant respectivement export et import par rapport au cytoplasme. Lignes pleines : interactions démontrées avec des données expérimentales entre des chaperonnes et leur cible.

Dans les carrés verts, figurent des protéines nécessitant du cuivre pour leur activité.

CSD1, CSD2, CSD3 : superoxyde dismutases à cuivre et à zinc.

COX : Cytochrome c-oxydase, est composée des donneurs de cuivre Sco1, Cox11 et Cox17, ETR : récepteur de l'éthylène, PC : plastocyanine, LAC : laccase, AAO : ascorbate oxydase, PAO : amine oxydase.

D'après Puig & Penarrubia, 2009.

Comme décrit précédemment, le cuivre entrerait sous forme Cu^{1+} dans le cytosol par un membre de la famille des "COPper Transporter protein", COPT1. L'expression de ce transporteur est contrôlée négativement par le cuivre (Sancenon, 2004). Les transporteurs d'ions divalents ZIP2 et ZIP4 pourraient être impliqués dans le transport du Cu^{2+} (voir paragraphe précédent).

Une fois dans le cytosol, le cuivre est chélaté par des phytochélatines et des métallothionines (Cobbett, 2002) ou pris en charge par des métallochaperonnes. Les métallochaperonnes permettent d'acheminer le métal à une protéine cible spécifique via des interactions protéine-protéine. Ces métallochaperonnes permettraient aussi d'augmenter la capacité de la cellule à chélater les ions. Chez la levure, 3 types de métallochaperonnes ont été décrits : Cos17, Ccs1 et Atx1 qui interagissent respectivement avec une cytochrome oxydase, une SOD Cu/Zn et une ATPase de type P nommée Ccc2 (Finney & O'Halloran, 2003). Deux protéines

homologues à Atx1 ont été identifiées chez *Arabidopsis* : CCH et ATX1 qui interagiraient avec les ATPases HMA7 et HMA5 (Himelblau *et al.*, 1998 ; Andrés-Colás *et al.*, 2006). Ces deux chaperonnes complémentent des mutants de levure *atx1* et interagissent avec le domaine N-terminal de HMA5. Différents facteurs entraînent une augmentation de leur expression comme une carence en cuivre, un stress oxydatif, la sénescence ou encore des stress mécaniques (Burkhead *et al.*, 2009).

Arabidopsis contient 3 isoformes de SOD Cu/Zn : une **cytosolique** (CSD1), une **chloroplastique** (CSD2) et une **péroxydomale** (CSD3). Ces protéines interviennent dans la détoxification des radicaux libres issus de l'oxygène. Chez les levures et les mammifères, la maturation de la SOD Cu/Zn nécessite une chaperonne à cuivre appelée "Copper Chaperone for SOD" (CCS) (pour revue, voir O'Halloran & Culotta, 2000 ; Pufahl *et al.*, 1997). *Arabidopsis* contient un homologue fonctionnel de CCS qui est codé par un seul gène mais qui est localisé à la fois dans **le cytosol et le chloroplaste** (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). La double localisation est probablement due à la présence de 2 sites d'initiation de la transcription, dont l'un permet de conserver une séquence d'adressage chloroplastique. CCS permettrait de fournir le cuivre aux superoxyde dismutases CSD1, CSD2 et CSD3. En effet, l'activité de ces 3 SOD est affectée dans un mutant d'insertion ciblant le gène *CCS* (Chu *et al.*, 2005). Le mutant d'insertion *ccs* n'est pas totalement dépourvu d'activité SOD Cu/Zn suggérant l'existence d'une autre voie indépendante de CCS pour fournir le cuivre aux SOD Cu/Zn. Chez les animaux et *C. elegans*, les SOD à cuivre peuvent être activées par une voie qui utilise le glutathion (Jensen & Culotta, 2005).

Récemment, deux nouvelles métallochaperonnes à cuivre, CUTA et PCaP1, ont été identifiées et caractérisées. CUTA présente des homologies avec les protéines procaryotes impliquées dans la résistance aux métaux. Elle est localisée dans **le chloroplaste** et lie spécifiquement le cuivre sous forme 2+. Elle ne possède pas les séquences consensus de liaison aux métaux et serait donc un nouveau type de métallochaperonne spécifique du cuivre 2+ (Burkead *et al.*, 2003). PCaP1 serait associée à la **membrane plasmique** et lie le cuivre 2+ avec une forte affinité. Elle ne possède pas de résidus cystéine ou histidine mais de nombreux résidus glutamate qui pourraient être impliqués dans la liaison au cuivre (Nagasaki-Takeuchi *et al.*, 2008).

Plusieurs ATPases à cuivre sont présentes dans les différents compartiments membranaires de la cellule. RAN1 (Responsive to AgoNist 1) ou HMA7 serait localisée dans **le réticulum endoplasmique** et est requise pour fournir le cuivre aux récepteurs à l'éthylène (Rodriguez *et al.*, 1999). La perte de fonction de cette protéine affecte la voie de signalisation par l'éthylène mais aussi l'élongation cellulaire. Ces mutants ne sont pas sensibles à un excès de cuivre, et l'addition de cuivre permet de restaurer un phénotype de sauvage.

HMA5 est un homologue proche de RAN1 (Andrés-Colás *et al.*, 2006). Le gène codant pour HMA5 est exprimé principalement dans les racines et les fleurs. La fonction de cette ATPase

serait de faire sortir le cuivre de la cellule. Les mutants d'insertion *hma5* sont sensibles au cuivre, et présentent aussi des perturbations de la croissance racinaire et de l'expansion cellulaire (Andrés-Colás *et al.*, 2006). Il est possible que les laccases et amines oxydases apoplastiques, qui sont des protéines à cuivre impliquées dans l'expansion cellulaire, soient affectées dans le mutant *hma5*. HMA5 serait localisée dans **la membrane plasmique**.

Trois autres ATPases à cuivre sont localisées **dans le chloroplaste**, organe qui contiendrait jusqu'à 50 % du cuivre de la cellule végétale. HMA6 (ou PAA1) et HMA1 sont deux ATPases de type P_{1B} localisées dans l'enveloppe du chloroplaste. PAA1 serait la voie principale d'import du cuivre dans cet organe tandis que HMA1 serait une voie alternative, essentielle lorsque la plante est placée sous forte intensité lumineuse (Shikanai *et al.*, 2003 ; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Le cuivre est ensuite acheminé dans les thylacoïdes via HMA8 (ou PAA2), la 3^e ATPase de type P_{1B} chloroplastique (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Les mutants *paa2* présentent une réduction importante du contenu en cuivre des thylacoïdes et un défaut dans le transfert des électrons photosynthétiques.

La caractérisation des mutants *paa1* et *hma1* suggèrent que PAA1 fournirait du cuivre à la fois à CSD2 (SOD Cu/Zn chloroplastique) et à HMA8, alors que HMA1 alimenterait seulement CSD2. Les données bibliographiques concernant ces 3 protéines sont décrites plus précisément à la fin de ce chapitre.

Les mécanismes d'entrée du cuivre **dans la mitochondrie** sont inconnus. Dans cet organe, le cuivre est notamment utilisé par la cytochrome-*c* oxydase, COX, dernière oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale. Chez la levure, la métallochaperonne à cuivre Cox17 fournirait du cuivre à deux protéines de la membrane interne mitochondriale, Sco1, Cox11. Ces protéines seraient ensuite les donneurs de cuivre pour les sites CuA et CuB de la cytochrome oxydase COX (Cobine *et al.*, 2006). Deux homologues de Cox17 ont été identifiés chez *Arabidopsis* par complémentation du mutant de levure *cox17Δ*, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer leur rôle *in planta*.

Les mécanismes d'entrée du cuivre **dans la vacuole** sont encore inconnus. Pour remobiliser le cuivre en cas de besoin, les transporteurs vacuolaires potentiellement impliqués dans l'export de cuivre seraient COPT3, COPT5 (Sancenon *et al.* 2003).

2. Distribution intracellulaire du fer

Dans la cellule végétale, le fer est impliqué dans de nombreux processus comme la photosynthèse, la respiration mitochondriale, l'assimilation de l'azote, la biosynthèse d'hormones, la production et la détoxification d'espèces activées de l'oxygène, l'osmoprotection et la défense contre les pathogènes. Trois types de protéines contenant du fer peuvent être définies : celles contenant des centres fer-soufre, celles contenant des hèmes et enfin les autres protéines à fer (Hänsch & Mendel, 2009).

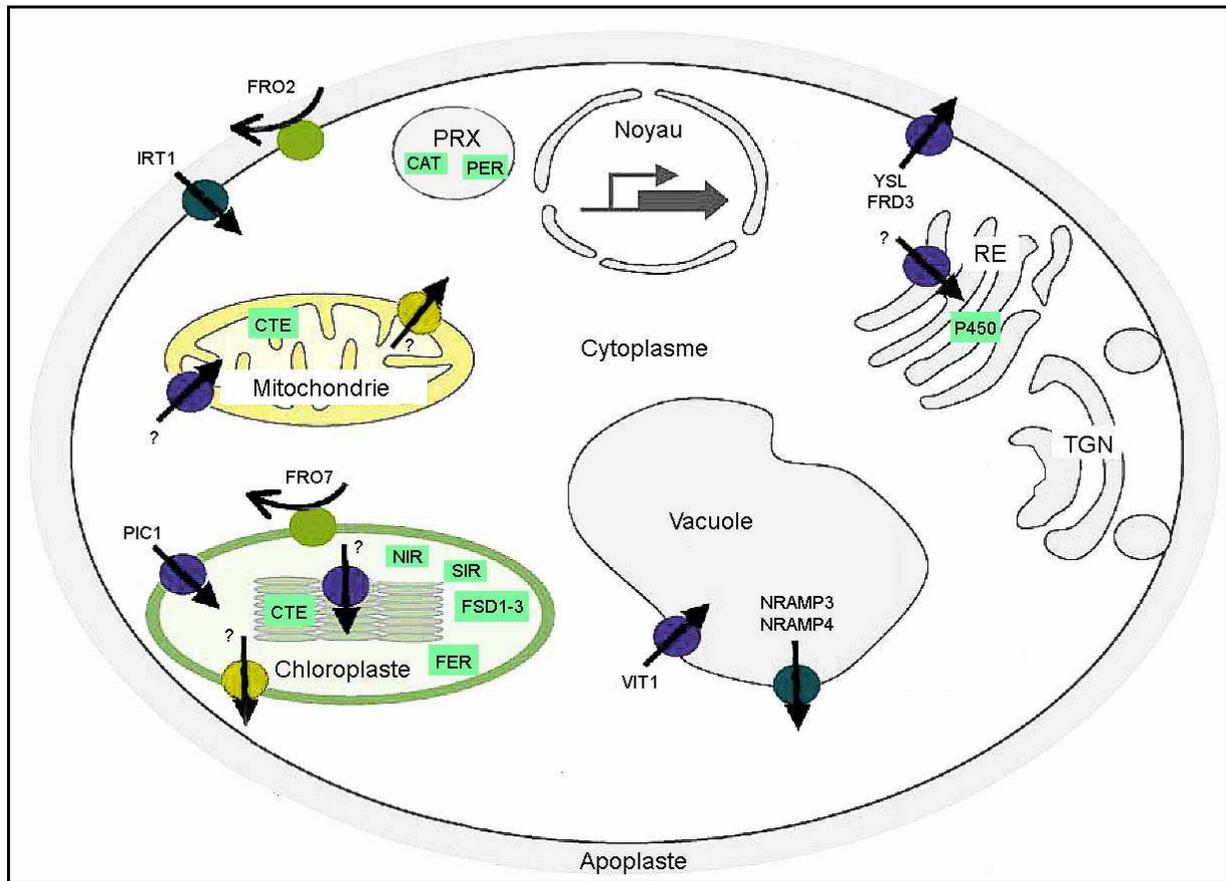


Figure 5 : Voies de transport du fer et principales protéines pouvant lier ce métal au sein d'une cellule d'*Arabidopsis thaliana*.

PRX : peroxysomes, TGN : appareil de Golgi.

Les transporteurs de fer sont représentés par des flèches dans un rond violet ou vert. Les flèches contenues dans des ronds jaunes représentent les transporteurs de centres fer-soufre (encore non caractérisés). Les flèches sur des ronds verts représentent les réductases à fer. Dans les carrés verts, figurent des protéines utilisant du fer comme cofacteur. CTE : protéines des chaînes de transfert d'électrons, P450 : cytochrome P450, CAT : catalase, PER : peroxydase, NIR : nitrite réductase, SIR : sulfite réductase, FSD1-3 : superoxyde dismutases à fer, FER : ferritine. D'après Puig & Penarrubia, 2009.

Le fer est importé dans la cellule par le transporteur IRT1 (Eide *et al.*, 1996 ; Korshunova *et al.*, 1999 ; voir paragraphe II, A, 1.). Avant son transport, le fer est réduit sous forme Fe^{2+} par FRO2, une réductase à fer.

Les protéines de la **famille des NRAMP** facilitent l'entrée d'ions métalliques divalents comme le fer, le manganèse, le cobalt et le cadmium couplée à l'entrée de protons dans les cellules et les compartiments subcellulaires. Chez *Arabidopsis*, 3 protéines de la famille NRAMP ("Natural Resistance-Associated Macrophage Protein") participeraient à la distribution du fer au niveau subcellulaire. Ces protéines contiennent 10 hélices transmembranaires prédites (pour revue, voir Courville *et al.*, 2006). L'expression des trois protéines NRAMP1, NRAMP3 et NRAMP4 d'*A. thaliana* supprime le phénotype d'un mutant de levure dépourvu de transporteurs de fer FET3 et FET4. De plus, l'expression de ces protéines augmente lors de carence en fer. Les plantes surexprimant NRAMP1 sont plus résistantes à des concentrations toxiques en fer. Cette protéine NRAMP1 est principalement

exprimée dans la racine et aurait un rôle dans la distribution intracellulaire du fer, plus particulièrement au niveau des plastes. En effet, cette protéine contient une séquence d'adressage chloroplastique prédite en *N*-terminal (Curie *et al.*, 2000). La caractérisation de mutants KO pour les protéines NRAMP3 et NRAMP4, montre qu'elles ont un rôle redondant dans la mobilisation du fer à partir **des vacuoles** issues de graines (Lanquar *et al.*, 2005 ; Thomine *et al.*, 2003). Ces deux protéines permettent donc d'exporter du fer vers le cytosol. Récemment, un nouveau transporteur de fer vacuolaire, VIT1 (Vacuolar Iron Transporter 1) a été caractérisé (Kim *et al.*, 2006). VIT1 est localisé dans **le tonoplaste** et sa caractérisation *in planta* suggère qu'il pourrait participer au stockage du fer dans la vacuole (Figure 5).

Près de 80 % du fer contenu dans les cellules est localisé dans **les chloroplastes** où il est requis pour les ferredoxines, les protéines fer-soufre des photosystèmes, le cytochrome *b₆f*, la synthèse de la chlorophylle et la biosynthèse des hèmes utilisées entre autres par les nitrites réductases (NIR) (Takahashi *et al.*, 2001) ainsi que les sulfites réductases (SIR) (Bork *et al.*, 1998). Le fer est aussi utilisé par des superoxyde dismutases à fer (FSD1, FSD2 et FSD3) catalysant la dégradation des radicaux libres issus de l'oxygène. Récemment, la caractérisation de la réductase à fer, FRO7, a montré que cette protéine chloroplastique a un rôle dans l'acquisition du fer chloroplastique (Jeong *et al.*, 2008). Elle permettrait donc de réduire le fer sous forme Fe²⁺ avant sa prise en charge par la protéine PIC1 (Duy *et al.*, 2007, voir partie I, B, 2).

Les plastes contiennent aussi des ferritines pouvant lier de grandes quantités de fer. Ces protéines sont impliquées dans le stockage du fer (Ravet *et al.*, 2009), et sont principalement présentes dans les plastes non photosynthétiques (Briat & Lobréaux, 1998.). Les chloroplastes et les mitochondries sont les compartiments impliqués dans la formation des centres fer-soufre (Balk & Lobréaux, 2005). Les mécanismes de sortie des centres fer-soufre de ces organites sont encore inconnus.

Les mécanismes de distribution du fer dans la **mitochondrie, le péroxysome et le réticulum endoplasmique** ne sont pas encore connus. Dans ces compartiments, le fer est pourtant indispensable pour le fonctionnement de nombreuses protéines (protéines à hème, cytochromes P450 mono-oxygénases, catalases, peroxydases...).

3. Distribution intracellulaire du zinc

L'entrée du zinc dans la cellule se ferait par un transporteur de la famille des ZIP encore non caractérisé. Une fois dans la cellule, le zinc est associé en particulier aux protéines à doigt de zinc, aux métallo-protéases, aux ADN et ARN-polymérase et aux facteurs d'épissage. Plus de 1200 protéines à zinc ont été prédites, représentant un groupe dix fois plus important que les protéines à cuivre et à fer.

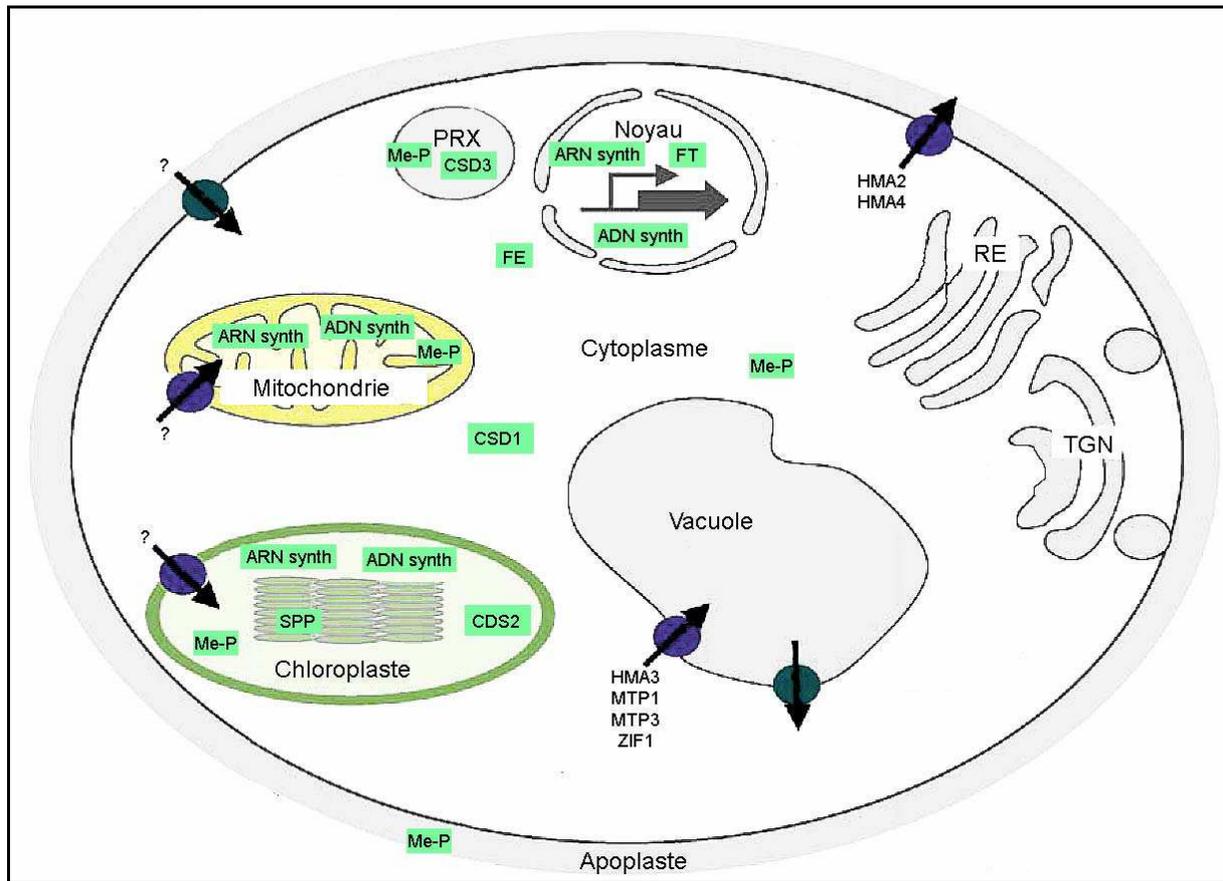


Figure 6 : Voies de transport du zinc et principales protéines pouvant lier ce métal au sein d'une cellule d'*Arabidopsis thaliana*.

PRX : peroxyssomes, TGN : appareil de Golgi.

Les transporteurs de zinc sont représentés par des flèches dans un rond violet ou vert. ADN synth / ARN synth : ADN et ARN synthèses, Me-P : métaallo-protéases, FT : facteur de transcription, FE : facteur d'épissage, SPP : Stromal Processing Peptidase, CSD1-3 : superoxyde dismutase à cuivre et à zinc. D'après Puig & Penarrubia, 2009.

Le zinc a le même rayon ionique que le fer et le magnésium. Ainsi, lorsqu'il est présent en excès, il devient toxique pour la cellule car il peut facilement se substituer à ces métaux dans les sites actifs d'enzymes les rendant ainsi inactives (Marschner, 1995). Un excès de zinc peut induire une déficience en fer et en magnésium dans le cytosol. C'est pourquoi des systèmes d'efflux de zinc sont nécessaires pour maintenir une concentration optimale de ce métal dans le cytosol (Figure 6). Plusieurs types de transporteurs peuvent être impliqués dans la distribution du zinc comme les ATPases de type P_{1B} , la famille des protéines CDF (Cation Diffusion Facilitator), les protéines ZIP (ZRT, IRT-like Protein) (pour revue, voir Grotz & Guerinot, 2006).

Les **transporteurs ZIP** transportent principalement du zinc et du fer mais il a été montré qu'ils peuvent lier d'autres substrats (Guerinot, 2000).

HMA2, 3 et 4 sont des **ATPases de type P_{1B-2}** impliquées dans le transport du zinc, cobalt, cadmium et plomb (Argüello, 2003). HMA2 (Eren *et al.*, 2004) et HMA4 sont localisées dans la **membrane plasmique** et seraient impliquées dans le transport à longue distance du zinc et

du cadmium au sein de la plante (des racines vers les parties aériennes), mais aussi dans l'efflux de ces métaux hors de la cellule végétale (Hussain *et al.*, 2004). **La vacuole** est un lieu de stockage du zinc et de détoxification. L'import du zinc dans cet organite est effectué par plusieurs transporteurs dont HMA3, qui est aussi impliquée dans la détoxification du cadmium (Gravot *et al.*, 2004 ; Morel *et al.*, 2009). On remarquera que cette ATPase HMA3 n'étant pas présente chez tous les écotypes d'*Arabidopsis*, il est parfois écrit qu'*Arabidopsis thaliana* ne contient que 7 ATPases de type P_{1B}.

Le stockage du zinc dans la vacuole est aussi effectué par ZIF1, membre de la **famille des MFS** (Haydon & Cobbett, 2007), les protéines MTP1 et MTP3 (Metal Tolerance Protein), ainsi que des antiporteurs Zn²⁺/H⁺ (Kobae *et al.*, 2004).

Aucun système d'import de zinc n'a été pour l'instant caractérisé dans **l'enveloppe du chloroplaste**. Au sein du chloroplaste, le zinc est utilisé par la méthionine synthase, l'anhydrase carbonique, la SPP (Stromal Processing Peptidase, enzyme clivant la séquence d'adressage vers les thylacoïdes), les métalloprotéases et les ADN et ARN synthases. D'après Kim et collaborateurs (2009), HMA1 serait une ATPase de type P_{1B} permettant d'exporter du zinc vers le cytosol (voir paragraphe I, B, 2).

Les **mitochondries et les peroxysomes** renferment aussi des protéines à zinc (comme la SOD CSD3, les ADN et ARN synthases...), cependant les mécanismes d'import de ce métal sont encore inconnus dans ces organites.

Aucune chaperonne à zinc n'a été formellement caractérisée à ce jour chez *Arabidopsis thaliana*. Cependant, ATX1, une chaperonne à cuivre qui est conservée entre *Arabidopsis* et *Chlamydomonas* pourrait lier du zinc chez cet organisme et délivrer ce métal à une ATPase à zinc (Dainty *et al.*, 2009).

C. Régulation transcriptionnelle des acteurs de l'homéostasie du fer, zinc et cuivre

La plante a développé une batterie de mécanismes de régulations transcriptionnelles pour répondre aux variations (carence, excès) de la concentration des métaux dans l'environnement, pour lutter contre certains stress (oxydatifs, lumineux, ...). Ces mécanismes sont aussi impliqués dans la régulation de la compartimentation des métaux dans la plante ou la cellule végétale, ou encore dans le développement.

1. Régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre

Les plantes nécessitent des mécanismes pour réguler l'import du cuivre et sa distribution à cause de la variabilité de la disponibilité de ce métal dans la nature. Les besoins en cuivre dans un tissu dépendent aussi des conditions de lumière et du stade de développement.

Les transporteurs COPT1 et COPT2 sont réprimés en réponse à une forte concentration en cuivre, ce qui n'est pas le cas des transporteurs COPT3-5 (Sancenon *et al.*, 2003). Inversement, l'expression de HMA5 augmente lors d'un excès de cuivre (Andrés-Colás *et al.*, 2006). Une étude transcriptomique effectuée sur 8300 gènes d'*Arabidopsis* a révélé que

plusieurs gènes potentiellement impliqués dans l'homéostasie du cuivre sont co-régulés par une carence en cuivre (Wintz *et al.*, 2003).

L'expression de la métallochaperone CCS chloroplastique est régulée par la concentration en cuivre de la même manière que les SOD à cuivre CSD1 et CSD2. Pour de faibles concentrations en cuivre, la SOD à fer est active tandis que l'expression de CCS et des SOD à cuivre CSD1 et CSD2 est très faible, peut être pour concentrer les flux de cuivre vers la plastocyanine. A de plus fortes concentrations en cuivre, la SOD à fer n'est plus exprimée et les SOD à cuivre sont activées. L'analyse de l'expression des gènes codant ces protéines dans les mutants *paa1* et *paa2* suggère fortement que la concentration en cuivre dans le stroma régule l'expression de ces gènes nucléaires. Ceci suggère l'existence, entre le chloroplaste et le noyau, d'une voie de signalisation sensible à la concentration en cuivre chloroplastique (Abdel-Ghany *et al.*, 2005).

Récemment, un nouveau système de régulation des protéines à cuivre a été mis en évidence, système qui met en jeu des micro-ARNs. Ces micro-ARNs, miR397, miR398, miR408, et miR857 ciblent les transcrits de CCS, CSD1, CSD2, COX5b ainsi que ceux des lactases et de la plastocyanine. Tous les gènes cibles codant des protéines à cuivre, ce groupe de micro-ARNs a été appelé "micro-ARNs à cuivre" (Cu-miRNA) (Abdel-Ghany & Pilon, 2008). Lorsque le cuivre devient limitant, ces micro-ARNs à cuivre sont transcrits et viennent interférer avec l'expression des gènes cités précédemment. Ceci entraîne une baisse du niveau de production des protéines cibles, permettant de redistribuer le cuivre vers des protéines et des processus vitaux pour la plante comme la plastocyanine et la photosynthèse. Ces micro-ARNs à cuivre ne seraient donc utilisés que pour contrôler l'expression de protéines à cuivre non essentielles (ou dispensables, comme les SOD à cuivre, voir plus haut). L'expression de COPT1, COPT2 et des micro-ARN à cuivre serait contrôlée par le facteur de transcription SPL7, un régulateur global de l'homéostasie du cuivre (Yamasaki *et al.*, 2009).

2. Régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer

La réponse primaire des plantes en réponse à une déficience en fer est régulée par une activation transcriptionnelle contrôlée. Chez la tomate, le facteur de transcription LeFER contrôle la transcription de la Fe^{3+} réductase et du transporteur LeIRT1 lorsque le fer est limitant (Ling *et al.*, 2002). L'orthologue de LeFER chez *Arabidopsis* est le facteur de transcription FIT1 (Fe-deficiency-Induced Transcription factor 1) (Colangelo & Guerinot, 2004). Cependant, d'autres facteurs de transcription doivent être impliqués dans cette régulation car FIT1 ne contrôle l'expression que de 71 des 179 gènes dont l'expression varie dans la racine suite à une carence en fer (Colangelo & Guerinot 2004). Lors d'une carence en fer, l'expression du transporteur de cuivre COPT2 est activée alors que l'expression des protéines de stockage du fer comme la ferritine ne l'est pas (Lescure *et al.*, 1991).

3. Régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'homéostasie du zinc

Contrairement à ce qui a été déjà identifié pour le cuivre et le fer, aucun régulateur global contrôlant l'homéostasie du zinc n'a été caractérisé à ce jour.

Cependant, l'étude du transcriptome de deux espèces qui sur-accumulent du zinc et du plomb, *Arabidopsis halleri* et *Thlaspi caerulescens*, a permis d'identifier des variations de niveaux de transcrits à l'échelle du génome permettant ainsi de mieux comprendre les réponses transcriptionnelles mises en jeu dans ces plantes (Talke *et al.*, 2006 ; Van de Mortel *et al.*, 2006). Notamment, ces données montrent l'existence de liens entre l'homéostasie du zinc et celle du fer : lorsqu'une plante est placée sur un milieu riche en zinc, l'expression du transporteur de fer IRT1 augmente (Van de Mortel *et al.*, 2006).

Comme nous le présente ce chapitre, les transporteurs jouent un très grand rôle dans l'homéostasie des métaux. Parmi eux, les ATPases de type P_{1B} jouent un rôle primordial chez la plante dans l'homéostasie du cuivre et du zinc.

III. LES ATPASES DE TYPE P

La superfamille des pompes ioniques de type P regroupe des transporteurs utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour permettre le transport de petits cations ainsi que d'aminophospholipides (Axelsen *et al.*, 1998 ; Folmer *et al.*, 2009) contre un gradient de concentration. Les ATPases de type P sont présentes dans tous les organismes vivants étudiés et séquencés jusqu'à présent sauf dans quatre bactéries et une archéobactérie. Elles possèdent toutes la séquence consensus DKTGT, 6 à 12 hélices transmembranaires prédites, ainsi que des domaines solubles très conservés. Elles sont caractérisées par la formation d'un intermédiaire phosphorylé covalent au cours de leur cycle catalytique. Contrairement aux autres ATPases, les ATPases de type P sont constituées d'une sous-unité catalytique unique et accessoirement d'une ou deux sous-unités additionnelles régulatrices (Axelsen *et al.*, 1998). Ces ATPases sont impliquées dans de nombreux processus biologiques fondamentaux comme la génération de gradients électrochimiques utilisés ensuite comme source d'énergie pour les transporteurs secondaires, la signalisation cellulaire, le transport de micronutriments essentiels, la détoxification d'ions toxiques dans la cellule.

En général, les ATPases de type P sont plus répandues et plus variées chez les eucaryotes que chez les bactéries et les archéobactéries. *Arabidopsis* a la particularité de posséder, dans son génome, 46 gènes codant des ATPases de type P. C'est le seul organisme séquencé qui possède autant de protéines de cette famille soulignant ainsi leur importance chez les plantes vasculaires.

A. Classification

Les ATPases de type P sont divisées en 5 groupes référencés de 1 à 5 en fonction de leurs homologies de séquences. Au sein de ces groupes, plusieurs sous-groupes peuvent être distingués en fonction de la spécificité de substrats.

Les **ATPases de type P1** sont les pompes les plus simples et probablement les plus anciennes. Le type 1A est la classe la plus petite contenant seulement des pompes ioniques bactériennes comme la pompe à potassium Kdp. Aucun gène homologue n'a été trouvé chez *Arabidopsis*. Le type 1B comprend des ATPases impliquées dans le transport des métaux de transition. Huit gènes ont été identifiés chez *Arabidopsis* (voir description complète de cette sous-famille paragraphe III, D.).

Les **ATPases de type P2 et P3** ont été très largement étudiées. Elles sont impliquées dans le transport des ions H^+ , K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Les types 2A sont similaires aux pompes SERCA animales du réticulum endo- et sarco-plasmique. Quatre ATPases de type 2A ont été identifiées chez *Arabidopsis* dont une (ECA1) est localisée dans les membranes du réticulum endoplasmique (Liang *et al.*, 1997). Les ATPases de type 2B transportent aussi du calcium mais sont similaires aux pompes animales de la membrane plasmique et de l'ATPase de levure PCA1. Dix membres de cette classe ont été identifiés chez *Arabidopsis* dont quatre ont été partiellement caractérisés. Tous possèdent un domaine de liaison à la calmoduline prédit en *N*-terminal, qui serait un domaine de régulation auto-inhibiteur. Les types 2C et 2D regroupent respectivement les ATPases Na^+/K^+ et les ATPases Na^+ . Aucun homologue n'a été identifié pour l'instant chez *Arabidopsis*.

Les ATPases de type 3A sont des pompes à protons qui sont localisées presque exclusivement à la membrane plasmique des plantes et des champignons. Elles permettent de maintenir un gradient de pH de part et d'autre de la membrane, créant ainsi un potentiel de membrane. Dans les cellules animales, le potentiel de membrane résulte de l'activité des pompes Na^+/K^+ , pompes absentes chez les végétaux. Le type 3B regroupe des pompes Mg^{2+} bactériennes. Onze protéines de type 3A ont été identifiées chez *Arabidopsis* dont AHA1 et AHA2 qui sont les deux ATPases de type P les plus exprimées dans la plante.

Les **ATPases de type P4** n'ont été identifiées pour l'instant que chez les eucaryotes chez lesquels elles sont impliquées dans le transport des lipides et dans le maintien de l'asymétrie des bicouches lipidiques. Le génome d'*Arabidopsis* comprend douze ATPases de type 4 dont la protéine ALA1 qui serait impliquée dans le "flipping" des aminophospholipides.

La spécificité des substrats des **ATPases de type P5** n'est pas connue car aucun des membres de cette famille n'a été caractérisé à ce jour. *Arabidopsis* possède une ATPase de ce type. L'ensemble des ATPases de type P identifiées dans le génome d'*Arabidopsis* est récapitulé dans le tableau 2 ci-dessous (Axelsen & Palmgren, 2001 ; Kühlbrandt, 2004).

Famille	Sous-famille	Spécificité	Nombre trouvé chez <i>A. thaliana</i>
P1	P _{1A}	K ⁺	0
	P _{1B}	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Co ²⁺	8
P2	P _{2A}	Ca ²⁺	4
	P _{2B}	Ca ²⁺	10
	P _{2C}	Na ⁺ /K ⁺ , H ⁺ /K ⁺	0
	P _{2D}	Na ⁺	0
P3	P _{3A}	H ⁺	11
	P _{3B}	Mg ²⁺	0
P4		Lipides	12
P5		Inconnue	1

Tableau 2 : Classification des ATPases de type P selon leur spécificité et présence de ces ATPases chez *A. thaliana*.

B. Les domaines caractéristiques d'une ATPase

Les structures des ATPases sont beaucoup plus conservées que leurs séquences primaires. En effet, les ATPases de type P contiennent 4 domaines bien définis qui, d'après leur fonction et leur position, ont été référencés en domaine P, domaine N, domaine A et domaine M (Figure 7). Ces domaines sont conservés chez toutes les ATPases de type P.

Le **domaine actuateur ou domaine A** joue un rôle dans le cycle catalytique de l'enzyme en interagissant avec le site de phosphorylation. Ce domaine contient un motif consensus TGE.

Le **domaine de phosphorylation ou domaine P** est le cœur catalytique de l'enzyme, il contient la séquence consensus DKTGT. Le résidu aspartate de cette séquence est phosphorylé de façon réversible au cours du cycle de l'enzyme. La mutation du résidu aspartate inactive l'enzyme.

Le **domaine de liaison du nucléotide ou domaine N** est lié au domaine P. Un motif conservé comprenant une lysine définit le site de liaison à l'ATP. Les domaines N et P sont situés dans la grande boucle soluble. La taille et la séquence du domaine N sont assez variables selon les ATPases. D'après les structures obtenues sur ces domaines, il semblerait que ce soit l'adénosine de l'ATP qui interagisse avec la protéine. Le domaine catalytique comprend les domaines P et N qui sont situés dans la grande boucle cytoplasmique.

Le **domaine membranaire ou domaine M** comprend l'ensemble des hélices transmembranaires prédites qui contiennent les sites de liaison aux métaux. Ce domaine définit ainsi la spécificité ionique de l'ATPase. Très peu de résidus sont conservés dans ce domaine exceptée une proline toujours retrouvée dans l'hélice précédent la grande boucle soluble. Le domaine M est lui aussi directement lié au cœur catalytique de l'enzyme via les hélices

transmembranaires situées de part et d'autre de la grande boucle contenant les domaines P et N.

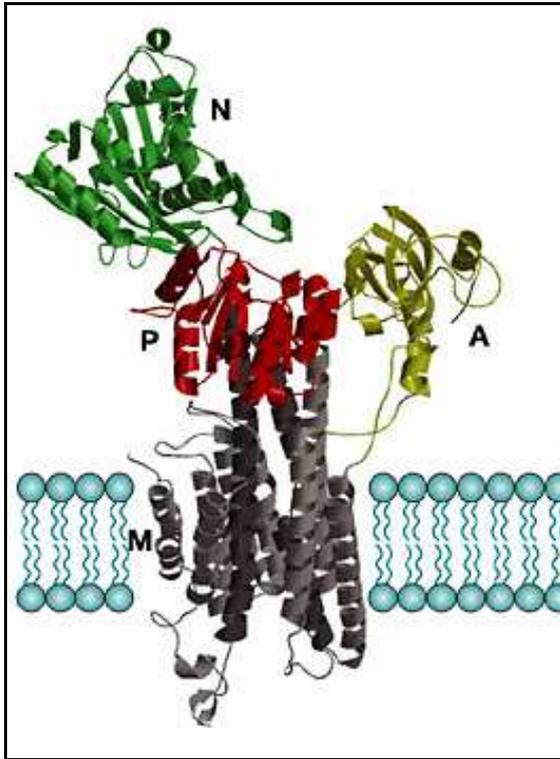


Figure 7 : Structure cristallographique de SERCA.

Les différents domaines composant une ATPase de type P sont le domaine A (domaine activateur), le domaine P (domaine de phosphorylation), le domaine N (domaine de liaison du nucléotide) et le domaine M (hélices transmembranaires).

Image tirée de Kühlbrandt, 2004.

C. Le cycle réactionnel

Les ATPases de type P partagent un mécanisme catalytique commun qui est caractérisé par la réaction couplée de l'hydrolyse d'ATP et du transfert d'un ion au travers des membranes (Glynn, 1985). Ce couplage se traduit donc par une succession d'événements chimiques (phosphorylation/déphosphorylation) et structuraux (changement de conformation). Le modèle E1-E2 décrit dans la figure 8 se réfère au modèle enzymatique proposé par de Meis et Vianna pour l'ATPase calcium (de Meis & Vianna, 1979).

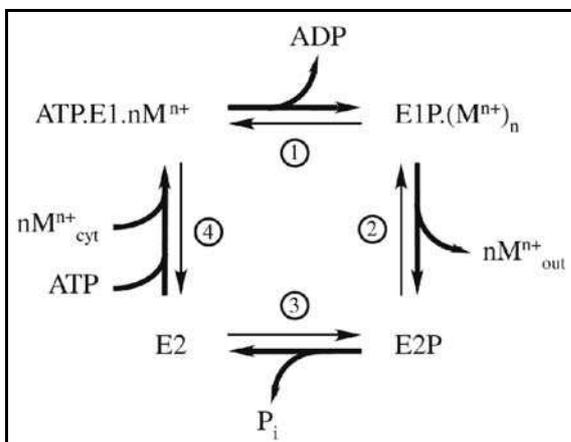


Figure 8 : Cycle catalytique des ATPases de type P.

E1, E2, E1P et E2P représentent différentes conformations de l'enzyme au cours de son cycle. M^{n+} représente un métal transporté par ces enzymes. N représente la stœchiométrie du transport. M^{n+}_{cyt} et M^{n+}_{out} représentent la localisation cytoplasmique ou extracellulaire/luminale du métal transporté.

Schéma tiré de Argüello *et al.*, *Biometals*, 2007

Ce modèle représente deux conformations de l'enzyme. Un état E1 dans lequel les hélices transmembranaires de liaison aux métaux (TM-MBS) de l'ATPase sont ouvertes vers le cytosol. Sous cette forme, l'enzyme est capable de lier les ions du côté cytosolique et peut être phosphorylée par l'ATP. Dans l'état E2, les sites de transport sont ouverts vers le compartiment extra-cytoplasmique (ou luminal) et l'enzyme est phosphorylable par le phosphate inorganique.

La phosphorylation catalytique de l'enzyme se produit après liaison du métal au domaine TM-MBS et de l'ATP au domaine de liaison de l'ATP à partir de la face cytosolique (étapes 4 et 1). L'enzyme est alors dans l'état E1P.(Mⁿ⁺)_n. Dans cet état, les ions sont occlus, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent plus être échangés rapidement contre d'autres ions ni du côté cytoplasmique ni du côté extra-cytoplasmique (ou luminal). Le phosphoenzyme est instable et subit un changement de conformation qui se traduit par une diminution d'affinité des sites pour le métal et une réorientation des sites du côté luminal conduisant à une dissociation des ions et à l'état E2P (étape 2). L'enzyme est ensuite déphosphorylée (étape 3) et retourne à son état initial.

D. Les ATPases de la sous-famille P_{1B}

1. Présentation générale

Les ATPases de type P_{1B} sont une sous-famille d'ATPases de type P impliquées dans le transport de métaux comme les ions Cu⁺, Ag⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Co²⁺. Elles ont un rôle crucial dans l'homéostasie ainsi que la biotolérance de ces métaux.

Les ATPases de type P_{1B} contiennent de 6 à 8 hélices transmembranaires prédites. Elles sont caractérisées par une séquence signature CPC, CPH, CPS, SPC, TPC dans le 6^{ème} segment transmembranaire (Figure 9). Ces protéines peuvent aussi contenir un ou plusieurs domaines de liaison aux métaux placés en N et C-terminal (N-MBD et C-MBD respectivement). Ces domaines de liaison aux métaux peuvent être composés d'un motif consensus CXXC ou d'une séquence riche en histidines.

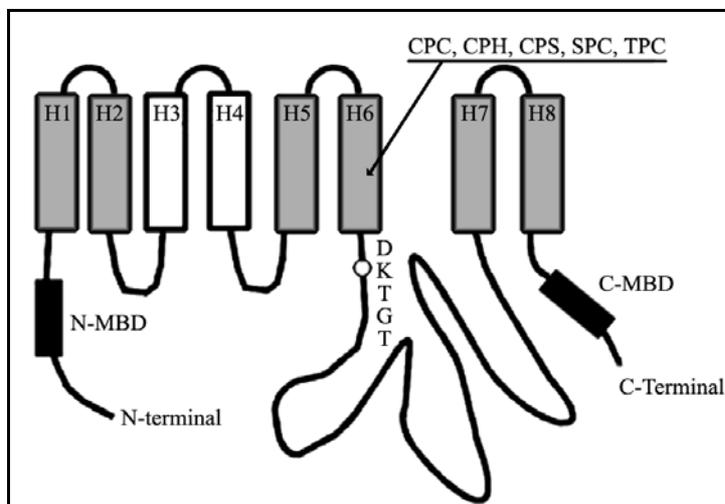


Figure 9 : Représentation schématique d'une ATPase de type P_{1B}.

Ces protéines contiennent 6 à 8 hélices transmembranaires prédites (H1-H8), la séquence DKTGT, une signature CPC, CPH, CPS, SPC, TPC spécifique des ATPases de type P_{1B} dans leur 6^{ème} hélice transmembranaire. Elles peuvent aussi contenir un ou plusieurs domaines de liaison aux métaux en N et C-terminal.

Des données expérimentales montrent que les ATPases de type P_{1B} fonctionnent aussi selon le modèle E1-E2 décrit précédemment (Figure 8), avec un changement de conformation entre les états E1 et E2 (Okkeri *et al.*, 2002; Mandal *et al.*, 2002).

Ces ATPases ont été classées en 6 sous groupes par Argüello (2003). Cette étude se base sur l'analyse de la séquence de 234 ATPases de type P_{1B} et notamment sur les résidus conservés dans les hélices transmembranaires. Cette classification permet de prédire la sélectivité ionique de ATPases de type P_{1B} à partir des séquences consensus.

2. Caractéristiques structurales des sous-groupes des ATPases de type P_{1B}

a) Le sous-groupe P_{1B1}

Dans ce sous groupe, nous trouvons des ATPases très bien caractérisées comme les protéines ATP7A et ATP7B impliquées dans les maladies de Menkes et de Wilson chez l'homme et l'ATPase CopA d'*Archaeoglobus fulgidus*.

Des expériences de transport et de tests d'activité enzymatique montrent que ces ATPases transportent du cuivre sous forme $1+$. Elles seraient aussi activées par l'ion Ag^+ . Les protéines de ce sous-groupe sont très diverses en terme de taille (650 à 1500 aa) du fait de la présence d'un nombre variable de N-MBD de type MXCXXC. Toutes ces protéines semblent contenir 8 hélices transmembranaires, la grande boucle se situant entre les hélices transmembranaires H6 et H7. Elles possèdent la séquence CPC(X)6P dans la 6^e hélice transmembranaire (Figure 10).

Arabidopsis thaliana possède 4 ATPases de type P_{1B-1} : **HMA5**, **HMA6/PAA1**, **HMA7/RAN1** et **HMA8/PAA2**.

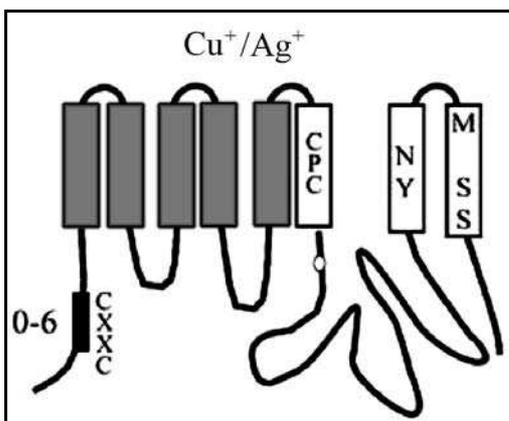


Figure 10 : Représentation schématique des ATPases de type P_{1B-1} .

La boîte noire représente le N-MBD composée d'un motif CXXC.

Les acides aminés des hélices transmembranaires pouvant jouer un rôle dans la sélectivité vis-à-vis de l'ion sont indiqués dans les rectangles blancs.

Image issue de Argüello, 2003.

b) Le sous-groupe P_{1B2}

D'après les résultats expérimentaux obtenus, ces protéines transporteraient du zinc, du cadmium et du plomb. Ces ATPases sont trouvées chez les archaebactéries, les procaryotes et uniquement chez les plantes dans le règne eucaryote. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code pour 3 ATPases de type P_{1B-2} : **HMA2**, **HMA3** et **HMA4**. Les ATPases appartenant au sous-

groupe 1B2 contiennent une séquence consensus de type CPC(X)₄[S/T]XP dans leur 6^{ème} hélice transmembranaire. Cette séquence est très similaire aux ATPases du sous-groupe 1B1. Elles possèdent aussi dans l'hélice H8 la séquence consensus NX(7)KX(10,20)DXGX(7)N. L'extrémité N-terminale de ces protéines contient 100 à 150 acides aminés. La plupart de ces enzymes contiennent 1 (et exceptionnellement 2) N-MBD contenant une séquence CXXC. Comme pour les protéines du sous-groupe 1B1, ce N-MBD semble avoir un rôle dans la régulation de l'activité de l'enzyme. Le N-MBD peut aussi être composé d'une séquence de type (HX)_n (n=2 ou 3). Des protéines de ce sous groupe peuvent contenir les deux types de N-MBD (Figure 11).

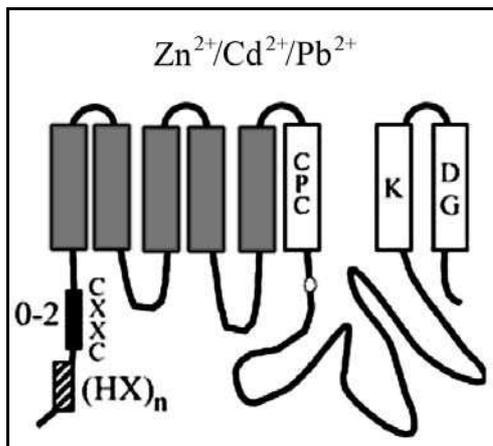


Figure 11 : Représentation schématique des ATPases de type P_{1B-2}.

La boîte noire représente le N-MBD composée d'un motif CXXC. La boîte hachurée représente le N-MBD riche en histidines.

Les acides aminés des hélices transmembranaires pouvant jouer un rôle dans la sélectivité vis-à-vis de l'ion sont indiqués dans les rectangles blancs.

Image issue de Argüello, 2003.

c) *Le sous-groupe P1B3*

Le groupe 1B3 regroupe les protéines contenant un motif CPH dans l'hélice transmembranaire H6, des séquences uniques dans les hélices H7 et H8, ainsi qu'un N-MBD riche en histidines. Ce sous-groupe ne contient pas de protéines eucaryotes. L'ATPase CopB d'*Enterococcus Hirae* a été la première caractérisée dans ce groupe. Elle transporterait du cuivre sous forme 1+ et de l'argent (Solioz & Odermatt, 1995). D'autres études réalisées sur l'homologue CopB d'*Archaeoglobus fulgidus* suggèrent que cette ATPase transporterait aussi du cuivre sous forme 2+ (Mana-Capelli *et al.*, 2003).

La séquence NX(5)GYNX(4)PX(10,20)PX(6)MSXSTX(5)N est la signature de ces ATPases.

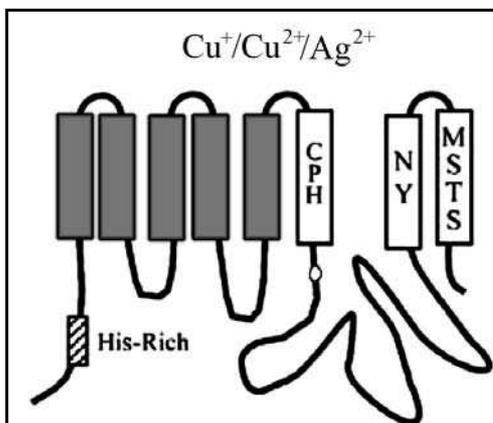


Figure 12 : Représentation schématique des ATPases de type P_{1B-3}.

La boîte hachurée représente le N-MMBD riche en histidines.

Les acides aminés des hélices transmembranaires pouvant jouer un rôle dans la sélectivité vis-à-vis de l'ion sont indiqués dans les rectangles blancs.

Image issue de Argüello, 2003.

d) Le sous-groupe PIB4

Comme pour les ATPases de type P_{IB-2}, seules les plantes parmi les eucaryotes contiennent des ATPases de ce sous-groupe. Ces ATPases sont plus petites que celles des autres sous groupes, elles ne contiennent que 6 à 7 hélices transmembranaires prédites. Excepté deux ATPases (dont **HMA1**), elles ne contiennent pas de N-MBD. Le domaine de coordination dans l'hélice H6 est formé d'un motif SPC. L'hélice H8 contient une séquence signature HEG[GS]T(X)5[NS][GSA] (Figure 13).

Seulement deux ATPases de ce groupe ont été étudiées. L'ATPase CoaT de *Synechocystis* serait impliquée dans le transport du cobalt (Rutherford *et al.*, 1999). L'ATPase d'*Arabidopsis*, **HMA1**, pourrait transporter du cuivre du zinc, du cadmium, du cobalt et du calcium (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006, Moreno *et al.*, 2008). La spécificité ionique des ATPases de ce groupe n'est donc pas totalement définie, elles pourraient être impliquées dans le transport d'ions divalents.

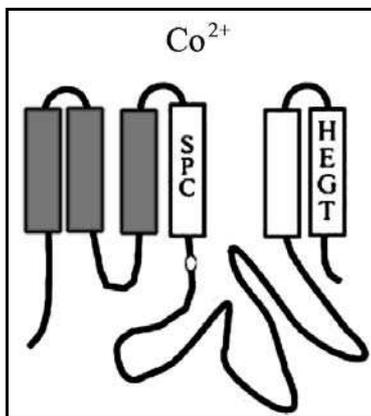


Figure 13 : Représentation schématique des ATPases de type P_{IB-4}.

Les acides aminés des hélices transmembranaires pouvant jouer un rôle dans la sélectivité vis-à-vis de l'ion sont indiqués dans les rectangles blancs.

Image issue de Argüello, 2003.

e) Le sous-groupe PIB5

Ce sous-groupe ne contient pour l'instant que 5 ATPases d'origine procaryote. Elles contiennent la séquence consensus TPCP(X)5P au niveau de l'hélice H6 et 6 hélices transmembranaires prédites (Figure 14). A ce jour aucune étude n'a porté sur des ATPases de ce sous-groupe et leur spécificité ionique est encore inconnue.

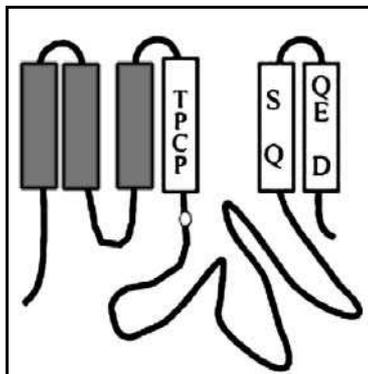


Figure 14 : Représentation schématique des ATPases de type P_{IB-5}.

Les acides aminés des hélices transmembranaires pouvant jouer un rôle dans la sélectivité vis-à-vis de l'ion sont indiqués dans les rectangles blancs.

Image issue de Argüello, 2003.

f) Le sous-groupe PIB6

Ce sous-groupe contient toutes les ATPases qui ne sont pas contenues dans les 5 autres sous-groupes. Ces protéines contiennent les caractéristiques structurales des ATPases de type P_{1B} : Un site de phosphorylation cytoplasmique DKTGT, une séquence APC, CPC ou CPS en H6. Cependant, elles présentent des séquences distinctes en H7 et H8. A ce jour, aucune étude portant sur ces ATPases n'a été réalisée, ne permettant donc pas de déterminer la sélectivité ionique de ces enzymes. Elles présentent 30 à 40 % d'homologies avec les autres ATPases de type P_{1B}.

3. Les ATPases de type P1B d'*Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis*, **huit ATPases de type P_{1B}** ont été identifiées et caractérisées (Tableau 3). Les ATPases HMA5, 6, 7 et 8 appartiennent au groupe P_{1B-1} et sont impliquées dans le transport du cuivre au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique et des membranes du chloroplaste (Andrés-Colás *et al.*, 2006; Woeste & Kieber, 2000; Abdel-Ghany *et al.*, 2005). HMA7 est impliquée dans la voie de signalisation de l'éthylène. En effet, cette ATPase permettrait le transport du cuivre dans un compartiment post-Golgi où le cuivre est ensuite incorporé dans la forme apoprotéine du récepteur à l'éthylène. HMA7 serait aussi impliquée dans l'élongation cellulaire (Woegel & Kieber, 2000). L'expression de HMA5 est fortement induite par le cuivre et les mutants d'insertion *hma5* sont hypersensibles au cuivre. Ces données suggèrent que HMA5 aurait un rôle dans la détoxification de la cellule (Andrés-Colás *et al.*, 2006). HMA6 et HMA8 sont localisées respectivement dans l'enveloppe et les thylacoïdes des chloroplastes (voir ci-dessous pour leur description).

Les ATPases HMA2, 3 et 4 appartiennent au groupe P_{1B-4}. HMA3 est localisée dans la vacuole et contribue à la détoxification des métaux en séquestrant le zinc, le cadmium et le plomb dans cet organite (Gravot *et al.*, 2004). HMA2 et 4 sont associées à la membrane plasmique et sont impliquées dans le transport à longue distance du zinc pour alimenter les parties aérienne de la plante (Hussain *et al.*, 2004). HMA4 a aussi un rôle important dans la détoxification des métaux (Mills *et al.*, 2005).

Sous-groupe	Spécificité	Nom de l'ATPase	Localisation sub-cellulaire
1B1	Cu ⁺ , Ag ⁺	HMA5 PAA1 / HMA6 RAN1 / HMA7 PAA2 / HMA8	Membrane plasmique Chloroplaste Réticulum endoplasmique Thylacoïdes
1B2	Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺	HMA2 HMA3 HMA4	Membrane plasmique Vacuole Membrane plasmique
1B4	Cu, Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺	HMA1	Chloroplaste

Tableau 3 : Liste et classification des ATPases de type P_{1B} chez *Arabidopsis thaliana*.

HMA1 appartient au groupe P_{1B-4} et est associée à l'enveloppe des chloroplastes. Sa spécificité ionique est encore très controversée (voir chapitres I et III). Le paragraphe suivant décrit en détail cette ATPase ainsi que les 2 autres ATPases chloroplastiques **HMA6/PAA1** (enveloppe) et **HMA8/PAA2** (thylacoïdes).

IV. LES ATPASES DE TYPES P_{1B} ASSOCIEES AU CHLOROPLASTE

Les chloroplastes d'*Arabidopsis* contiennent trois ATPases de type P_{1B} récemment caractérisées. Ce paragraphe décrit les données qui étaient disponibles au début de ce travail de thèse concernant la fonction de ces protéines dans l'homéostasie des métaux chloroplastiques et plus particulièrement du cuivre.

A. PAA1/HMA6, une ATPase de l'enveloppe des chloroplastes impliquée dans l'import du cuivre

PAA1 ou HMA6 (AT4G33520, Q9SZC9) est une ATPase de type P_{1B-1}, ATPase Cu⁺/Ag⁺. Son N-MBD est composé d'un motif MXCXXC et son domaine de translocation des métaux est composé d'un motif CPC (Figure 15). Elle contient 8 hélices transmembranaires prédites et une séquence d'adressage chloroplastique en N-terminal (voir annexe 2).

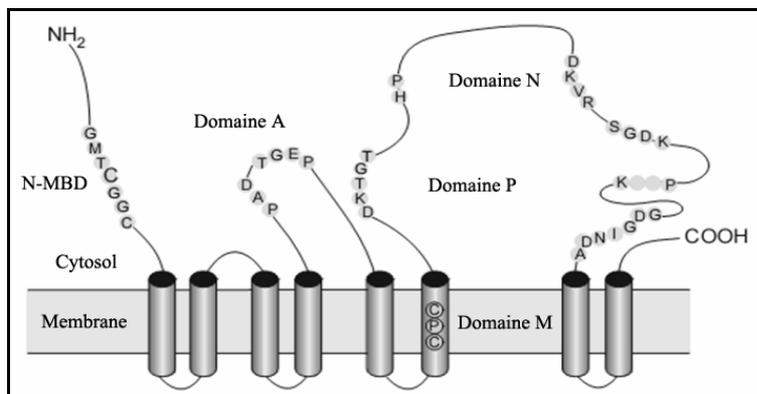


Figure 15 : Représentation schématique de HMA6/PAA1.
Voir annexe 2.

Cette protéine a été identifiée lors d'un criblage de mutants (obtenus par mutagenèse à l'EMS) présentant un défaut dans la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques (Shikanai *et al.*, 2003). Sa localisation dans l'enveloppe des chloroplastes a été validée par expression transitoire de la protéine fusionnée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) dans des protoplastes d'*Arabidopsis*.

1. Impact de la délétion de PAA1 sur la photosynthèse

Le mutant *paal* présente une forte émission de fluorescence de la chlorophylle suggérant une déficience dans le transfert des électrons photosynthétiques. Deux paramètres de la fluorescence de la chlorophylle ont été analysés dans ces mutants : le taux de transport d'électrons (ETR) et le quenching non photochimique (NPQ). Le taux de transfert d'électrons

(ETR) dans le mutant PAA1 représente 30 % de celui d'une plante WT indiquant que la chaîne de transfert d'électrons est affectée dans ce mutant. L'induction du NPQ est aussi sévèrement affectée dans le KO *paal*. Sachant que le composant majeur du NPQ dépend de l'accumulation d'un fort ΔpH au sein des thylacoïdes (Muller *et al.*, 2001). Ce résultat suggère que le ΔpH formé par le transfert d'électrons dans un KO *paal* pendant la photosynthèse n'est pas suffisant pour induire le NPQ même à de fortes intensités lumineuses. Le transport d'électrons dans *paal* est limité entre Q_A dans le PSII et P700 dans le PSI, probablement au niveau de la plastoquinone, le cytochrome *b₆f* ou la plastocyanine. Dans les plantes WT, la plastocyanine est majoritairement présente sous forme holo-enzyme alors que dans les mutants KO *paal*, elle est très majoritairement présente sous forme apo-enzyme. En revanche, les niveaux de transcrits de la plastocyanine ne diffèrent pas entre les plantes de type WT et les plantes KO *paal*. Ces résultats suggèrent que PAA1 permettrait de fournir du cuivre à l'apo-plastocyanine.

2. Impact de la délétion de PAA1 sur le contenu en cuivre chloroplastique

Les plantes dépourvues de PAA1 présentent un phénotype de retard de croissance et de photosensibilité par rapport à des plantes WT. Ce phénotype est supprimé après ajout de cuivre dans le milieu de culture. Dans ces conditions (ajout de 5 à 10 μM de cuivre), le transport d'électrons ainsi que la quantité de chlorophylle sont restaurés. Cependant, de plus fortes concentrations en cuivre (50 μM) sont toxiques indiquant que le KO *paal* ne confère pas aux plantes une résistance à un excès de cuivre. La quantité de cuivre dans les feuilles des KO *paal* est similaire à celle présente dans les feuilles des plantes WT. En revanche, la quantité de cuivre est réduite d'environ 50 % dans le stroma et d'un facteur 4 dans les thylacoïdes de chloroplastes issus de plantes KO *paal*.

3. Impact de la délétion de PAA1 sur les isoformes des SOD

Le KO *paal* présente des activités SOD à cuivre et à fer chloroplastiques réduites par rapport aux activités mesurées dans les chloroplastes de plantes WT. L'activité SOD à manganèse mitochondriale ne varie pas alors que l'activité SOD à cuivre cytoplasmique est augmentée par rapport aux activités mesurées dans des plantes WT. La diminution de l'activité de la SOD à fer est corrélée à une diminution de transcrits codant pour cette protéine. Ce n'est pas le cas des SOD à cuivre chloroplastique (CSD2) et cytosolique (CSD1). En effet, le KO *paal* présente une augmentation du niveau de transcrits CSD1 et CSD2 ainsi qu'une augmentation de la quantité de polypeptides. La diminution de l'activité SOD à cuivre chloroplastique résulterait de la carence en cuivre dans le stroma limitant ainsi la formation de l'holoenzyme CSD2.

Le cuivre n'étant pas limitant au sein du cytoplasme, cela peut expliquer pourquoi CSD1 est plus active dans un KO *paal* que dans une plante WT.

Shikanai et collaborateurs (2003) suggèrent que PAA1 serait la voie principale d'import du cuivre dans le chloroplaste pour alimenter la SOD à cuivre CSD2 et la plastocyanine via l'ATPase HMA8 localisée dans les thylacoïdes.

B. PAA2/HMA8, une ATPase à cuivre associée aux thylacoïdes

PAA2 ou HMA8 (AT5G21930, Q7Y051) a aussi été identifiée en cherchant des mutants affectés dans le transfert d'électrons photosynthétiques (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). PAA2 présente 43 % d'identité avec la séquence de PAA1. PAA2 appartient au groupe des ATPases de type P_{1B-1}, ATPase Cu⁺/Ag⁺. PAA2 possède un domaine N-MBD avec la séquence consensus MxCxxC ainsi qu'un domaine de translocation des métaux de type CPC. PAA2 possède une séquence de transit chloroplastique et est localisée dans les thylacoïdes.

1. Impact de la délétion de PAA2 sur la photosynthèse

Le mutant *paa2* est affecté dans la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques, même pour de faibles intensités lumineuses, mais de manière moins drastique que le mutant *paa1*. Ce phénotype est supprimé par la surexpression de PAA2 dans le mutant *paa2*. Comme cela est observé pour le mutant *paa1*, l'ajout de cuivre dans le milieu supprime le phénotype de photosensibilité du mutant *paa2*. Dans ces conditions, la quantité en chlorophylle est restaurée ainsi que le transport des électrons. Le mutant *paa2* présente une réduction de plus de 80 % du contenu en plastocyanine, ce qui explique la perturbation observée au niveau du transport d'électrons.

2. PAA2 est requise pour le transport de cuivre vers les thylacoïdes

Un défaut dans l'expression ou le fonctionnement de PAA1 devrait affecter la quantité de cuivre présente dans le stroma et dans les thylacoïdes tandis qu'un défaut dans l'expression ou le fonctionnement de PAA2 ne devrait affecter que la quantité de cuivre au sein des thylacoïdes.

Des dosages de métaux au niveau des feuilles montrent qu'il n'y a pas de différence significative de quantité de cuivre, fer et zinc entre une plante WT et un KO *paa2*. La quantité de cuivre dans les chloroplastes issus de plantes KO *paa2* est légèrement inférieure à celle mesurée pour des plantes WT. Cependant une très forte diminution de la quantité de cuivre dans les thylacoïdes a été observée pour ce mutant *paa2*. Les quantités de fer augmentent légèrement dans le stroma les thylacoïdes de ces mutants *paa1* et *paa2*. Par rapport à des plantes WT, la quantité de zinc au sein de chloroplastes issus de mutants *paa1* et *paa2* est significativement supérieure à celle de plantes WT. Cette quantité de zinc pourrait être corrélée à l'augmentation de SOD Cu/Zn dans le stroma qui générerait une réserve plus importante de zinc dans le chloroplaste.

L'activité de la SOD à cuivre chloroplastique (CSD2) ainsi que les quantités de transcrit et de protéine augmentent dans les mutants *paa2*. Ceci est en accord avec un rôle de PAA2 dans

l'import du cuivre dans les thylacoïdes. En effet dans ce cas la perte de fonction de PAA2 n'a pas d'impact sur CSD2, localisée dans le stroma.

PAA2 permettrait donc d'importer le cuivre dans le lumen des thylacoïdes, cuivre utilisé par la plastocyanine. Le fait que les mutants *paa1* et *paa2* puissent être tous les deux complétés par ajout de cuivre dans le milieu suggère **l'existence d'autres transporteurs de cuivre à la fois dans l'enveloppe et les thylacoïdes des chloroplastes.**

C. HMA1, une ATPase à cuivre associée à l'enveloppe des chloroplastes

HMA1 (AT4G37270, Q9M3H5) a été identifiée dans l'enveloppe des chloroplastes suite à une approche protéomique ciblée sur l'enveloppe et développée au laboratoire PCV (Ferro *et al.*, 2003). Cette protéine de 84 kDa (forme mature) appartient au sous-groupe 1B4 d'après la classification établie en 2003 par Argüello. HMA1 a des caractéristiques qui lui sont propres : (a) elle possède 6 ou 7 hélices transmembranaires prédites, (b) son extrémité N-terminale contient un N-MBD riche en histidines et (c) son domaine de translocation des métaux est composé d'un motif SPC (Figure 16 et annexe 1).

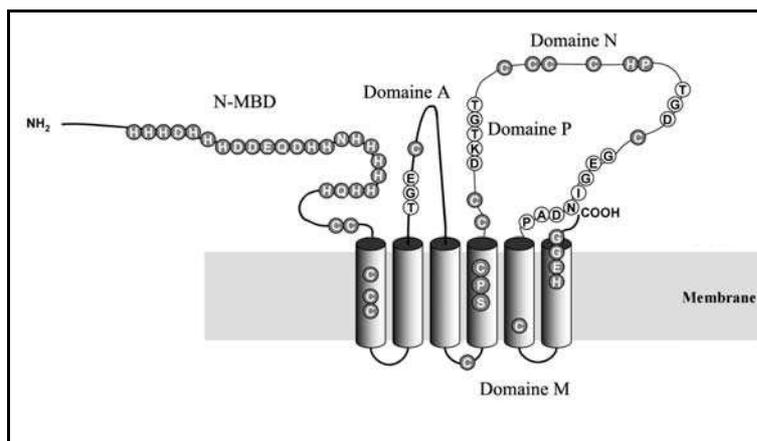


Figure 16 : Représentation schématique de HMA1.

Voir annexe 1.

Les données décrites ci-dessous ont été obtenues au laboratoire avant mon arrivée (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006).

La localisation plastidiale de HMA1 a été validée par expression transitoire dans des feuilles d'*A. thaliana* de la protéine fusionnée à la GFP et sa localisation dans l'enveloppe des chloroplastes a été démontrée par immunodétection sur des fractions subplastidiales purifiées. La caractérisation fonctionnelle de HMA1 a été ensuite initiée par une approche en système hétérologue levure (en collaboration avec Antoine Gravot, Pascaline Leroy, Alain Vavasseur et Pierre Richaud du laboratoire LEMS au CEA Cadarache) et par une approche *in planta*.

1. Analyse fonctionnelle de l'ATPase HMA1, approche par expression en levure

L'expression de la forme mature de HMA1 dans une souche WT de levure affecte la croissance des levures et entraîne une accumulation intracellulaire du cuivre et du zinc. Ce phénotype n'est pas observé lorsque les levures expriment une forme inactive de HMA1

(mutation **A**KTG au niveau du site catalytique **D**KTG). Ces résultats suggèrent que HMA1, en système hétérologue levure, serait impliquée dans le transport du zinc et du cuivre. Afin d'analyser le rôle de différents résidus conservés de HMA1, différentes formes mutées de HMA1 ont été exprimées en levure. L'expression de HMA1 dépourvue de son domaine riche en histidines n'affecte pas la croissance cellulaire sur milieu standard, suggérant ainsi que le transport du métal est affecté par cette délétion. En revanche, les cellules qui expriment cette construction sont sensibles à de fortes concentrations de cuivre et de zinc. Ceci suggère l'existence d'une activité de transport résiduelle, qui pourrait participer à l'intoxication cellulaire en présence de fortes concentrations de métaux. Ainsi, le domaine riche en histidines ne semble pas être impliqué directement dans le transport des métaux mais plutôt dans la régulation de ce transport. Les levures qui expriment des formes de HMA1 portant des mutations ponctuelles (**C**PC et **D**EGG) au niveau des motifs conservés **S**PC et **H**EGG (dans les hélices transmembranaires potentielles 4 et 6) présentent une croissance normale et ne montrent pas d'hypersensibilité aux métaux. Il semble donc qu'il n'y ait pas d'activité de transport des métaux dans ces cellules. Ces résidus seraient ainsi impliqués dans la transduction du métal plutôt que dans la régulation du transport.

2. Analyse fonctionnelle de l'ATPase HMA1, approche *in planta*

Cette approche a été réalisée au laboratoire sur différentes lignées : des plantes WT, des plantes qui surexpriment HMA1 sous le contrôle d'un promoteur fort constitutif 35S (3 lignées indépendantes), et deux lignées indépendantes d'insertion pour le gène *HMA1* (ACT7 et DRC42, lignées issues de la banque de mutants d'insertion de l'INRA de Versailles).

Dans des conditions de croissance standard, les mutants d'insertion *hma1* et les surexprimeurs ne présentent pas de phénotype morphologique apparent par rapport à des plantes WT. Cependant, les dosages de métaux effectués à partir de feuilles et de chloroplastes, issus de ces différentes lignées, montrent une diminution de 50 % du contenu en cuivre dans les chloroplastes des mutants *hma1*. Aucune variation significative n'a été trouvée pour les autres ions métalliques analysés. La surexpression de HMA1 dans un fond génétique sauvage *Ws* n'induit pas d'accumulation de métaux ni dans la feuille, ni dans les chloroplastes.

Ces diverses plantes ont une croissance identique en condition normale de culture. En revanche, les mutants d'insertion *hma1* présentent une photosensibilité pour des intensités lumineuses supérieures à 180 $\mu\text{moles de photon / sec / m}^2$, photosensibilité se traduisant par à un blanchissement total ou partiel ("variegated phenotype") des feuilles. Ce phénotype de photosensibilité du KO *hma1* n'est pas supprimé par addition de cuivre dans le milieu de culture.

Les plantes surexprimant HMA1 ne sont pas sensibles à de fortes concentrations en cuivre, ce qui est en accord avec le fait que les chloroplastes des surexprimeurs HMA1 n'accumulent pas plus de cuivre que les chloroplastes sauvages (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Ceci suggère l'existence d'un système de régulation de l'homéostasie du cuivre dans le chloroplaste

impliquant soit une/des métallochaperonnes, un système d'efflux de ce métal ou encore un contrôle de l'activité des ATPases HMA1 et PAA1.

Dans le chloroplaste, le cuivre est utilisé par deux protéines : la SOD Cu/Zn (CSD2) qui intervient dans la détoxification des espèces activées de l'oxygène, et la plastocyanine qui intervient dans la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques. L'expression de ces deux protéines a donc été analysée dans les mutants *hma1* et les surexprimeurs HMA1. Les mutants *hma1* ont une activité SOD chloroplastique totale (SOD Cu/Zn et SOD Fe) réduite de moitié par rapport à l'activité mesurée dans les plantes sauvages et les surexprimeurs. Ces mutants présentent aussi une diminution de transcrits de CSD2. En revanche, aucune variation du pool de plastocyanine n'a été mesurée (collaboration Giovanni Finazzi et Fabrice Rappaport, IBPC, Paris). Il est probable qu'en condition de stress lumineux, l'activité SOD chloroplastique des mutants *hma1* devienne limitante. Il en résulte ainsi une plus faible détoxification des radicaux libres produits par l'activité photosynthétique, ce qui se traduit par un blanchiment total ou partiel des feuilles.

Des mesures d'activité ATPase réalisées sur les membranes d'enveloppe de chloroplastes des différentes lignées (WT, mutant d'insertion et surexprimeurs) montrent que l'activité ATPase associée à HMA1 est spécifiquement augmentée en présence de cuivre. Ces mesures montrent que les ions cobalt, zinc, argent, manganèse ou fer n'ont pas d'impact sur l'activité de HMA1. De plus, ces mesures montrent que l'activité mesurée dans l'enveloppe de chloroplastes des mutants *hma1* est toujours (avec ou sans ajout d'ions métalliques) plus faible que celle mesurée dans l'enveloppe de chloroplastes issus de plantes WT. Ceci suggère que l'activité de PAA1 ne compense pas la perte de HMA1.

La caractérisation des mutants d'insertion *hma1* et les analyses biochimiques (mesure de l'activité ATPase) montrent donc que HMA1 (comme PAA1) est impliquée dans le transport du cuivre au sein du chloroplaste.

3. Rôles respectifs de HMA1 et PAA1 dans l'enveloppe des chloroplastes ?

Ainsi, la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste contient deux ATPases de type P_{1B}, HMA1 et PAA1, qui sont impliquées dans l'import du cuivre dans le chloroplaste. Les phénotypes des mutants affectés dans l'expression de ces deux protéines présentent des similarités importantes : les chloroplastes des mutants d'insertion *hma1* (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006) comme les chloroplastes des mutants *paal* (Shikanai *et al.*, 2003) contiennent moins de cuivre et une activité SOD réduite. En conséquence, les mutants d'insertion *hma1* comme les mutants *paal* sont photosensibles.

Toutefois, l'interruption des gènes codant ces deux ATPases HMA1 et PAA1 a aussi des conséquences différentes suggérant que, si l'activité de ces deux protéines est similaire, leurs rôles respectifs sont différents *in planta*. En effet, contrairement aux mutants *hma1*, les mutants *paal* ont un pool de plastocyanine réduit et leur phénotype peut être supprimé par ajout de cuivre dans le milieu de culture (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Au contraire, les mutants

hma1 ne sont pas affectés dans leur pool de plastocyanine et l'ajout de cuivre dans le milieu de culture ne restaure pas le développement des mutants *hma1* cultivés sous une forte intensité lumineuse. Ceci suggère que l'ATPase PAA1 ne peut compenser la perte de HMA1, même lorsque les plantes sont cultivées en présence de concentrations plus importantes de cuivre. Ces observations sont en accord avec les mesures d'activité ATPase réalisées sur les fractions d'enveloppe purifiée, qui démontrent qu'en présence de cuivre, l'activité ATPase totale mesurée sur l'enveloppe des chloroplastes des mutants *hma1* n'atteint pas la valeur mesurée sur l'enveloppe des plastes issue des plantes WT. Ces résultats suggèrent aussi que les plantes n'ont pas la possibilité de surexprimer PAA1 en réponse à la carence de HMA1.

L'ensemble de ces données suggère que ces **deux ATPases jouent un rôle différent dans l'homéostasie et l'import du cuivre dans le chloroplaste**. Ainsi, PAA1 représenterait la voie principale d'import du cuivre dans le chloroplaste pour alimenter la photosynthèse (la plastocyanine) alors que HMA1 constituerait une voie additionnelle d'import du cuivre, voie essentielle à la plante pour répondre à un stress oxydatif généré notamment lors de fortes intensités lumineuses (Figure 17). La sélectivité des deux voies pourrait avoir plusieurs origines. Il a été proposé que PAA1 fournirait du cuivre à une métallochaperonne (CCS) qui interagirait avec la SOD chloroplastique Cu/Zn et à PAA2 via une métallochaperonne encore non identifiée (Pilon *et al.*, 2006). HMA1 pourrait transférer le cuivre à CCS ou une autre métallochaperonne (X dans le modèle) qui interagirait principalement avec la SOD puisque seule l'activité SOD est affectée chez les mutants *hma1*. Une différence entre ces deux ATPases pourrait aussi provenir de la charge (cuivre 2+ pour HMA1, cuivre 1+ pour PAA1) du cuivre transporté.

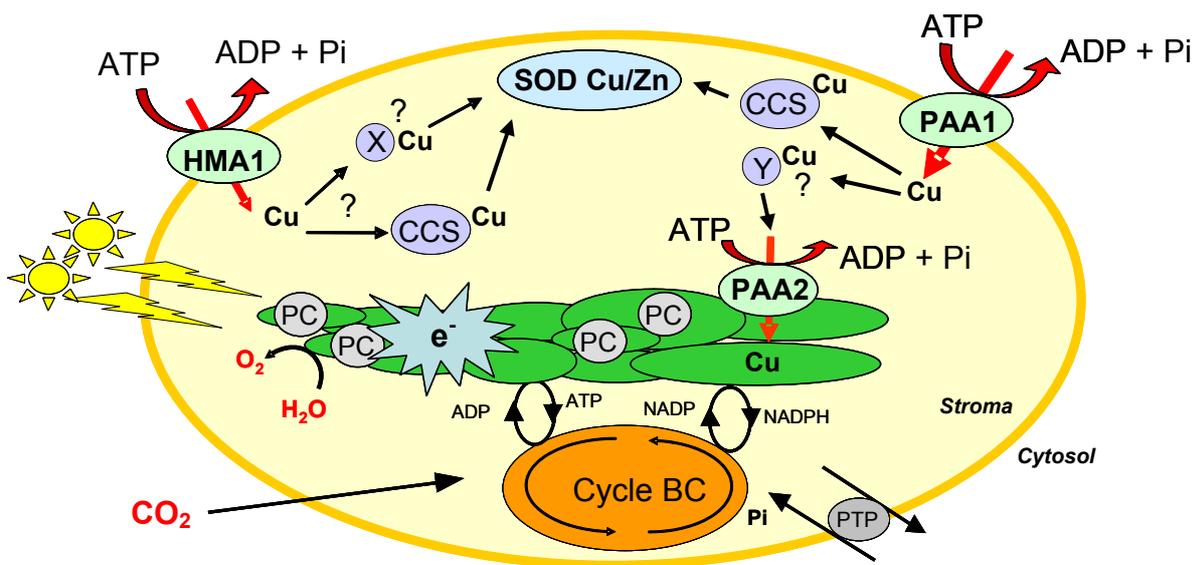


Figure 17 : Modèle présentant les rôles potentiels de HMA1 et PAA1 dans l'import du cuivre chloroplastique.

PTP : transporteur de phosphate/trioses-phosphate ; BC : cycle de Benson & Calvin ; PC : plastocyanine ; CCS : métallochaperonne à cuivre.

Quel que soit le modèle envisagé, ces données obtenues sur les protéines HMA1, PAA1 et PAA2 suggèrent que **les plastes ont besoin de plusieurs systèmes de transport du cuivre et d'une régulation fine de ces voies d'import afin de fournir le cuivre nécessaire à la photosynthèse et afin de répondre aux stress oxydatifs** générés lors de fortes intensités lumineuses.

V. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les objectifs du travail de thèse reposaient sur le constat suivant : la membrane interne de l'enveloppe contient deux ATPases permettant l'import du cuivre dans le chloroplaste. Nous avons donc souhaité identifier la raison de cette apparente redondance fonctionnelle. Afin d'obtenir de nouvelles informations sur HMA1 et PAA1, nous avons développé en parallèle deux stratégies complémentaires :

- La première stratégie était basée sur **l'étude des rôles respectifs de HMA1 et de PAA1 *in planta*** et reposait en particulier sur la disponibilité des deux mutants d'insertion *hma1* (disponible au laboratoire) et *paal* (collaboration avec Marinus Pilon, USA).

- La seconde stratégie visait à **caractériser *in vitro* ces deux ATPases afin de déterminer leurs spécificités ioniques**. Cette stratégie reposait sur un pré requis essentiel : réussir à produire les protéines HMA1 et PAA1 dans un système hétérologue adapté aux protéines membranaires.

A. Etude des rôles respectifs de HMA1 et PAA1 *in planta*

Afin de distinguer les rôles respectifs de HMA1 et PAA1 *in planta*, nous nous sommes posés différentes questions :

- ***HMA1* et *PAA1* sont-elles régulées au niveau transcriptionnel ?**

Nous avons ainsi analysé les **réponses transcriptionnelles de gènes dont le produit est lié à l'homéostasie du cuivre et en particulier *HMA1* et *PAA1*** dans des plantes sauvages et des KO *paal* cultivés dans différentes conditions (excès de métaux, stress lumineux). Nous avons aussi cherché des conditions de culture pour lesquelles apparaissent de nouveaux phénotypes liés à la perte ou la surexpression de HMA1. Identifier de **nouvelles conditions de culture permettant de révéler la fonction de HMA1** nous permettrait de mieux appréhender son rôle au sein de la plante. Pour cela nous avons soumis les mutants *hma1* et les surexprimeurs HMA1 à divers stress métalliques, lumineux et salins.

- ***HMA1* et *PAA1* sont-elles les deux seules voies d'import du cuivre dans le chloroplaste ?**

Cette approche reposait sur la disponibilité des deux simples mutants d'insertion *hma1* (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006) et *paal* (Shikanai *et al.*, 2003). Nous avons donc **généré, par croisement des deux lignées homozygotes, un double mutant *hma1-paal***. Le chloroplaste nécessite du cuivre pour son fonctionnement, en particulier pour la plastocyanine. La perte de fonction des deux isoformes de la plastocyanine est létale pour la plante (Weigel *et al.*, 2003).

Nous nous attendions donc à ce que le double mutant *hma1-paa1* ne soit pas viable à l'état homozygote si HMA1 et PAA1 sont effectivement les seules voies d'import du cuivre dans le chloroplaste. Au contraire, si le double mutant était viable, nous pouvions déduire de cette expérience qu'une autre voie d'import du cuivre est présente dans l'enveloppe des plastes.

- HMA1 et PAA1 présentent-elles des redondances fonctionnelles in planta ?

Le mutant *paa1* présente un phénotype de photosensibilité pour de faibles intensités lumineuses (au delà de 50 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$) qui peut être supprimé par ajout de cuivre dans le milieu de culture. Si les deux ATPases HMA1 et PAA1 présentent des redondances fonctionnelles partielles, nous nous attendions à ce que **la surexpression de HMA1 dans un fond génétique mutant *paa1*** permette une suppression partielle du phénotype induit par la perte de fonction de PAA1. Au contraire, en l'absence de redondance fonctionnelle partielle entre ces deux protéines, cela indiquait que les fonctions de ces ATPases à cuivre de l'enveloppe du chloroplaste sont totalement distinctes *in vivo*.

- Est-il possible d'identifier un ou plusieurs partenaires de la protéine HMA1 ?

D'après les données issues des travaux préalables du laboratoire (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006), HMA1 permettrait de fournir du cuivre à la Cu/Zn SOD, enzyme impliquée dans la détoxification des radicaux libres produits au niveau de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques. Afin d'identifier la **métallochaperonne interagissant avec HMA1** (et la Cu/Zn SOD) ou de déterminer si HMA1 interagit avec d'autres protéines pour catalyser d'autres fonctions au sein du chloroplaste, nous avons envisagé de produire des plantes transgéniques surexprimant des versions étiquetées de HMA1, puis purifier HMA1 par affinité à partir de ces plantes.

B. Caractérisation *in vitro* des deux ATPases HMA1 et PAA1

La production et la caractérisation biochimiques des protéines membranaires en général, et des ATPases en particulier, étant extrêmement difficile, la quasi-totalité des données fonctionnelles disponibles sur ces protéines provient de mesures indirectes : complémentation de mutants de levure, mesure des concentrations ioniques dans les tissus ou compartiments subcellulaires des mutants d'*Arabidopsis*... En obtenant les spécificités ioniques et les paramètres cinétiques des deux protéines d'HMA1 et PAA1, nous souhaitons mettre en évidence les similarités et les différences de ces ATPases.

- La **spécificité ionique de HMA1** étant sujette à discussion, il était nécessaire de déterminer avec précision les métaux transportés par cette ATPase *in vitro*. En effet, HMA1 pourrait transporter du cuivre, du zinc, du cobalt, du cadmium et du calcium (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Moreno *et al.*, 2008), **gamme de spécificité normalement couverte par trois types différents d'ATPases de type P.**

- La **valence du cuivre transporté par HMA1** était inconnue. On peut présumer que HMA1 transporterait du cuivre 2+ puisqu'elle possède un N-MBD riche en histidines pouvant

lier des cations divalents mais aucune étude n'a été faite sur la valence du cuivre transporté. De plus, il semblerait que le N-MDB de HMA1 soit plus un domaine de régulation de la protéine plutôt qu'un indicateur de sa spécificité ionique (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006).

- Enfin, obtenir des données cinétiques sur HMA1 et PAA1 devait nous permettre de **comparer ces deux ATPases et mieux comprendre leur fonctionnement** en particulier en lien avec leurs rôles respectifs dans l'enveloppe du chloroplaste.

Toutefois, avant même d'obtenir des paramètres cinétiques pour ces protéines, il était nécessaire de les produire en système hétérologue, les solubiliser et les purifier. Lorsque ce travail de thèse a été initié (mais c'est toujours vrai à la date de rédaction du manuscrit) aucune étude n'était disponible dans la littérature concernant la caractérisation biochimique d'ATPases de plantes produites en système hétérologue puis purifiées. De plus, les essais préalables d'expression en système hétérologue levure ou *E. coli* ne permettaient pas de produire des quantités suffisantes de protéines pour envisager leur purification et caractérisation ultérieures. La mise au point de protocoles pour l'expression de ces protéines, leur extraction à partir des protéines membranaires totales, leur solubilisation et leur purification étaient donc des étapes préalables à la caractérisation biochimique des deux ATPases HMA1 et PAA1.

Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE

A. Présentation du modèle végétal utilisé : *Arabidopsis thaliana*

Le modèle végétal utilisé est la plante *Arabidopsis thaliana*. En effet, ses caractéristiques sont particulièrement adaptées à un usage en laboratoire : son génome de petite taille (120 mégabases) a été entièrement séquencé (The AGI, 2000), son cycle de reproduction est de l'ordre de 5 semaines, elle peut être cultivée sur milieu gélosé et sur terre. Son mode de reproduction (autogame) ne nécessite pas de soins fastidieux et évite les contaminations entre différentes lignées lorsqu'elles poussent dans une même pièce. Enfin, les techniques de transformation de cette plante sont relativement aisées. Les écotypes utilisés au cours de cette étude sont Columbia (Col) et Wassilevskiya (Ws).

B. Conditions de culture d'*Arabidopsis thaliana*

1. Conditions de culture *in vitro*

Pour la culture *in vitro*, les graines sont stérilisées par incubation (10 min) dans 1 mL d'un mélange contenant 9 volumes d'éthanol et 1 volume d'une solution de barychlore (1 comprimé de Barychlore (Inov'Chem), Triton X-100 0,5 % [p/v], dans 40 mL d'eau distillée), puis rincées deux fois avec de l'eau stérile.

Les graines sont ensuite diluées dans une solution d'agarose 0,2 % [p/v], préalablement autoclavée, afin d'obtenir une suspension homogène. Elles sont alors semées une à une, en conditions stériles, sur un milieu nutritif MS solide (poudre Murashige et Skoog (MS, Duchefa Biochemie) 0,44 % [p/v], saccharose 0,5 % [p/v], select agar 0,8 % [p/v], pH 5,7; milieu autoclavé 20 min à 121°C). Ces boîtes sont incubées 2 jours à 4°C (afin de lever la dormance des graines et synchroniser la germination) puis placées en pièce de culture (phytotron) à la lumière (100 μ moles de photon / sec / m²) La photopériode est fixée à 10 h par jour, la température et l'hygrométrie sont respectivement fixées à 22°C et 65 %. Ce cycle court permet aux plantes de développer essentiellement leurs parties foliaires.

2. Condition de culture en terre

Après trois semaines de croissance sur milieu gélosé, les plantules sont transférées sur terreau et cultivées en cycle "jours courts". Pour l'obtention de graines, les plantes sont transférées en cycle "jours longs" (photopériode de 16 h) dès l'apparition des tiges. Lorsque les siliques se forment, des sachets sont placés sur les parties aériennes des plantes afin de récolter les graines et l'arrosage est arrêté afin d'accélérer la maturation des graines. Lorsque les plantes

sont sèches, les graines sont récupérées et conservées dans un grainier (température : 16°C, humidité : 25 %).

3. Conditions particulières de culture

- Les plantes dépourvues de la protéine PAA1 présentent un phénotype de retard de croissance et de photosensibilité par rapport à des plantes de type sauvage. Ce phénotype peut être atténué par ajout de cuivre dans le milieu (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Pour une croissance optimale de cette lignée, les graines germent sur milieu MS supplémenté avec du CuSO₄ 5 µM. Après deux semaines de croissance sur ce milieu, les plantes sont transférées en terre. Les pots sont placés à une intensité lumineuse de 50 µmoles de photon / sec / m² et les plantes sont arrosées avec de l'eau supplémentée avec du CuSO₄ 30 µM.
- Selon les tests phénotypiques effectués, différentes concentrations de CuSO₄, de ZnSO₄, ou de FeSO₄ sont ajoutés au milieu de culture. Les cultures sont réalisées dans une enceinte climatisée à 22°C, en condition de jour court (10 h de lumière) sous une intensité lumineuse variable. Les phénotypes des plantes sont analysés 15 et 21 jours après qu'elles aient été placées dans l'enceinte.

C. Croisement entre deux lignées d'*Arabidopsis thaliana*

Ce type de croisement est utilisé pour générer le double mutant *paal-hmal* à partir des simples mutants (ko) homozygotes. Le mutant *paal* a été obtenu par mutagenèse (Shikanai *et al.*, 2003) et ne possède pas de marqueur de sélection. En revanche, le mutant d'insertion *hmal* possède le gène de résistance à la kanamycine. Ainsi, les croisements sont réalisés par fécondation des plantes KO *paal* par le pollen des mutants d'insertion *hmal*. Dans ces conditions, les descendants issus de ce croisement peuvent être facilement analysés : seules les plantes résistantes à la kanamycine proviennent de graines issues de ces croisements. Lorsque les plantes arrivent à floraison, une étamine mature d'une des plantes à croiser est prélevée. Le croisement est réalisé par frottement des étamines du mutant *hmal* sur le pistil d'une jeune fleur (encore non ouverte, pour éviter les autofécondations) du mutant *paal*, fleur à laquelle on a préalablement retiré les sépales, pétales et étamines. Les graines obtenues sont ensuite semées sur milieu gélosé contenant de la kanamycine afin de sélectionner les transformants. L'identification des doubles mutants homozygotes est réalisée par PCR (voir chapitre I).

Les amorces utilisées pour le génotypage sont les suivantes :

Locus ciblé	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')	Allèle amplifié
<i>HMA1</i>	Tag 5	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	<i>hma1</i>
	<i>hma1</i> sens	CACCTCGAAGATCAGCCTCG	<i>HMA1</i>
	<i>hma1</i> antisens	CAGTTTAAGCTCTGCACATTAGGAGCTCACT	<i>HMA1</i> et <i>hma1</i>
<i>PAA1</i>	<i>paa1</i> sens	GTGATCTGCAGAATTCAACTGTTG	<i>PAA1</i> et <i>paa1</i>
	<i>paa1</i> muté	GTTTATAGATCCTGCTGCGACTTA	<i>paa1</i>
	<i>paa1</i> WT	GTTTATAGATCCTGCTGCGACTTG	<i>PAA1</i>

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'identification du double mutant *hma1/paa1*.

D. Purification de chloroplastes intacts à partir de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

Après deux mois de culture en terre, les plantes sont placées une nuit à l'obscurité à 4°C. Les feuilles (entre 2 et 4 g) sont récoltées et coupées en morceaux de 0,5 cm². Les feuilles sont ensuite placées dans un erlen contenant 30 mL de milieu PIB (Protoplast Isolation Buffer : sorbitol 0,5 M ; MES 10 mM : pH 6,0 ; CaCl₂ 1 mM ; pectinase 1,6 % [p/v] et cellulase 0,25 % [p/v]). Après une infiltration sous vide d'1 min, les suspensions sont incubées à l'obscurité pendant 2 h 30 à 28°C. La suspension est ensuite filtrée au travers de 4 épaisseurs de gaze et centrifugée à 100 g, à 4°C pendant 5 min. Le culot contenant cellules intacts est repris dans 5 mL de tampon PSB (Protoplast Storage Buffer : sorbitol 0,5 ; MES 10 mM, pH 6,0), puis l'ensemble est ajouté à 30 mL de milieu PPB (Protoplast Percoll Buffer composé de milieu PSB 1x et de Percoll 50 % [v/v]) et centrifugé à 100 g, à 4°C pendant 5 min. Le culot correspondant aux cellules intacts est repris dans 3 mL de tampon PLB (Protoplast Lysis Buffer composé de sorbitol 0,4 M ; tricine 20 mM pH 8,4 ; EDTA 10 mM pH 8 ; NaHCO₃ 10 mM ; SAB 0,1 % [p/v]).

Les cellules sont lysées par un passage au travers d'un filtre de nylon de 10 µm de maille à l'aide d'une seringue. Le lysat est déposé sur un gradient de Percoll continu constitué de tampon de lavage (sorbitol 0,4 M ; Hepes 20 mM pH 7,6 ; EDTA 2,5 mM pH 8 ; NaHCO₃ 10 mM ; SAB 0,3 % [p/v]) et de Percoll 50 % [v/v] préalablement préformé par centrifugation à 38 000 g pendant 55 minutes à 4°C (rotor SS34). Les chloroplastes intacts sont séparés des autres organites et des débris cellulaires par centrifugation à 13 000 g pendant 10 min, à 4°C (rotor HB6). Les chloroplastes intacts sont prélevés, dilués dans 10 mL de tampon de rinçage et centrifugés à 1 500 g pendant 90 sec à 4°C (rotor SS34). Le culot de chloroplastes intacts est repris dans 200 µL de tampon de lavage et stocké à -80°C.

La concentration en chlorophylle de la suspension de chloroplastes est mesurée après solubilisation des chlorophylles dans l'acétone 80 % [v/v] et mesure de l'absorbance à 652 nm ($A_{652} \times 26 = X$ mg de chlorophylle / ml de suspension de chloroplastes).

II. TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES

A. Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Une gamme étalon est effectuée pour chaque série de dosage avec la sérum-albumine bovine (SAB).

B. Extraction des protéines membranaires totales de feuilles d'*Arabidopsis*

Les feuilles (environ 80 mg) sont congelées dans de l'azote liquide puis broyées dans un tube Eppendorf, à l'aide d'un Potter dans 300 μ L de tampon de broyage (SAB 1 g/L ; pyrophosphate de tétrasodium 0,22 mM). La présence de SAB permet de limiter l'action des protéases. Une centrifugation à 130 000 g pendant 20 min à 4°C (ultracentrifugeuse Sorvall himac CS 120) permet de séparer les protéines solubles (présentes dans le surnageant) des protéines membranaires contenues dans le culot.

Afin d'éliminer la SAB, le culot est lavé avec 150 μ L de tampon Tris-HCl 50 mM pH 6,8 suivi d'une centrifugation de 10 min à 16 000 g et à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 150 μ L de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 ; SDS 1 % [v/v]) à l'aide d'un potter. Après centrifugation à 16 000 g pendant 5 min à 4°C, les protéines membranaires sont présentes dans le surnageant.

C. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

1. Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes (Chua, 1980)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, après dénaturation par le sodium dodécyl sulfate (SDS) et la chaleur. Les échantillons sont dilués avec du tampon de dépôt : Tris-HCl 50 mM (pH 6,8) ; glycérol 10 % [v/v] ; SDS 1 % [v/v] ; bleu de bromophénol 0,01 % [v/v] et DTT 25 mM. Les échantillons sont ensuite portés à ébullition pendant 2,5 min pour achever la solubilisation et la dénaturation des protéines. Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de concentration contenant 5 % [v/v] d'acrylamide, et d'un gel de séparation contenant 10 % [v/v] ou 12 % [v/v] d'acrylamide. L'électrophorèse est conduite à voltage constant (150 V), dans du tampon de migration de composition suivante : Tris 25 mM ; glycine 0,192 M (pH 8,3) ; SDS 0,1 % [v/v]. La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol atteint le bas du gel.

2. Coloration d'un gel au bleu de Coomassie

Pour un gel analytique, le gel est coloré par une incubation de 30 min dans une solution de colorant contenant de l'acide acétique 10 % [v/v], de l'isopropanol 25 % [v/v] et du bleu de Coomassie 2,5 g/L (Coomassie brilliant-blue R250, Sigma). Le gel est ensuite décoloré par plusieurs lavages successifs dans une solution d'éthanol 30 % [v/v].

D. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et immunomarquage

1. Technique de transfert

Cette technique permet de transférer les protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane, étape préalable pour la réalisation d'un immunomarquage.

Le gel est incubé pendant 10 min dans un tampon de transfert (Tampon Laemmli : Tris 25 mM, glycine 0,192 M (pH 8,3) ; SDS 0,1 % [v/v] contenant de l'éthanol 20 % [v/v]). Une membrane de nitrocellulose (BA 85, Schleicher & Schuell) est mouillée dans le tampon de transfert et déposée sur 2 feuilles de papier Whatman préalablement trempées dans le même tampon. Le gel est ensuite déposé sur la membrane et recouvert par 2 feuilles de papier Whatman imbibées de tampon. Afin d'éviter la présence de bulles d'air qui affectent le transfert, une pipette Pasteur est roulée sur l'ensemble. Le tout est placé entre deux claies et installé dans l'appareil de transfert rempli de tampon de transfert. Le transfert s'effectue à 100 V pendant 90 min à 4°C.

2. Immunomarquage et détection à l'aide de conjugué

a) Immunomarquage

Des anticorps dirigés contre une partie soluble de la protéine HMA1 (acides aminés 213–368) étaient déjà disponibles au laboratoire (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006) et ont été utilisés pour la détection de la protéine *in planta*. Après transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose est rincée dans de l'eau distillée puis saturée dans un tampon TBST (tampon TBS [NaCl 150 mM ; Tris-HCl 50 mM pH 7,5] + Triton X-100 0,05 % [v/v]) contenant du lait écrémé déshydraté 5 % [p/v] pendant 1 h, sous agitation. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps anti-HMA1 dilué au 1/1000^{ème} dans du tampon TBST pendant 2 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C. La membrane est rincée 3 fois 10 min dans du tampon TBST, puis incubée avec le deuxième anticorps (anticorps dirigé contre les immunoglobulines G de lapin, couplé à la peroxydase (Sigma, dilution 1/10 000^{ème}) pendant 1 h à température ambiante. La membrane est rincée 3 fois 5 min dans du tampon TBST puis deux fois 5 min dans du tampon TBS avant révélation par mesure de la chimiluminescence.

b) Détection avec le conjugué Strep-tactin HRP

Le conjugué *Strep*-tactin HRP (Horse Radish Peroxidase) est utilisé pour la détection des protéines recombinantes produites chez *Lactococcus* avec une étiquette *Strep*-tag II en C-terminal. Après transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose est rincée rapidement dans de l'eau distillée, puis 3 fois 5 min à température ambiante dans un tampon TBST, puis 2 fois 5 min dans du tampon TBS. La membrane est ensuite saturée dans un tampon TBST contenant de la SAB 3 % [p/v] pendant 1 h, sous agitation. La membrane est rincée 3 fois 5 min dans du tampon TBST. La membrane est ensuite incubée avec le conjugué *Strep*-tactin

HRP dilué au 1/10 000^{ème} (*Strep*-Tactin HRP, IBA) dans du tampon TBST, 1 h à température ambiante. La membrane est rincée 3 fois 5 min dans du tampon TBST puis 2 fois 5 min dans du tampon TBS avant révélation par mesure de la chimiluminescence.

c) Révélation par mesure de la chimiluminescence

L'activité de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire ou au conjugué est révélée dans un milieu alcalin (Tris-HCl 100 mM pH 8) auquel sont ajoutés extemporanément du luminol (3-aminophalhydrazine) 12,5 mM et de l'acide P-coumarique 0,2 mM, en présence d'une goutte d'eau oxygénée. En milieu alcalin, la peroxydase catalyse l'oxydation du luminol. Le luminol oxydé est dans un état excité et revient à son état fondamental en émettant de la lumière bleue (chimiluminescence). L'acide P-coumarique, composé phénolique, joue le rôle de catalyseur et améliore l'émission de lumière d'un facteur 100 (Durrant, 1990). La membrane de nitrocellulose est incubée 1 min avec la solution de révélation, puis est exposée contre un film d'autoradiographie sensible à la lumière bleue (Hyperfilm ECL, Amersham) à température ambiante. Après différents temps d'exposition (quelques secs à 30 min), le film est développé.

III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

A. Extraction d'ADN génomique de plante

Une jeune feuille est prélevée (environ 40 mg) et congelée dans de l'azote liquide. Le matériel végétal est broyé dans 300 µL de tampon Edwards (Tris-HCl 200 mM pH 7,5 ; NaCl 250 mM ; EDTA 25 mM ; SDS 0,5 % [v/v]). La suspension est mélangée à l'aide d'un vortex puis centrifugée à 15 000 g pendant 5 min. Une aliquote (200 µL) du surnageant contenant l'ADN génomique est prélevée. Après ajout d'un volume d'isopropanol pur (soit 200 µL) et homogénéisation du mélange, l'ensemble est incubé deux min à température ambiante, puis l'ADN génomique est précipité par une centrifugation de 5 min à 15 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'air libre. Le culot sec est enfin repris dans 100 µL d'H₂O pure et l'ADN est conservé à -20°C.

B. Synthèse d'oligonucléotides

Des oligonucléotides de synthèse ont été utilisés comme amorces lors des amplifications d'ADNc par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La synthèse des oligonucléotides a été réalisée par la société Sigma.

C. Amplification *in vitro* de fragments d'ADN

Afin d'amplifier les fragments d'ADN clonés dans les différents plasmides utilisés ou issus de banques d'ADNc, nous avons utilisé la technique d'amplification par PCR.

L'ADN matrice (quelques ng) est dilué dans 50 µL de milieu de PCR (Tris-HCl 10 mM pH 8,3 ; KCl 50 mM ; MgCl₂ 1,5 mM, DTT 1 mM ; Tween-20 0,05 % [v/v] ; 50 µM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP) ; 100 pmoles de chaque amorce spécifique, 0,25 unité d'ADN polymérase Phusion™ High-Fidelity (BioLabs). L'amplification est arrêtée après 20 à 25 cycles pour les clonages, ou après 45 cycles pour l'amplification à partir d'une banque d'ADNc.

Chaque cycle comprend :

- 10 sec de dénaturation à 98°C (30 sec à 94°C avec la *Taq* polymérase Titanium).
- 30 sec d'hybridation de 50 à 65°C selon le T_m des oligonucléotides.
- 1 min d'élongation par kilobase d'ADN à amplifier à 72°C.

La réaction se termine par un dernier cycle plus long avec 5 min à 72°C. L'efficacité de la réaction d'amplification est testée par analyse de 10 µL du mélange réactionnel par électrophorèse sur gel d'agarose.

D. Technique de séquençage de l'ADN

Les séquences ont été réalisées par la société Cogenics. L'analyse des séquences est réalisée à l'aide de banques de données et de différents programmes accessibles sur Internet (Expasy tools, BLAST, *Arabidopsis thaliana* Data Base, ...).

E. Préparation d'ADN de plasmides

Les extractions et purification d'ADN de plasmides sont effectuées grâce au kit "NucleoSpin Plasmid" (Macherey Nagel) selon les recommandations du fabricant.

F. Digestion d'ADN par des endonucléases

L'ADN à digérer (quelques centaines de ng) est mélangé à 20 U d'enzymes de restriction d'intérêt (New England Biolabs) placées dans un tampon compatible avec leur activité. La digestion se fait à 37°C pendant 2 à 12 h. Le produit de digestion est ensuite analysé sur gel d'agarose.

G. Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose

L'extraction et la purification d'un fragment d'ADN d'intérêt sont effectuées en utilisant le kit "NucleoSpin extract II" (Macherey Nagel) selon les recommandations du fabricant.

H. Préparation et transformation des bactéries compétentes

Deux méthodes de transformation ont été utilisées, une méthode chimique utilisant un traitement au CaCl₂, et une méthode physique, l'électroporation permettant d'obtenir de meilleurs rendements de transformation.

1. Méthode utilisant le traitement au CaCl₂ / choc thermique

Les bactéries compétentes sont préparées par un traitement au CaCl₂ (Maniatis *et al.*, 1982). Les bactéries (DH5 α , top10) sont cultivées dans 12 mL de milieu LB (10 g de tryptone ; 5 g d'extrait de levure ; 5 g de NaCl pour 1 L de milieu) jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,5. Après une incubation de 10 min dans la glace, les bactéries sont centrifugées pendant 5 min à 3 000 g et remises en suspension dans 2 mL de CaCl₂ 100 mM froid. Après une nouvelle centrifugation de 5 min à 3 000 g, le culot de bactéries est repris dans 400 μ L de CaCl₂ 100 mM froid.

Les plasmides (environ 10 ng) sont mélangés à 200 μ L de bactéries compétentes pendant 40 min dans la glace. Un choc thermique de 1,5 min à 42°C permet la transformation des bactéries par les plasmides. La suspension bactérienne est alors incubée pendant 1 h à 37°C dans 0,5 mL de milieu LB, puis étalée sur boîte de Pétri contenant du milieu LB et l'antibiotique adapté. Dans ces conditions, seules les bactéries ayant incorporé un plasmide se multiplient.

2. Technique d'électroporation

Les bactéries (souches DH5 α et Top10) sont cultivées dans 500 mL de milieu LB jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,5. Après une incubation de 15 min dans la glace, elles sont concentrées par centrifugation à 4 000 g pendant 5 min à 4°C. Les bactéries sont lavées deux fois dans de l'eau stérile glacée dans un volume de 500 mL puis de 250 mL. Les bactéries sont ensuite mises en suspension dans 10 mL de glycérol 10 % [v/v] froid, centrifugées 15 min à 4 000 g et reprises dans 1,5 mL de glycérol 10 % [v/v] froid. Les bactéries sont ensuite congelées dans l'azote liquide par aliquotes de 50 μ L et stockées à -80°C.

Les plasmides (1 à 3 ng) sont mélangés à 50 μ L de bactéries électrocompétentes pendant 1 à 2 min dans la glace. La suspension est ensuite transférée dans une cuve d'électroporation (0,2 cm entre les deux électrodes, Bio-Rad). Un choc électrique (0,8 kV) permet l'introduction du plasmide dans la bactérie. La suspension bactérienne est alors incubée 1 h à 37°C dans 0,5 mL de milieu LB, puis étalée sur boîte de Pétri contenant du milieu LB et l'antibiotique adapté. Dans ces conditions, seules les bactéries ayant incorporé un plasmide se multiplient.

I. Mutagenèse dirigée

Les mutagenèses dirigées sont réalisées en suivant les instructions du fabricant du kit "QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene). Cette technique permet de muter spécifiquement un ou plusieurs nucléotides dans une séquence d'ADN contenue dans un plasmide (figure 18).

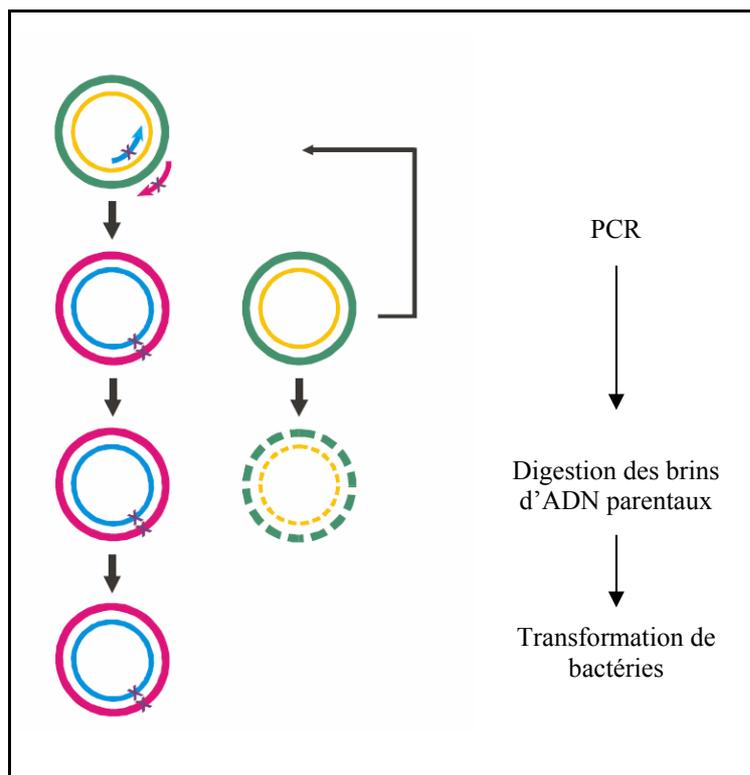


Figure 18 : Principe de la mutagenèse dirigée.

La réaction est réalisée à partir d'un vecteur double brin contenant l'ADNc d'intérêt. Les amorces nucléotidiques contiennent toutes les 2 la mutation à introduire et toutes les deux complémentaires aux brins opposés. L'extension des amorces avec la polymérase Pfu génère un plasmide muté contenant des "cassures". L'ADN parental est ensuite éliminé par digestion par *DpnI*, enzyme dégradant les fragments d'ADN méthylés (générés par des bactéries *dam*⁺). L'ADN restant, contenant la mutation, est utilisé pour transformer des bactéries ayant la capacité de réparer l'ADN (afin de refermer le plasmide).

Au cours de ce travail, la mutagenèse dirigée a été utilisée pour produire des mutants ponctuels de HMA1 et de PAA1 au niveau de leur site de phosphorylation (DKTGT) en mutant l'aspartate en alanine rendant ainsi les protéines inactives.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Mutation effectuée	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')
HMA1 D453A	Sens	GCCATACTATTGCTTTTGC C CAAAACTGG CAC CTTAACAACCG
	Antisens	CGGTTGTTAAGGT GCC AGTTT GG CAAAAGCAATAGTATGGC
PAA1 D597A	Sens	CTGTTGTCTTCG C CAAAACTGG TAC CCTGACGAAGGGAC
	Antisens	GTCCCTTCGTCAG GGT ACCAGTTT GG CGAAGACAACAG

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'obtention des mutants HMA1 D453A et PAA1 D597A.

Les nucléotides modifiés permettant de transformer l'aspartate en alanine sont indiqués en gras. Les nucléotides indiqués en italiques ont été modifiés afin de supprimer (dans le cas de HMA1) ou d'introduire (dans le cas de PAA1) un site de restriction *KpnI* (surligné en gris) pour validation ultérieure de la présence de la mutation.

J. Etude de l'expression de gènes par RT-PCR

La technique de transcription inverse couplée à une PCR permet de visualiser des différences de niveau de transcrits entre deux échantillons.

Les ARN totaux (ARN_{tot}) sont extraits selon le protocole du kit "RNeasy[®] Plant Mini kit" (Quiagen) à partir d'environ 80 mg de feuilles de plantes d'*Arabidopsis* sauvages ou mutantes

cultivées *in vitro*. Après vérification de l'intégrité des ARN_{tot} par électrophorèse sur gel d'agarose et dosage de ces ARN_{tot} à 230 nm, 2 µg d'ARN sont utilisés pour obtenir les ADNc correspondants par transcription inverse à l'aide du kit "Reverse IT 1st strand synthesis kit" (ABgene). Les PCR sont ensuite effectuées sur les ADNc dilués au 1/5^{ème} ou 1/10^{ème} avec les couples d'oligonucléotides permettant l'amplification des ADNc d'intérêts. L'expression du gène de l'*actine 2* est utilisée comme contrôle de charge (expression non contrôlée dans les conditions expérimentales analysées).

Les réactions de PCR (voir paragraphe III C) sont réalisées avec la polymérase TITANIUM™*Taq* DNA Polymerase (Clontech), à 0,16 U par réaction de 50 µL. Le nombre de cycles réalisés (de 23 à 35 cycles) varie en fonction de l'ADNc analysé.

Au cours de la phase exponentielle d'amplification de l'ADN, 5 µL de la réaction sont prélevés aux cycles n (limite de détection de l'ADN amplifié), n+2 et n+4. Ces produits de réactions sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % [p/v]. La liste des amorces utilisées est décrite dans le tableau 6.

ADNc amplifié	n° AGI	Amorce sens 5'→3'	Amorce antisens 5'→3'	Taille du fragment (pb)
<i>Actine 2</i>	At3g18780	GGCCGATGGTGAGGATATTCA	TCGATGGACCTGACTCATCGTACTCACTC	1100
<i>PAA1</i>	At4g33520	ACGGGTTATAGCAGGAG	GTCGTTTCGGTTCGAG	442
<i>PAA2</i>	At5g21930	AAAGGTGGTTTGCCG	GGACACTCCCATCGAC	457
<i>HMA1</i>	At4G37270	GATCATCACAACCACCATCATC	CGCTTTGTATGACAAATCAG	550
<i>FSD1</i>	At4g25100	ACCGTGTCTCGAATCAA	CCCAATTAGAGGAACTAGGTG	505
<i>FSD2</i>	At5g51100	CCGGTGTATCACAGC	CCATGTCCAACCCGAA	404
<i>FSD3</i>	At5g23310	AGTGCGAAGTAGCTCT	AGGTTGCATCGACTCC	474
<i>CSD1</i>	At1g08830	TCCGTCGAAAGCGTTG	CGTAGCAGCTTTAGCC	466
<i>CSD2</i>	At2g28190	TCCGTCGAAAGCGTTG	GCCTCTGACTTAGAGCG	502
<i>CCS</i>	At1g12520	CTCCATCAGGAGGATCG	CAATGGCTCTGTGCCAG	474
<i>Homologue 1 CCH</i>	At1g66240	CAAGCCTGTGCGGTGGTTG	CAGATAATGCCCCAGTGC	422
<i>Homologue 2 CCH</i>	At5g17450	CGCTAATGCCAAAACCAAGC	GGTTGGCTCACATGATGG	413
<i>PETE2</i>	At1g76100	CGCAATTACATCAGCTACCG	GAAACCGTAAGAGCCTGG	457
<i>PETE1</i>	At1g20340	GGCCTCAGTAACCTCAG	CGAGATCTTGCCACGTC	370
<i>CutA</i>	At2G33740	GGCTTCGTCTCACCCT	GCTCCTCTGAATCACTCTG	520
<i>PCaP1</i>	At4G20260	CACCATGGGTACTGG	GAACCACCAAAGCCT	672

Tableau 6 : Amorces utilisées pour l'étude de l'expression de gènes d'intérêt par RT-PCR.

IV. EXPRESSION STABLE DE PROTEINES CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie naturellement trouvée dans le sol qui est responsable de la galle du collet, maladie provoquant des tumeurs au niveau des racines des plantes infectées. Ces bactéries possèdent naturellement la capacité d'infecter des plantes. Elles peuvent transférer un fragment d'ADN étranger qui s'intègre dans le génome nucléaire des plantes transformées.

A. Construction des vecteurs d'expression

Le plasmide pFP101 (fourni par François Parcy, LPCV) est utilisé au laboratoire pour l'expression stable d'une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (35S). Ce vecteur d'expression possède deux marqueurs de sélection : un gène de résistance à la spectinomycine sous le contrôle d'un promoteur bactérien pour la sélection chez *E. coli*, et l'ADNc codant la protéine fluorescente GFP pour la sélection *in planta*. Cet ADNc est placé sous le contrôle du promoteur du gène *AT2S3* qui code pour une protéine de réserve présente uniquement dans les graines.

Les ADNcs codants pour deux formes de HMA1 ont été intégrés dans ce vecteur d'expression : (a) HMA1 Δ 67-89, délétion du domaine riche en histidine ; (b) HMA1. Ces ADNcs intégrés dans le vecteur pBluescript étaient déjà disponibles au laboratoire.

Les ADNcs mutés ont été extraits des vecteurs d'origine par une digestion *Bgl*III-*Sal*I et intégrés dans le plasmide pFP101 digéré par *Bam*HI-*Sal*I. Les enzymes *Bam*HI et *Bgl*III génèrent des extrémités cohésives compatibles et la ligation était orientée : *Bam*HI/*Bgl*III à une extrémité et *Sal*I à l'autre extrémité.

L'amplification des plasmides pFP101-HMA1 Δ 67-89, pFP101-HMA1 a été réalisée dans les bactéries DH5 α . La sélection des bactéries DH5 α transformées par les plasmides recombinants est obtenue par étalement des bactéries sur milieu LB gélosé (LB 20 g/L ; Agar 0.2 % [p/v]) contenant de la spectinomycine à 50 μ g/mL. L'ADN plasmidique issu de colonies bactériennes est extrait et des digestions contrôles avec différentes enzymes de restriction permettent de valider la présence des inserts dans le vecteur pFP101.

B. Préparation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Une culture d'agrobactéries C58 (rif^R et carb^R) est incubée à 28°C dans un milieu LB contenant de la rifampicine (50 μ g/mL) et de la carbénicilline (100 μ g/mL). La densité optique de la culture est mesurée régulièrement à une longueur d'onde de 600 nm jusqu'à obtenir une absorbance voisine de 0,6. La croissance des agrobactéries est stoppée par incubation dans la glace pendant 1 h. Une centrifugation de 15 min à 4 000 g et à 4°C est effectuée (centrifugeuse Sorvall RC 5C, rotor GS3). Trois lavages des agrobactéries sont effectués avec de l'eau distillée stérile froide (resuspension des agrobactéries et centrifugation à 4 000 g dans les mêmes conditions que précédemment, à 3 reprises). A l'issue de la dernière

centrifugation, le culot d'agrobactéries est repris dans du glycérol 10 % [v/v] froid. Ces agrobactéries, dites compétentes, sont ensuite réparties dans des microtubes (50 µL/tube), congelées dans de l'azote liquide et stockées à - 80°C.

C. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Pour la transformation des agrobactéries, 50 µL de cellules compétentes sont incubées en présence de 700 ng de plasmide recombinant. Le mélange est homogénéisé à 4°C. La transformation se fait par électroporation, induite par un choc électrique de 2,5 kV. Immédiatement après ce choc électrique, 1 mL de milieu LB est ajouté au mélange. Après 1 h d'incubation à 28°C sous agitation (200 RPM), la suspension est étalée sur boîte de milieu LB agar contenant de la carbénicilline (100 µg/mL), de la spectinomycine (50 µg/mL) et de la rifampicine (50 µg/mL) et incubée à 28°C pendant 3 jours. L'ajout de la spectinomycine permet la sélection positive des agrobactéries recombinantes ayant intégré le plasmide pFP101 (Spec^R).

D. Transformation des plantes par trempage d'inflorescences

Les souches d'*A. tumefaciens* précédemment transformées avec le plasmide d'intérêt sont utilisées pour la suite des expériences. Une préculture contenant plusieurs colonies d'agrobactéries transformées est réalisée dans 10 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL de carbénicilline, 50 µg/mL de spectinomycine et 50 µg/mL de rifampicine. Les bactéries sont mises en culture pendant 8 h à 28°C sous agitation.

Un ensemencement de 500 mL de milieu LB est réalisé à partir de 500 µL cette préculture. La culture est maintenue sous agitation sur la nuit à 28°C. Un échantillon de cette suspension bactérienne (1 mL) est dosé au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. Les agrobactéries sont alors concentrées par centrifugation 20 min à 5 500 g et à 4°C et remises en suspension dans du saccharose 5 % [p/v] afin d'obtenir une suspension ayant une absorbance voisine de 0,8 à 660 nm. Du surfactant (Silwett L-77, Lehle Seeds) est ensuite ajouté à une concentration finale de 0,02 % [v/v] afin de favoriser l'infection des plantes par les agrobactéries.

La transformation d'*A. thaliana* se fait par trempage d'inflorescences (Clough & Bent, 1998) avec la suspension d'*A. tumefaciens* contenant le plasmide d'intérêt. Les fleurs sont trempées pendant 5 sec dans un bécher contenant le milieu d'inoculation. Les plantes sont placées 3 jours en lumière faible et à l'intérieur d'un sac plastique afin de limiter la déshydratation. Elles seront ensuite replacées en conditions de culture standard. Une deuxième transformation, identique à la première, est effectuée la semaine suivante afin d'augmenter le rendement de transformation. Les plantes poussent pendant 3 à 5 semaines jusqu'à ce que les graines soient mûres. Les graines sont récoltées et conservées dans un grainier. Le criblage des graines transformées est réalisé à l'aide d'une loupe à épifluorescence (Olympus SZX12), qui permet de sélectionner les graines fluorescentes (exprimant la protéine GFP). Pour chaque

lignée transformée, seules les plantes qui présentaient une ségrégation 3:1 pour l'expression de la GFP ont été sélectionnées.

E. Vérification de la présence et de l'intégrité du gène d'intérêt dans les agrobactéries transformées

Cette étape est nécessaire afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de recombinaison dans l'ADNc d'intérêt après son transfert dans les agrobactéries.

A l'issue des cultures liquides de 500 mL d'agrobactéries utilisées pour réaliser l'inoculation des plantes (voir ci-dessus), des échantillons de 6 mL sont prélevés et l'ADN plasmidique est extrait de ces bactéries. Le plasmide, étant présent en faible quantité dans la souche d'agrobactéries, il est nécessaire de l'amplifier en transformant des bactéries de type *E. coli* (Dh5 α). La présence et l'intégrité de l'ADNc d'intérêt sont vérifiées par digestion enzymatique du plasmide amplifié chez *E. coli*.

F. Sélection des surexprimeurs

Toutes les plantes issues des graines transformées ne présentent pas le même niveau d'expression de la protéine d'intérêt. Il est donc nécessaire de quantifier ce niveau d'expression par immunodétection. Pour cela, quelques feuilles issues de chaque transformant (entre 40 à 100 mg, soit environ 3 feuilles) sont prélevées, pesées et congelées dans l'azote liquide puis stockées à -80°C. Les plantes qui expriment fortement la protéine d'intérêt (surexprimeurs) sont sélectionnées après extraction des protéines membranaires totales (voir paragraphe II, B) et immunodétection de la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps spécifique. Généralement, une dizaine de plantes sont sélectionnées et analysées pour une construction donnée.

V. TECHNIQUES SPECIFIQUES AU SYSTEME D'EXPRESSION PROCARYOTE LACTOCOCCUS LACTIS

Lactococcus lactis est une bactérie non pathogène, Gram positive, aérobie facultative. Elle est utilisée dans la fermentation des produits laitiers. Elle est utilisée dans l'industrie pour la production de molécules à forte valeur ajoutée. Des travaux récents ont montré que cette bactérie est adaptée à la production de protéines membranaires (Kunji *et al.*, 2003). Nous avons utilisé le système d'expression NICE (NIsin Controlled gene Expression, NIZO) qui permet de cloner les ADNc d'intérêts sous le contrôle du promoteur NisA inductible par la nisine (peptide anti-bactérien). Ce système est décrit dans la figure 19.

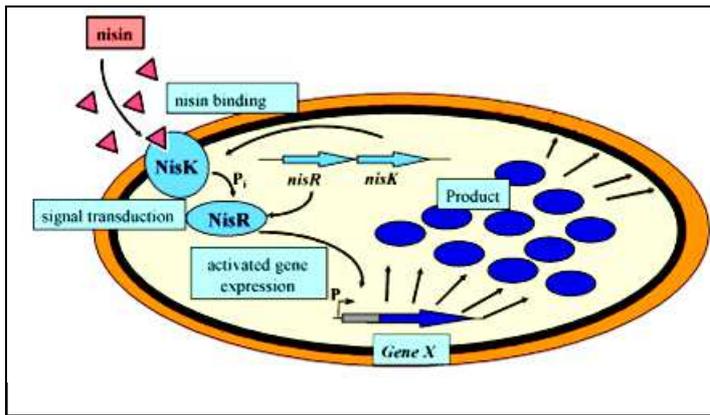


Figure 19 : Représentation du système NICE.

Lorsque la nisine se lie à son récepteur, NisK, ce dernier s'autophosphoryle et phosphoryle NisR. NisR, activé, se lie à son promoteur Pnisa et active la transcription du gène placé en aval. (Figure adaptée de Mierau et *al.*, 2005).

A. Souches, plasmides et milieux de culture spécifiques au système *Lactococcus*

Les souches bactériennes appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. La souche NZ9700 est utilisée pour la production de nisine. La souche NZ9000 contient les gènes nisRK. C'est la souche qui est utilisée pour la construction du vecteur d'expression et pour l'expression des protéines recombinantes (en présence de nisine).

Le vecteur d'expression est le pNZ8148, dont les caractéristiques sont décrites dans la figure 20. Ce vecteur ne peut pas être propagé dans les souches *E coli* à cause de problèmes d'instabilité. Son amplification se fait donc uniquement chez *Lactococcus*. D'autre part, ce vecteur n'a pas pu être converti en vecteur de destination Gateway car les souches de *Lactococcus* sont incapables de propager les vecteurs Gateway.

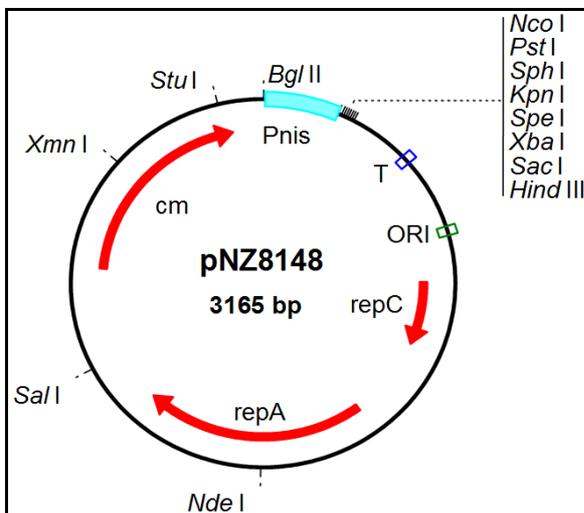


Figure 20. Carte du vecteur pNZ8148.

Ce vecteur contient une origine de réplication (ORI), le gène codant pour la résistance au chloramphénicol (cm), deux gènes codant pour des protéines de réplication (repA et repC), un promoteur inducible par la nisine (Pnis) et un terminateur de transcription (T). Le gène d'intérêt est inséré au niveau du site de multiclonaage entre le site *NcoI* et un autre site de restriction.

Toutes les cultures de *Lactococcus* sont réalisées dans des bouteilles Schott fermées, en anaérobie. Les milieux de culture utilisés pour *L. lactis* sont les suivants :

Nom du milieu	Composition
M17-G0,5%-Chl	M17 (Oxoid) 38 g/L ; glucose 0,5 % [p/v] ; chloramphénicol 10 µg/mL
M17-G1%-Chl	M17 38 g/L ; glucose 1 % [p/v] ; chloramphénicol 10 µg/mL
M17-G1%	M17 38 g/L ; glucose 1 % [p/v]
M17-A-G0,5%	M17-agar 38 g/L ; glucose 0,5 % [p/v]
M17-A-G0,5%-Chl	M17-agar 48 g/L ; agarose ; glucose 0,5 % [p/v] ; chloramphénicol 10 µg/mL

Tableau 7 : Composition des milieux de culture utilisés pour *L. lactis*.

B. Construction des vecteurs d'expression

Deux stratégies ont été utilisées pour le clonage des ADNc d'intérêt dans le vecteur d'expression pNZ8148 : soit un clonage classique utilisant des digestions avec des enzymes de restrictions, soit un clonage reposant sur le système Gateway® (Invitrogen) (approche développée au laboratoire par Annie Frelet-Barrand). Pour chaque construction, la séquence codant la protéine est fusionnée en 3' à une séquence codant une étiquette *Strep*-tag II. Les protéines HMA1 et PAA1 ont été exprimées sous forme mature, c'est à dire sans leur séquence de transit prédite (60 premiers acides aminés pour HMA1, et 88 premiers acides aminés pour PAA1).

1. Clonage direct dans le vecteur d'expression pNZ8148

Les ADNc d'intérêts sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces polynucléotidiques sens et antisens contenant respectivement les sites de restrictions *NcoI* et *HindIII* (voir tableau 8). Ces amplifications ont été réalisées à partir de plasmides pENTR-D-Topo contenant les ADNcs codant HMA1, HMA3 et HMA4 (voir paragraphe suivant) ou à partir du plasmide pda 01438 contenant l'ADNc codant PAA1 (obtenu au Riken Genomic Sciences Center, Japon).

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')
Amorce sens 1	<i>CATGCC</i> <i>ATGG</i> + 18 nucléotides suivants de l'ADNc d'intérêt
Amorce sens 2	<i>CATGCCATGGCCATG</i> + 18 nucléotides suivant de l'ADNc d'intérêt
Amorce antisens	<i>CCCAAGCTT</i> <i>CTACTTT</i> <i>CGAACTGCGGGTGGCTCCA</i> + 15 derniers nucléotides de l'ADNc d'intérêt

Tableau 8 : Amorces polynucléotidiques utilisées. Deux types d'amorces sens ont été dessinés selon le cadre de lecture de la séquence de l'ADNc d'intérêt.

Ces amorces contiennent un site de restriction *NcoI* (en gras), 4 nucléotides placés en amont de ce site de restriction (CATG). Si la séquence du gène contient un nucléotide G après le codon start, l'amorce sens 1 a été utilisée. Sinon, 1 guanine et 2 cytosines sont ajoutées afin d'apporter le site de restriction *NcoI*. L'amorce antisens contient un site de restriction *HindIII* précédé de trois nucléotides (CCC),-un codon STOP (italique et souligné) et la séquence codant pour le *Strep*-tag II (gras et italique) suivie des 15 derniers nucléotides du gène d'intérêt.

Après amplification par PCR, le fragment d'ADN amplifié est digéré par les enzymes de restriction *NcoI* et *HindIII* (New England Biolabs) puis inséré dans le vecteur pNZ8148 préalablement digéré par les mêmes enzymes *NcoI* et *HindIII*. Le produit de ligation doit être purifié à l'aide du kit "NucleoSpin extract II" (Macherey Nagel) et repris dans de l'H₂O avant transformation dans *Lactococcus*.

2. Clonage utilisant la technologie Gateway[®]

Gateway est un système permettant un clonage rapide des ADNc sans les sous clonages classiques et dans autant de systèmes d'expression choisis.

a) Clonage dans le vecteur d'entrée Gateway pENTRTM/D-TOPO[®]

La première étape consiste à intégrer l'ADNc d'intérêt dans un vecteur d'entrée, le vecteur pENTRTM/D-TOPO[®] (ou pDONR) Cette intégration se fait par clonage directionnel avec la topoisomérase I. Pour cela, l'ADNc d'intérêt est amplifié par PCR à l'aide d'un couple d'oligonucléotides décrit dans le tableau 9.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')
Amorce sens	CACCATG + 18 premiers nucléotides du gène d'intérêt
Amorce antisens	<u>CTACTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA</u> + 15 derniers nucléotides du gène d'intérêt

Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés pour le clonage dans le vecteur d'entrée Gateway pENTRTM/D-TOPO[®].

L'amorce sens contient une séquence CACC permettant le clonage directionnel avec la topoisomérase I dans pENTRTM/D-TOPO[®], un codon START suivi des 18 premiers nucléotides du gène d'intérêt. L'amorce antisens contient un codon STOP (souligné) et la séquence codant pour le *Strep*-tag II (gras et italique) suivie des 15 derniers nucléotides du gène d'intérêt.

Les fragments PCR sont ensuite insérés dans le vecteur d'entrée pENTRTM/D-TOPO[®] selon les recommandations du fabricant (Invitrogen). Cette étape permet d'ajouter de part et d'autre de l'ADNc d'intérêt les séquences *attL*. Les plasmides d'entrée contenant les ADNc codant HMA3 et HMA4 ont été fournis par Pierre Richaud (LEMS, iBEB, CEA Cadarache).

b) Clonage dans le vecteur navette, pBluescript-RfA

Les souches de *Lactococcus lactis* ne permettant pas les réactions de recombinaison nécessaires au système Gateway, les ADNcs présents dans les vecteurs d'entrée (pENTR-D-Topo et pDONR) ont été transférés dans un vecteur navette par une réaction LR (en collaboration avec Florent Bernaudat, IBS). Le vecteur intermédiaire est pBluescript contenant la cassette Gateway RfA conservant le cadre de lecture. La réaction LR est une recombinaison homologue qui se fait entre les sites *attL* du vecteur d'entrée et les sites *attR* du pBluescript-RfA. Ces sites deviennent des sites *attB* après recombinaison.

Le vecteur navette contient donc le gène d'intérêt bordé par deux sites *EcoRV*.

c) Clonage dans le vecteur d'expression pNZ8148

L'intégration dans le vecteur d'expression pNZ8148 se fait ensuite par un clonage classique avec digestion par des enzymes de restriction et ligation. Les cassettes contenant les ADNcs sont excisées par une digestion *EcoRV* et intégrées dans le vecteur pNZ8148 préalablement ouvert par l'enzyme *NcoI* et traité par la Klenow afin de générer des bouts francs (voir figure 21). Le produit de ligation est purifié avec le kit "NucleoSpin extract II" (Macherey Nagel) et élué dans de l'eau avant transformation des bactéries *L. Lactis*.

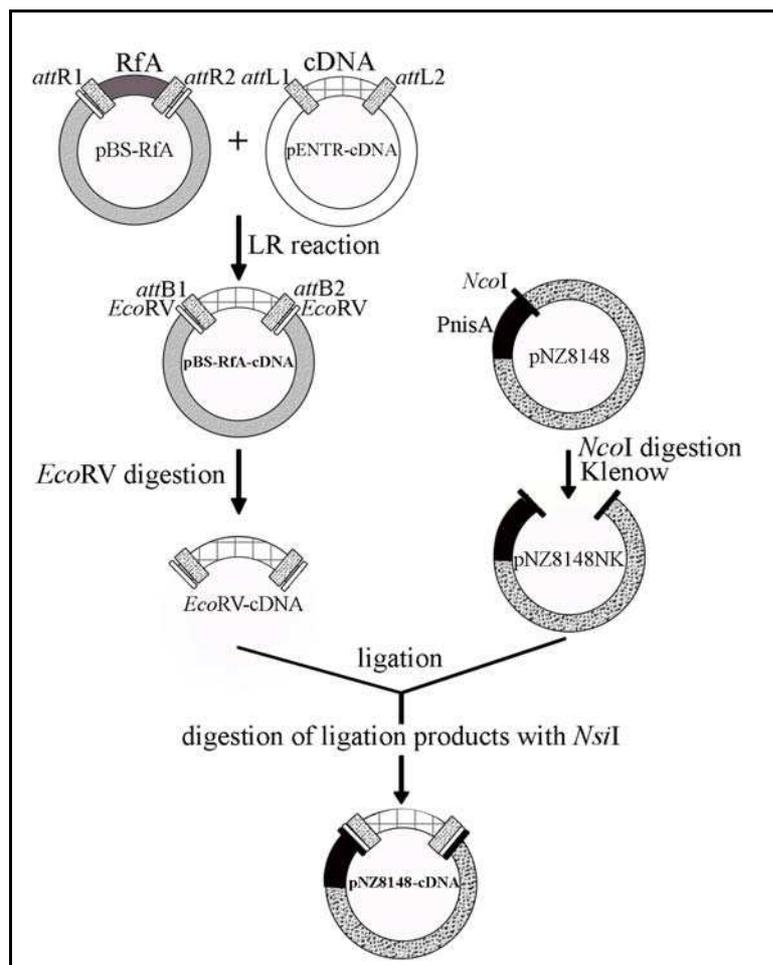


Figure 21 : Stratégie de clonage dans le vecteur pNZ8158 compatible avec la technologie Gateway.

Image tirée de Frelet-Barrand / Boutigny *et al.*, manuscrit soumis.

C. Transformation des bactéries *Lactococcus*

1. Préparation des bactéries *Lactococcus* électrocompétentes

5 mL de milieu G-SGM17B (M17 38 g/L ; saccharose 0,5 M ; glycine 0,33 M ; glucose 0,5 % [p/v]) est inoculé avec des bactéries issues d'un stock glycérol. Après 24 h d'incubation à 30°C, la suspension bactérienne est utilisée pour inoculer 50 mL de milieu G-SGM17B. La culture est incubée sur la nuit à 30°C. Le lendemain, 400 mL de milieu G-SGM17B sont inoculés avec la préculture de 50 mL. Lorsque la DO à 600 nm atteint 0,2-0,3, la culture est centrifugée pendant 20 min à 5 000 g, à 4°C. Le surnageant est éliminé et les bactéries sont lavées avec 400 mL de milieu A (saccharose 0,5 M ; glycérol 10 % [p/v]). Les bactéries sont

alors concentrées par centrifugation pendant 20 min à 5 000 g, à 4°C et resuspendues dans 200 mL de milieu B (saccharose 0,5 M ; glycérol 10 % [p/v] ; EDTA 50 mM pH 8). Après 15 min d'incubation sur la glace, la suspension bactérienne est centrifugée 20 min à 5 000 g, à 4°C. Le culot bactérien est lavé avec 100 mL de milieu A. Après une nouvelle centrifugation de 20 min à 5 000 g, à 4°C, les bactéries sont reprises dans 4 mL de milieu A et aliquotées (40 µL). Les bactéries électrocompétentes sont congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C.

2. Transformation par électroporation

Les transformations des bactéries *Lactococcus* se font avec de l'ADN purifié et élué dans de l'eau. L'ADN plasmidique (1 µL) ou le produit de ligation (5 µL) sont ajoutés à 40 µL de bactéries électrocompétentes. Les bactéries sont placées sur la glace pendant une minute et sont ensuite transférées dans une cuvette d'électroporation (Eurogentec). Les bactéries sont transformées par électroporation (2000 V – 25 µF – 200 ohms. E.coli pulser, BIO-RAD). Les bactéries sont alors reprises dans 1 mL de milieu M17BG et incubées pendant 5 min sur glace. Les bactéries sont ensuite incubées pendant 3 h à 30°C et étalées sur des boîtes de pétri M17-A-G0,5%-Chl (1/10^e et 9/10^e du volume). La présence de chloramphénicol permet de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide pNZ8148. Les colonies apparaissent après un ou deux jours d'incubation à 30°C.

3. Préparation de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique est effectuée avec le kit "NucleoSpin Plasmid" (Macherey Nagel) avec quelques modifications. En effet, *Lactococcus lactis* étant une bactérie gram positive, elle possède une paroi de peptidoglycane qui doit préalablement être digérée à l'aide de lysozyme afin de permettre la lyse des bactéries. A partir d'une préculture effectuée sur la nuit, les bactéries sont concentrées par centrifugation puis remises en suspension dans 250 µL de tampon A1 contenant du lysozyme (Fluka) à 2,5 mg/mL. La suspension est incubée pendant 45 min à 37°C afin de permettre la digestion de la paroi de peptidoglycane par le lysozyme. Les étapes suivantes sont celles décrites dans le kit "NucleoSpin Plasmid" (tampon de lyse...), incluant le lavage optionnel (tampon AW) afin d'éliminer le lysozyme. L'ADN est élué dans 20 µL de tampon d'éluion.

La présence de l'insert dans le plasmide recombinant est validée par digestion enzymatique et par amplification PCR avec une amorce spécifique du vecteur et une amorce spécifique de l'insert.

D. Stock glycérol

Du milieu M17-G1%-Chl (25 mL) est inoculé avec les bactéries recombinantes d'intérêt. Après une nuit d'incubation à 30°C, avec agitation rotative (90 RPM), les bactéries sont concentrées par centrifugation à 4 350 g pendant 15 min à 4°C puis remises en suspension

dans 5 mL de milieu M17 contenant du glycérol 20% [p/v]. Les bactéries sont conservées à -80°C (aliquotes de 300 μL).

E. Induction de l'expression des protéines recombinantes chez *Lactococcus*

Les ADNc d'intérêt sont clonés dans le vecteur d'expression pNZ8148 et sont sous le contrôle d'un promoteur inductible par la nisine. Il est nécessaire dans un premier temps d'obtenir un stock de nisine, produit par la souche NZ9700.

1. Préparation de la nisine

Du milieu M17-G1% (10 mL) est inoculé avec un stock glycérol de la souche de *L. lactis* NZ 9700. La suspension est incubée pendant 6 h à 30°C , avec agitation rotative (90 RPM). Cette préculture est ensuite utilisée pour inoculer 500 mL de milieu M17-G1%. Après 24 h d'incubation à 30°C , avec agitation rotative (90 RPM), les bactéries sont concentrées par centrifugation à 6 300 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant contenant la nisine est prélevé et stocké à -80°C (aliquotes de 45 mL).

2. Expression de protéines

Du milieu M17-G1%-Chl (25 mL) est inoculé avec un stock glycérol contenant les bactéries recombinantes d'intérêt et incubés sur la nuit à 30°C , 90 RPM.

Le lendemain, cette préculture est utilisée pour inoculer 1 L de milieu M17-G1%-Chl. La solution bactérienne est incubée à 30°C , avec agitation rotative (90 RPM) jusqu'à ce que la DO à 600 nm atteigne 0,8. L'induction de l'expression de la protéine d'intérêt est réalisée par ajout de 5 mL de nisine.

Après 4 h d'expression à 30°C , avec agitation rotative (90 RPM), les bactéries sont récoltées par centrifugation à 5 000 g pendant 20 min à 4°C . Le culot de bactéries est remis en suspension dans du tampon Tris 50 mM pH 7,5, KCl 100 mM, pour obtenir un volume final de 37,5 mL. Du glycérol pur (2,5 mL), stérilisé par autoclave, est ensuite ajouté. Les bactéries sont conservées à -20°C . Lorsque la presse de French a été utilisée pour la préparation des membranes, le culot de bactéries a été congelé directement dans l'azote liquide puis conservé à -80°C .

F. Extraction des protéines membranaires de *L. lactis*

Les cellules de *Lactococcus* possèdent une paroi de peptidoglycane et ne peuvent donc pas être lysées par simple sonication. Il est donc nécessaire d'utiliser soit une presse de French soit un disrupteur, appareils qui permettent d'engendrer de fortes variations de pression et ainsi de casser les bactéries. La presse de French ne peut atteindre qu'une pression de 1,2 kbar et il est donc nécessaire d'effectuer plusieurs passages de la suspension bactérienne dans la presse afin de casser les *Lactococcus*. En revanche, le disrupteur peut monter en pression jusqu'à 2,7

kbars et permet donc de casser les *Lactococcus* en une seule étape avec un rendement bien meilleur.

1. Extraction des protéines membranaires après utilisation de la presse de French

Le culot de bactéries obtenu après expression des protéines d'intérêt est repris dans du tampon PBS (Na_2HPO_4 2 mM ; NaCl 137 mM ; KCl 2,5 mM ; pH 7,4) contenant 10 mg/mL de lysozyme pour obtenir un volume final de 40 mL. La digestion de la paroi de peptidoglycane est obtenue par incubation de la suspension bactérienne à 30°C pendant 30 min.

Les bactéries sont cassées par trois passages successifs dans une presse de French (French[®] Pressure Cell Press, SIM-AMINCO, Spectronic Instruments) avec une pression de 18 000 psi (1,15 kbar).

Les débris cellulaires sont séparés des protéines par une centrifugation de 12 min à 10 000 g à 4°C (rotor SS34, Sorvall). Le surnageant contenant les protéines membranaires et solubles est transféré dans des tubes d'ultracentrifugation (65 mL, Ti45, Beckman). Les protéines membranaires sont séparées des protéines solubles par une ultracentrifugation de 1 h à 150 000 g à 4°C (rotor Ti45, Beckmann). Le culot, contenant les protéines membranaires est repris dans 2 mL de tampon PBS-Glycérol 10 % [p/v].

Les protéines membranaires sont dosées par la méthode de dosage selon Bradford, puis conservées à -80°C. La présence de la protéine recombinante est analysée par électrophorèse SDS-PAGE et par immunodétection.

2. Extraction des protéines membranaires après utilisation du disrupteur

La suspension contenant les bactéries est décongelée et homogénéisée par une étape de sonication (2 min, Duty cycle = 40 %, output control = 5). Les cellules sont cassées par passage dans le disrupteur (disrupteur One shot, Constant Cell Disruption System) avec une pression de 35 000 psi (2,3 kbars). Le lysat est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 12 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubles et les protéines membranaires est transféré dans des tubes adaptés au rotor Ti45 (Beckmann).

Le culot contenant les débris cellulaires ainsi que les bactéries non cassées lors du premier passage dans le disrupteur est repris dans 12 mL de tampon Tris 50 mM pH 7,5 ; KCl 100 mM. Cette suspension est passée une nouvelle fois dans le disrupteur avec une pression de 35 000 psi (2,3 kbars). Ce second lysat est centrifugé à 10 000 g pendant 12 min à 4°C. Le surnageant obtenu est mélangé avec le premier surnageant obtenu.

Les protéines membranaires sont séparées des protéines solubles par une étape de centrifugation de 90 min à 150 000 g à 4°C (rotor Ti45, Beckman). Le culot, contenant les protéines membranaires est repris dans un tampon Tris 50 mM pH 7,5 ; KCl 100 mM ; glycérol 20 % [p/v] à l'aide d'un Potter. Le volume de tampon utilisé pour la solubilisation des protéines membranaires est adapté à la taille du culot.

Les protéines membranaires sont dosées, stockées et analysées comme décrit dans le paragraphe précédent.

G. Solubilisation et purification de protéines membranaires issues de *L. lactis*

1. Solubilisation des protéines membranaires en présence de détergent

La solubilisation des protéines membranaires et leur extraction de la membrane nécessitent l'utilisation de détergents. Les protéines sont solubilisées dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 ; NaCl 100 mM ; TCEP 100 μ M ; n-dodecyl β -D-maltoside (DDM) 1 % [p/v] ; dodecyl octaethylene glycol monoether (C₁₂E₈) 0,3 % [p/v]. Le volume utilisé pour la solubilisation est ajusté pour que la concentration finale de protéines membranaires soit de 4 mg/mL. La solubilisation se déroule pendant 3 h à 4°C sous agitation (roue). La solution est homogénéisée par pipetage toutes les heures. Les protéines solubilisées sont séparées des protéines non solubilisées par une étape de centrifugation à 15 000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant contient les protéines solubilisées.

2. Purification par affinité sur résine *Strep*-Tactin

Les protéines qui ont été exprimées dans le système *Lactococcus* possèdent une étiquette *Strep*-tag II fusionnée en C-terminaest utilisée pour purifier ces protéines recombinantes sur une matrice d'affinité (*Strep*-Tactin Sepharose[®], IBA).

Les purifications ont été réalisées à partir de 16 mg de protéines membranaires totales, solubilisées dans les conditions décrites ci-dessus. La matrice d'affinité (800 μ L de matrice à 50 %) est préalablement équilibrée dans 8 mL de tampon Tris 50-HCl mM pH 8 ; NaCl 100 mM ; TCEP 100 μ M ; DDM 0,1 % [p/v].

Les protéines solubilisées sont diluées 10 fois dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 ; NaCl 100 mM ; TCEP 100 μ M ; DDM 0,01 % [p/v] et déposées sur la colonne contenant la matrice d'affinité. L'interaction entre la protéine cible et la matrice d'affinité se fait sur la nuit à 4°C en faisant circuler en circuit fermé l'échantillon protéique dans la colonne grâce à une pompe péristaltique. Le lendemain, les protéines non retenues sur la colonne sont conservées pour analyse. La matrice est rincée avec 8 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 ; NaCl 100 mM ; TCEP 100 μ M ; DDM 0,1 % [p/v]. Les protéines fixées sur la matrice d'affinité sont éluées par compétition après 6 ajouts successifs de 400 μ L de tampon Tris 50-HCl mM pH 8 ; NaCl 100 mM ; TCEP 100 μ M ; DDM 0,1 % [p/v] ; desthiobiotine (compétiteur) 5 mM. Du saccharose 300 mM est ajouté aux fractions d'élutions pour la conservation des échantillons qui sont ensuite congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

VI. TECHNIQUES D'ETUDE DES ATPASES DE TYPE P

A. Mesure de l'activité ATPasique

Les ATPases de type P hydrolysent de l'ATP au cours de leur cycle catalytique. Cette hydrolyse d'ATP permet de mesurer l'activité de ces protéines soit en analysant la quantité d'ATP hydrolysée à l'aide d'un système de couplage décrit ci-dessous, soit en mesurant la quantité de phosphate inorganique (Pi) libéré au cours de la réaction.

1. Mesure de l'activité ATPase grâce à un système couplé

a) Description du système expérimental

Les systèmes de couplage sont utilisés pour mesurer la vitesse d'une réaction lorsque celle-ci ne peut être suivie directement. Souhaitant mesurer l'activité ATPase dans les extraits de protéines membranaires ou sur protéines purifiées, nous avons choisi de suivre l'hydrolyse de l'ATP par le biais de deux réactions couplées (Figure 22).

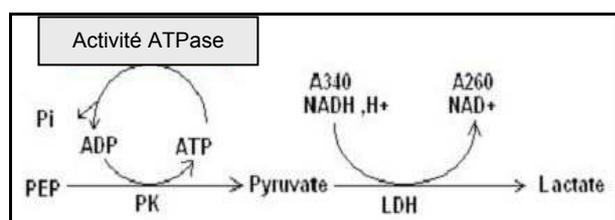


Figure 22 : Couplage réactionnel utilisé pour mesurer l'activité ATPase.

PEP ; phosphoénolpyruvate, PK ; pyruvate kinase, LDH ; lactate déshydrogénase.

Cette méthode est basée sur la conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate, en présence d'ADP, par la pyruvate kinase (PK). Le pyruvate est transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). Cette dernière étape requière du NADH, lequel est oxydé en NAD^+ . Le NADH présente un maximum d'absorbance à 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) alors que le NAD^+ n'absorbe pas à cette longueur d'onde. La réaction est donc suivie au spectrophotomètre à 340 nm. Ceci nous permet de suivre la diminution de la concentration de NADH au cours du temps. D'après le système de couplage 1 molécule de NADH oxydée en NAD^+ correspond à la production de 1 molécule d'ATP consommée par les ATPases. La loi de Beer Lambert ($A = \epsilon l C$ avec ϵ : le coefficient d'extinction molaire en $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, C : la concentration en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et l : la longueur du trajet optique en cm^{-1}) permet de convertir la variation d'absorbance à 340 nm, pour un intervalle de temps donné, en activité ATPase.

b) Mode opératoire

Les conditions réactionnelles utilisées sont les mêmes que celles décrites par Chang & Penefsky (1973) avec les modifications suivantes. Le mélange réactionnel contient 1 mL de KCl 50 mM ; MgSO_4 3 mM ; PEP 3 mM ; NADH 0,150 mM ; 3 U/mL de pyruvate kinase (type VII de muscle de lapin, Sigma) ; 3 U/mL de lactate déshydrogénase (type XVII de coeur de boeuf, Sigma) ; Tris/MES pH 8,0 30 mM ; 20 $\mu\text{g/mL}$ de protéines membranaires totales

contenant l'ATPase d'intérêt et différents concentrations (0, 10 μM) de CuSO_4 , ZnSO_4 ou CaCl_2 . La réaction est effectuée à 25°C et initiée par l'ajout de Tris/ATP 0,6 mM. Elle est suivie avec un spectrophotomètre Safas-Monaco mc² (à 340 nm) pendant plusieurs min après ajout du Tris/ATP. Les résultats sont exprimés en μmoles d'ATP consommé/h/mg protéines.

2. Mesure de l'activité ATPase par dosage du phosphate inorganique

a) Description du système expérimental

Au cours de leur cycle catalytique, les ATPases de type P hydrolysent de l'ATP en ADP + Pi. Le Pi peut être dosé par un test colorimétrique utilisant le vert de malachite comme décrit ci-dessous. Le dosage du phosphate inorganique (Pi) libéré dans le milieu réactionnel nous permet de suivre l'activité de ces protéines. La technique de dosage de phosphate utilisée ici est basée sur le changement d'absorbance (à 660 nm) d'un mélange contenant du vert de malachite et du molybdate d'ammonium en fonction de la quantité de phosphate présent dans le milieu.

b) Mode opératoire

Les conditions réactionnelles ont été adaptées de Lanzetta *et al.* (1979). La mesure est faite en deux étapes : la première consiste à faire fonctionner l'ATPase en présence de ses substrats pendant un temps défini, puis la deuxième étape consiste à doser le phosphate libéré pendant la réaction.

Le mélange réactionnel contient de la protéine purifiée (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou un extrait membranaire (8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), de la cystéine 20 mM, du TCEP 100 μM , et différentes concentrations d'ions métalliques. Lorsque la réaction est réalisée avec de la protéine purifiée, du β -D dodécylmaltoside 0,1 % [p/v] et de la phosphatidylcholine 0,1 % [p/v] sont ajoutés. Le volume réactionnel est ajusté à 200 μL avec de l'eau. La réaction ATPasique est initiée après ajout de 50 μL de tampon Tris 250 mM ; NaCl 250 mM ; MgSO_4 15 mM ; ATP 15 mM. Après 10 min (dans le cas d'un dosage réalisé sur protéine purifiée) ou 20 min (dosage réalisé sur un extrait membranaire) d'incubation à 4°C ou à 37°C , la réaction est arrêtée par ajout de 750 μL d'un mélange de vert de malachite et de molybdate d'ammonium. Ce mélange (1 volume de molybdate d'ammonium 4,2 % [p/v] additionné à 3 volumes de vert de malachite 0,045 % [p/v] préparé dans HCl 4N) est agité pendant 20 min puis filtré avant utilisation. La solution est mélangée au vortex et 100 μL de citrate de sodium 34 % [p/v] sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 660 nm. La quantité de phosphate présente dans la réaction est déterminée grâce à une courbe étalon préalablement réalisée avec du KH_2PO_4 .

B. Protéolyse limitée à la trypsine

Au cours du cycle catalytique des ATPases de type P, la liaison à l'ATP entraîne un changement de conformation des protéines permettant ainsi le passage de l'ion transporté.

Nous avons utilisé la technique de protéolyse limitée pour étudier l'effet de l'ATP sur le changement de conformation de HMA1 et PAA1. En effet, un changement de conformation de la protéine peut rendre accessible ou inaccessible un site de digestion trypsique.

La protéolyse limitée a été réalisée à partir de 50 µg d'extraits membranaires bruts issus de *Lactococcus lactis* ou 200 ng de protéine purifiée. Les échantillons sont incubés pendant 5 min à 30°C dans un milieu réactionnel contenant du Tris-HCl 20 mM pH 7 ; KCl 0,1 mM ; MgCl₂ 5 mM. Suivant les réactions, de la trypsine (avec un ratio protéine/trypsine égal à 10 [p/p]) et de l'ATP 5 mM sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite précipités à l'acétone 80% [v/v] et analysés par SDS-PAGE et immunomarquage.

C. Mesure de phosphorylation par incorporation de Pi radioactif

La formation d'intermédiaires phosphorylés à partir de Pi est effectuée à 30°C en incubant 100 µg d'extrait membranaire brut issu de *L. lactis* contenant l'ATPase d'intérêt dans 90 µL de tampon Hepes 20 mM pH 6 ; MgCl₂ 10 mM, DMSO 20 % [v/v] contenant soit différentes concentrations de métal (CuSO₄, ZnSO₄, CaCl₂) soit de l'EGTA 1 mM. La réaction de phosphorylation est initiée par l'ajout de ³²Pi 100 µM et arrêtée 10 secondes plus tard par addition de 1 mL d'acide trichloroacétique 7 % [p/v], KH₂PO₄ 1 mM froid. Après 1 h d'incubation dans la glace, la suspension est centrifugée 15 min à 15 000 g, 4°C, et le culot de protéines est lavé 3 fois dans le tampon précédent. Le culot est repris dans 50 µL de lithium dodécyl sulfate 18 mM ; SDS 0,1 mM; NaH₂PO₄ 2,5 mM pH 6 ; β-mercaptoethanol 1 % [v/v]; bleu de bromophénol 0,25 mg/mL et glycérol 50 % [p/v]. Les protéines sont ensuite analysées par électrophorèse en condition acide (Weber *et al.*, 1969). L'utilisation de ces conditions acides permet d'éviter une hydrolyse de la liaison aspartyl-phosphate. Le gel est exposé sur un écran PhosphorScreen et analysé à l'aide d'un Phosphorimager Cyclone (Perkin Elmer). Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie pour valider la quantité des protéines déposées sur gel dans les différentes conditions analysées.

VII. AUTRE TECHNIQUE : DOSAGE DE METAUX PAR ICP-MS

La quantification des ions métalliques est réalisée par utilisation du plasma à couplage inductif associé à une détection par spectrométrie de masse (ICP/MS ou Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy). Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Corinne Rivasseau (LPCV).

Ces mesures ont été réalisées : (a) sur des culots de *Lactococcus* (correspondant à 50 ml de culture) exprimant différentes protéines et mises en culture en présence de différentes concentrations de CuSO₄; et (b) sur des chloroplastes purifiés issus de différentes lignées mutantes d'*Arabidopsis*.

Les échantillons biologiques sont dans un premier temps minéralisés. Pour cela, ces échantillons sont remis en suspension dans 800 µL de HNO₃ 10 % [v/v] et transférés dans un

erlen préalablement pesé, permettant ainsi de déterminer le poids frais de l'échantillon. Après ajout de 10 mL d'un mélange de HCl/HNO₃ (2 : 1), les échantillons sont minéralisés par évaporation à 180°C. Après évaporation, l'échantillon minéralisé est repris dans 800 µL (pour les bactéries) ou 400 µL (pour les chloroplastes) de HNO₃ 10 % [v/v] et transféré dans un tube Falcon de 15 mL. L'erlen est rincé par deux ajouts successifs de 3,6 mL d'eau (1,8 mL pour les chloroplastes) qui sont ensuite transférés dans le tube Falcon contenant l'échantillon minéralisé. Les débris non minéralisables sont éliminés après une centrifugation de 10 min à 5 000 g. Avant injection dans l'appareil (HP 4500 series), l'échantillon est dilué dans du HNO₃ 1 % [v/v] afin que la quantité de métaux contenus dans ce dernier soit dans la gamme de réponse du spectromètre. La quantification est réalisée grâce à une gamme étalon préalablement effectuée avec les métaux dosés.

Chapitre I

Etude des rôles respectifs de
HMA1 et de PAA1 *in planta*

ETUDE DES ROLES RESPECTIFS DE HMA1 ET DE PAA1 IN PLANTA

HMA1 et PAA1 sont deux ATPases de type P_{1B} pouvant transporter du cuivre de part et d'autre de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. Lorsque l'une ou l'autre de ces deux voies est affectée, les phénotypes des mutants correspondants sont différents (Shikanai *et al.*, 2003 ; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006), indiquant que la fonction de ces deux protéines n'est pas entièrement redondante.

Les données obtenues *in planta* indiquent que **PAA1** a pour fonction **d'alimenter en cuivre la plastocyanine (PC) et la superoxyde dismutase à cuivre et zinc (SOD Cu/Zn) CSD2** (Abdel-Ghany *et al.*, 2005 ; Shikanai *et al.*, 2003). Le cuivre importé par PAA1 serait ensuite pris en charge par deux métallochaperones différentes : 1) une chaperonne encore inconnue qui fournirait le cuivre à PAA2, la troisième ATPase à cuivre du chloroplaste, localisée dans la membrane des thylacoïdes. Cette ATPase permet l'import du cuivre dans le lumen des thylacoïdes où il est utilisé par la plastocyanine et 2) la métallochaperonne CCS qui va ensuite fournir du cuivre à la SOD CSD2 localisée dans le stroma. En accord avec ces fonctions, un mutant *paal* présente un phénotype très prononcé de sensibilité à la lumière et un retard de croissance, phénotype qui peut être supprimé après ajout de cuivre dans le milieu de culture. PAA1 serait donc la voie principale d'import de cuivre dans le chloroplaste.

HMA1 quant à elle, est **essentielle lorsque la plante est cultivée sous forte intensité lumineuse**. Dans ces conditions, des radicaux libres issus de l'oxygène sont produits au niveau du photosystème I par la réaction de Melher et sont détoxifiés par les enzymes du cycle water-water (pour revue, lire Asada, 1999). Le rôle de HMA1 serait de fournir le cuivre nécessaire à la SOD Cu/Zn, impliquée dans cette voie de détoxification (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Higuchi *et al.*, 2009).

L'approche *in planta* développée au cours de ce travail de thèse visait à mieux comprendre le rôle de HMA1 dans l'homéostasie des métaux chloroplastiques et en particulier **les rôles relatifs de HMA1 et PAA1** :

- Afin de déterminer dans quelles situations les fonctions de HMA1 et PAA1 sont essentielles, nous avons dans un premier temps recherché des **conditions environnementales pour lesquelles HMA1 et PAA1 sont différenciellement exprimées**. Afin de replacer les éventuelles variations d'expression de *HMA1* et de *PAA1* dans un contexte plus global, nous avons aussi analysé la transcription de gènes dont le produit est lié à l'homéostasie du cuivre permettant ainsi d'identifier les gènes dont le profil d'expression est similaire à celui de *PAA1* et de *HMA1*.

- Le mutant *hmal* présente une sensibilité à de fortes intensités lumineuses, sensibilité ne pouvant être supprimée par ajout de cuivre dans le milieu de culture (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Nous avons cherché à savoir s'il existe **d'autres conditions de culture pour**

lesquelles la perte de HMA1 révèle un phénotype spécifique. Ces expériences pouvaient permettre d'obtenir des informations supplémentaires sur le rôle physiologique de HMA1.

- Afin de déterminer si HMA1 et PAA1 sont les deux seules voies d'import du cuivre dans le chloroplaste, nous avons produit un double mutant *hma1/paa1*. Si HMA1 et PAA1 sont les deux seules voies d'import du cuivre dans le chloroplaste, une plante dépourvue de ces deux transporteurs ne doit pas être viable. En effet, Weigel et collaborateurs ont montré qu'un double mutant d'*Arabidopsis thaliana* affecté dans l'expression des deux isoformes de plastocyanine n'est pas viable (Weigel *et al.*, 2003). En absence de cuivre, les plastocyanines ne sont pas fonctionnelles et la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique ne peut plus fonctionner, ce qui est léthal pour la plante.

- Enfin, pour déterminer s'il y a des redondances fonctionnelles entre la fonction de HMA1 et PAA1 in planta, nous avons surexprimé HMA1 dans un fond génétique mutant *paa1*. Le mutant *paa1* présente un phénotype de photosensibilité et de retard de croissance pouvant être supprimé par ajout de cuivre dans le milieu. Si PAA1 et HMA1 présentent une redondance fonctionnelle, la surexpression de HMA1 dans un mutant *paa1* devait permettre de supprimer ne serait-ce que partiellement son phénotype.

I. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES PAA1 ET HMA1

L'analyse de l'expression d'un gène peut être déterminée par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). Cette technique permet d'évaluer la quantité de transcrits d'intérêt et de comparer les niveaux d'accumulation de ces transcrits chez plusieurs échantillons. La technique consiste à extraire les ARNs totaux de plantes cultivées dans des conditions environnementales variables, puis d'effectuer une transcription inverse à partir des ARNm pour obtenir les ADNc correspondants. La quantité de l'ADNc d'intérêt est comparée entre les différents échantillons par amplification PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène d'intérêt. Cette amplification est proportionnelle à la quantité d'ADNc matrice utilisée. L'ADNc codant pour l'actine 2 est classiquement utilisé comme contrôle car la transcription de ce gène est généralement stable dans les diverses conditions expérimentales utilisées.

Des travaux de l'équipe, antérieurs à ce travail de thèse, ont montré que l'expression de HMA1 augmente lorsque les plantes sont cultivées sous forte intensité lumineuse sur un milieu contenant un excès de cuivre (Figure 23). Dans ces conditions, une augmentation de l'expression de PAA2 est aussi observée alors que l'expression de PAA1 ne varie pas.

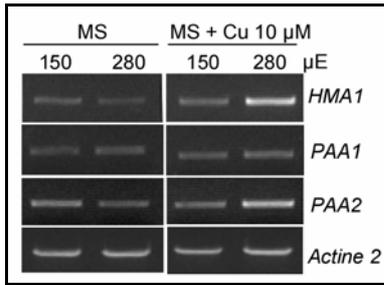


Figure 23 : Analyse de l'expression de *HMA1*, *PAA1* et *PAA2* par RT-PCR : impact de l'intensité lumineuse et de la concentration en cuivre dans le milieu de culture.

Les PCR sont réalisées à partir d'ADNc provenant de feuilles de plantes WT cultivées sur milieu MS (CuSO_4 0,1 μM) ou MS + cuivre (CuSO_4 10 μM), et sous des intensités lumineuses variables (150 et 280 μE [$\mu\text{mol photons / sec / m}^2$]). L'ADNc codant l'*actine 2* sert de contrôle de charge (son expression est indépendante des conditions expérimentales).

Les résultats présentés dans la figure 23 avaient permis d'établir un modèle sur la fonction respective de *HMA1* et de *PAA1* *in planta* (Anne Marinière, rapport de stage de M2, 2006). Lorsque le cuivre n'est pas limitant, et en forte lumière, l'expression de *HMA1* augmente très fortement. En forte lumière, la production des espèces activées de l'oxygène au cours de la photosynthèse est plus importante entraînant une augmentation de l'activité de CSD2 (SOD Cu/Zn). Dans ces mêmes conditions, la surexpression de *PAA2* entraîne un adressage du cuivre importé par *PAA1* uniquement vers les thylacoïdes créant ainsi une carence en cuivre dans le stroma. Cette carence ne peut pas être compensée par *PAA1* dont l'expression ne varie pas. Dans ces conditions, seule la surexpression de *HMA1* permet de fournir le Cu nécessaire à l'augmentation de l'activité de CSD2 (Higuchi *et al.*, 2009). Cette régulation différentielle permet de proposer deux rôles distincts pour les deux ATPases à cuivre de l'enveloppe :

- **PAA1 est un transporteur constitutif** qui alimente le chloroplaste en cuivre (et fournit le cuivre à la plastocyanine via *PAA2*).

- Au contraire, ***HMA1* a la possibilité d'adapter son niveau d'expression aux conditions environnementales** et peut notamment alimenter CSD2 lorsque la majorité du cuivre importé par *PAA1* est adressé à *PAA2* pour alimenter la plastocyanine et donc la photosynthèse. Enfin, l'expression de *HMA1* et *PAA2*, liée à l'activité photosynthétique, est aussi en parfait accord avec les résultats préalables qui avaient montré que les transcrits de *HMA1* et *PAA2* sont plus abondants dans les tissus chlorophylliens (feuilles) alors que l'expression de *PAA1* est identique dans les racines et les feuilles (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006).

A. Effet de l'intensité lumineuse et de la concentration en cuivre dans le milieu de culture sur l'expression de gènes liés à l'homéostasie du cuivre

Les expériences de RT-PCR présentées précédemment ont été poursuivies afin de valider ces résultats et afin d'analyser l'expression de gènes codant pour des protéines liées à l'homéostasie du cuivre afin d'étayer les hypothèses exposées ci-dessus. Nous avons cherché à visualiser les réponses transcriptionnelles induites par l'ajout de cuivre dans le milieu de culture en fonction de l'intensité lumineuse. Pour cela, nous avons cultivé des plantes WT sur un milieu supplémenté ou non en cuivre et en présence d'intensités lumineuses différentes.

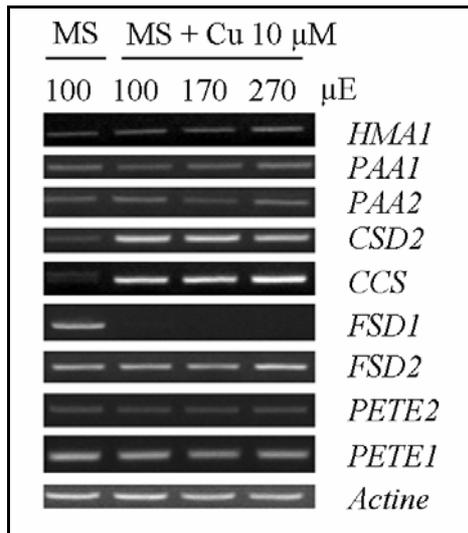


Figure 24 : Analyse, par RT-PCR, de l'impact du cuivre et de la lumière sur l'expression des gènes liés à l'homéostasie du cuivre. Les PCR sont réalisées sur les ADNc obtenus après transcription inverse sur des ARNs extraits de feuilles de plantes WT cultivées sur milieu MS contenant du saccharose 0,5 % (p/v) et deux concentrations de CuSO_4 (0,1 μM ou 10 μM CuSO_4). Les plantes sont cultivées sous des intensités lumineuses variables (100, 170 et 270 μE [$\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$]). L'ADNc codant l'actine 2 sert de contrôle de charge. Ces analyses ont été reproduites à partir de trois extractions d'ARNs indépendantes.

L'analyse présentée figure 24 indique que nous n'avons pas réussi à reproduire les résultats obtenus précédemment. En effet, le niveau de transcription de *HMA1* et de *PAA2* ne varie pas quelles que soient les conditions de croissance des plantes. Nous n'observons pas d'augmentation du niveau des transcrits *HMA1* et *PAA2* lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu contenant du CuSO_4 10 μM et sous une intensité lumineuse de 270 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$. Les premières expériences présentées dans la figure 23 avaient été réalisées à partir de plantes cultivées sous une intensité lumineuse de 280 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$. Il est possible qu'il y ait un seuil d'intensité lumineuse au-delà duquel l'expression de *HMA1* et de *PAA2* est augmentée. Cette hypothèse est en accord avec le fait que le phénotype de sensibilité à la lumière de plantes dépourvues de *HMA1* n'apparaît qu'au-delà d'une intensité lumineuse seuil, supérieure à 280 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$ (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006).

Tout comme *HMA1* et *PAA2*, le niveau des transcrits de *PAA1*, *FSD2* (SOD Fe chloroplastique), *PETE1* et *PETE2* (les deux isoformes de plastocyanine) ne varie pas dans les conditions expérimentales analysées (Figure 24).

En revanche l'expression de *CSD2* (la SOD Cu/Zn chloroplastique), de *CCS* (chaperonne à cuivre) et de *FSD1* (SOD Fe chloroplastique) varie très fortement en présence de fortes concentrations en cuivre dans le milieu de culture. En effet, nous observons une augmentation du niveau des transcrits codant pour *CCS* et *CSD2* et une diminution des transcrits codant pour *FSD1* suite à l'ajout de cuivre dans le milieu. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Abdel-Ghany et collaborateurs (Abdel-Ghany *et al.*, 2005).

Nous pouvons observer que seule la concentration en cuivre dans le milieu entraîne des variations des niveaux de transcrits pour certains des gènes étudiés. Les variations d'intensité lumineuses (de 100 à 270 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$), pour une concentration de cuivre constante de 10 μM dans le milieu, ne semblent pas avoir d'impact sur l'expression de ces gènes (Figure 24).

Les résultats présentés dans la figure 24 semblent indiquer qu'il n'y a pas de réponse graduelle de la transcription de *HMA1* et *PAA2* en fonction de la quantité de lumière mais qu'un seuil d'intensité lumineuse est probablement requis pour induire l'augmentation de l'expression de ces deux gènes comme cela avait été observé précédemment (Figure 23).

Ces nouvelles expériences ne valident donc pas le modèle préétabli. Il est aussi possible que les conditions expérimentales utilisées dans ces expériences indépendantes ne soient pas exactement identiques. L'intensité lumineuse utilisée de la première expérience était légèrement supérieure à celle utilisée dans la seconde expérience. D'autres paramètres non parfaitement contrôlés peuvent aussi interférer comme la longueur d'onde de la lumière émise par les néons qui peut varier dans le temps à cause de leur vieillissement.

Une autre explication sur la non reproductibilité de ces résultats peut être avancée : HMA1 et PAA2 transportant du cuivre pour des protéines liées à l'activité photosynthétique, il est possible que le niveau de transcription de *HMA1* et de *PAA2* puisse être contrôlé par le rythme circadien. Cette hypothèse est cohérente avec une des conclusions du travail de Higuchi et collaborateurs indiquant que le cycle water-water serait important lorsque la réaction photosynthétique se met en place, c'est-à-dire lorsque les plantes passent de l'obscurité à la lumière (Higuchi *et al.*, 2009). Dans ces conditions l'activité de la SOD Cu/Zn est essentielle et peut générer une demande en cuivre prise en charge par une augmentation de la quantité de HMA1. Le même raisonnement peut être suivi pour PAA2, prenant en charge une demande accrue en cuivre de la plastocyanine. En conclusion, il est possible que le chloroplaste nécessite plus de cuivre lors de la transition obscurité / lumière. Afin d'augmenter les flux de ce métal vers le chloroplaste, le niveau de transcription de *HMA1* et de *PAA2*, s'il est corrélé avec une augmentation de la quantité de polypeptide, permettrait de fournir plus de cuivre aux cibles qui en ont besoin. Lorsque la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique est fonctionnelle, c'est-à-dire lorsque la SOD Cu/Zn et les plastocyanines ont été suffisamment alimentées en cuivre, la demande en cuivre du chloroplaste peut diminuer autorisant une diminution de la quantité des protéines HMA1 et PAA2. Si cette hypothèse est exacte, l'heure à laquelle les plantes sont récoltées peut avoir un impact sur le niveau de transcription observé pour *HMA1* et *PAA2*.

B. Effet de l'intensité lumineuse et de la concentration en zinc sur l'expression des gènes liés à l'homéostasie du cuivre

Les travaux récents de Kim et collaborateurs indiquent que HMA1 pourrait être impliquée dans l'homéostasie du zinc chloroplastique et que cette ATPase permettrait de détoxifier le chloroplaste lorsque ce métal est en excès (Kim *et al* 2009).

Si HMA1 est impliquée dans l'homéostasie du zinc, il est possible que son niveau de transcription soit modifié en fonction de la quantité de zinc présent dans le milieu de culture.

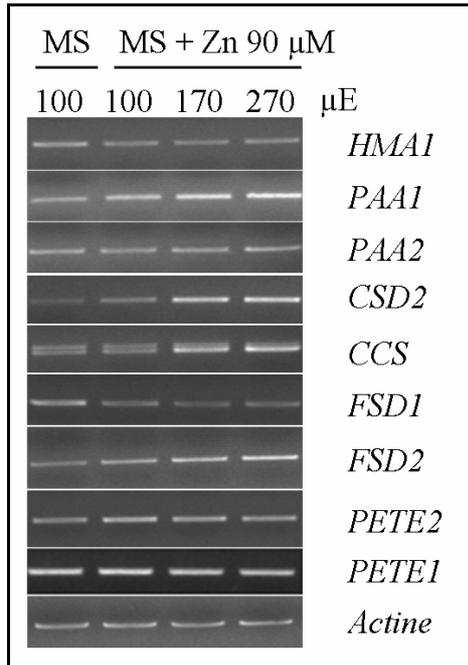


Figure 25 : Analyse, par RT-PCR, de l'impact du zinc et de la lumière sur l'expression des gènes liés à l'homéostasie du cuivre.

Les PCR sont réalisées sur les ADNc obtenus après transcription inverse sur des ARNs extraits de feuilles de plantes WT cultivées sur milieu MS (contenant du zinc 30 μM) ou MS + Zn (contenant du zinc 90 μM), et sous différentes intensités lumineuses (100, 170 et 270 μE [μmoles de photons / sec / m²]). L'ADNc codant l'actine 2 sert de contrôle de charge. Ces expériences ont été reproduites à partir de trois extractions d'ADNc indépendantes.

Les résultats présentés dans la figure 25 indiquent que le niveau de transcription de *HMA1* ne varie pas lorsque du zinc est ajouté dans le milieu de culture et ce quelle que soit l'intensité lumineuse. L'expression des gènes *PAA2*, *PETE1* et *PETE2* ne varie pas non plus dans les conditions analysées. En revanche, une hausse du niveau de transcrits codant pour *PAA1*, *CSD2*, *CCS* et *FSD2* est observée lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu riche en zinc. De façon similaire à l'impact d'un ajout de cuivre, cette augmentation est corrélée avec une diminution de l'expression de *FSD1*. L'augmentation du niveau de transcrits (de *PAA1*, *CSD2*, *CCS* et *FSD2*) est surtout visible lorsque l'intensité lumineuse augmente. En effet, les quantités de transcrits sont un peu plus élevées lorsque les plantes sont cultivées sous des intensités lumineuses de 170 et 270 μmoles de photons / sec / m².

L'excès de zinc affecte la biosynthèse de la chlorophylle (Sargadoy *et al.*, 2008). Les photosystèmes étant altérés, la chaîne de transfert d'électrons peut devenir limitante. L'énergie accumulée lors de la photosynthèse doit donc être dissipée par le transfert cyclique des électrons et le cycle water-water (Sargadoy *et al.*, 2008). Le cycle water-water étant probablement davantage sollicité, il est cohérent que la quantité de transcrits de *CSD2* et de la chaperonne (*CCS*), probablement associée à *CSD2*, augmente. Dans ce cas, la demande en cuivre de *CSD2* pourrait être prise en charge par *PAA1* dont le niveau de transcrits augmente aussi. La chaîne de transfert d'électrons fonctionnant au ralenti, les plastocyanines ne nécessitent pas davantage de cuivre pour leur activité, le cuivre transporté par *PAA1* est donc principalement dirigé vers la SOD Cu/Zn.

Les résultats de Kim et collaborateurs (2009), suggérant que *HMA1* est impliquée dans la détoxification du zinc chloroplastique, auraient peut-être pu être confirmés par une augmentation du niveau de transcription de *HMA1* lorsque la plante est cultivée sur un milieu

riche en zinc. Or, nos résultats indiquent que l'expression de *HMA1* ne varie pas après ajout de zinc dans le milieu. Ces résultats ne remettent pas en cause les conclusions de Kim et collaborateurs (2009) car la réponse transcriptionnelle n'est qu'un des nombreux moyens à disposition d'un organisme vivant pour faire face à un stress. Ces résultats ne permettent pas non plus de confirmer leurs conclusions.

C. Conclusion

Les expériences effectuées pour identifier des conditions de culture des plantes permettant d'induire une variation du niveau de transcription de *HMA1* se sont avérées infructueuses. Une hypothèse peut être avancée pour expliquer la difficulté à reproduire les résultats précédemment obtenus concernant l'expression de *HMA1* et *PAA2* : des conditions expérimentales difficiles à reproduire à l'identique et l'impact éventuel du rythme circadien. En revanche, les résultats obtenus sur la réponse transcriptionnelle des autres gènes dont l'expression a été analysée (figure 24) sont en parfait accord avec la littérature. En effet, il a déjà été observé que le niveau de transcription de *FSD1*, de *CCS* et de *CSD2* est dépendant de la quantité de cuivre disponible dans le milieu de culture (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Ces résultats valident donc les conditions expérimentales utilisées au cours de ce travail.

L'ajout de zinc dans le milieu de culture semble mimer l'effet du cuivre car nous observons une augmentation de l'expression de *CCS* et *CSD2* et une diminution de l'expression de *FSD1* (Figure 25). Ces résultats semblent être liés à une réponse à un stress oxydant car la variation de niveau de transcription observée est aussi dépendante de la lumière. De façon surprenante, nous observons une augmentation de la transcription de *PAA1*. Ceci peut être expliqué par une plus forte demande du chloroplaste en cuivre en particulier pour la SOD Cu/Zn nécessaire pour dissiper un excès d'énergie non pris en charge par la chaîne de transfert d'électrons devenue limitante du fait du stress oxydant. Le cuivre transporté par *PAA1* servant à alimenter *CSD2* et la plastocyanine, il est probable que la plante réponde à ce stress en fournissant plus de cuivre à ces protéines et en particulier à la SOD. Les données disponibles d'analyses transcriptomiques réalisées avec des puces à ADN (Genevestigator) ne nous permettent pas de valider ces résultats de RT-PCR car la variation du niveau de transcrits est très faible, variation non significative dans ces approches.

La variation de transcrits *CCS*, *CSD2* et *FSD1* en fonction de l'intensité lumineuse n'est pas observée pour des plantes cultivées sur un milieu riche en cuivre alors que cette réponse est observée sur un milieu riche en zinc. Cette différence de réponse transcriptionnelle peut être expliquée par le fait que les variations d'expression de *CCS*, *CSD2* et *FSD1* sont tellement importantes suite à l'ajout de cuivre dans le milieu qu'elles masquent des éventuelles réponses à des variations d'intensités lumineuses ou que les réponses suite à un stress cuivre ou lumineux ne sont pas additionnelles.

Des différences entre le niveau de transcription de *HMA1* et celui de *PAA1* ont été observées dans certaines conditions de culture (Figures 23 et 25). Le niveau de transcription de *HMA1*

augmente lorsque les plantes sont placées dans un milieu riche en cuivre et sous forte intensité lumineuse tandis que le niveau de transcription de *PAA1* augmente en fonction de l'intensité lumineuse lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu riche en zinc. Ces observations sont tout à fait en accord avec le modèle proposé sur les rôles de HMA1 et de PAA1. PAA1 est la voie principale de l'import du cuivre dans le chloroplaste et le cuivre qu'elle transporte est utilisé pour alimenter la plastocyanine et la SOD CSD2 et ainsi permettre un fonctionnement optimal de la photosynthèse. Lorsqu'un excès de zinc est présent dans le milieu de culture, la photosynthèse est moins efficace car le zinc inhibe la biosynthèse de la chlorophylle et par conséquent altère le fonctionnement de la chaîne de transferts d'électrons. HMA1 quand à elle serait impliquée essentiellement dans la détoxification des radicaux libres issus de l'oxygène suite à un stress lumineux et lorsque la photosynthèse est pleinement fonctionnelle. HMA1 agirait donc en complément de PAA1.

II. RECHERCHE DE NOUVELLES FONCTIONS DE HMA1 IN PLANTA

Des travaux antérieurs effectués au laboratoire ont montré que le mutant *hma1* présente une sensibilité aux fortes intensités lumineuses par rapport à des plantes sauvages, photosensibilité non liée à la quantité de cuivre présente dans le milieu. Ce phénotype a permis d'orienter les recherches portant sur les fonctions de HMA1 et de déduire que HMA1 est essentielle en conditions de stress lumineux (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Afin de mieux comprendre la fonction de HMA1 *in planta*, nous avons cherché d'autres conditions de culture permettant de révéler des phénotypes liés à la perte de fonction ou la surexpression de HMA1.

A. Effet d'un stress salin sur des plantes exprimant différemment HMA1

Les stress salins sont très répandus et limitent les rendements agricoles (Pour revue, lire Ward *et al.*, 2003). Ces stress provoquent une perturbation de la balance des ions, des niveaux toxiques de sodium au sein du cytoplasme pouvant résulter en un stress hydrique, osmotique et oxydant (Luo *et al.*, 2009).

Le travail de Maathuis indique que le niveau de transcription de *HMA1* est augmenté dans les racines suite à un stress salin (Maathuis, 2006). Ce travail est la seule référence trouvée dans la littérature sur le rôle potentiel de HMA1 dans la réponse à ce type de stress. HMA1 est transcrite principalement au niveau des parties aériennes mais aussi au niveau de racines (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). L'expression de HMA1 fusionnée à la GFP sous le contrôle de son promoteur indique que la protéine est aussi exprimée au niveau des racines (Kim *et al.*, 2009). Un stress salin induisant un stress oxydant et une perturbation de la balance des ions, HMA1 pourrait être essentielle pour fournir en cuivre CSD2, impliquée dans la détoxification des radicaux libres issus de l'oxygène ainsi que pour maintenir une concentration optimale de cuivre au sein de ces plastes.

Nous avons cherché à savoir quel était l'effet d'un tel stress sur des plantes surexprimant HMA1 ou sur les mutants *hma1*.

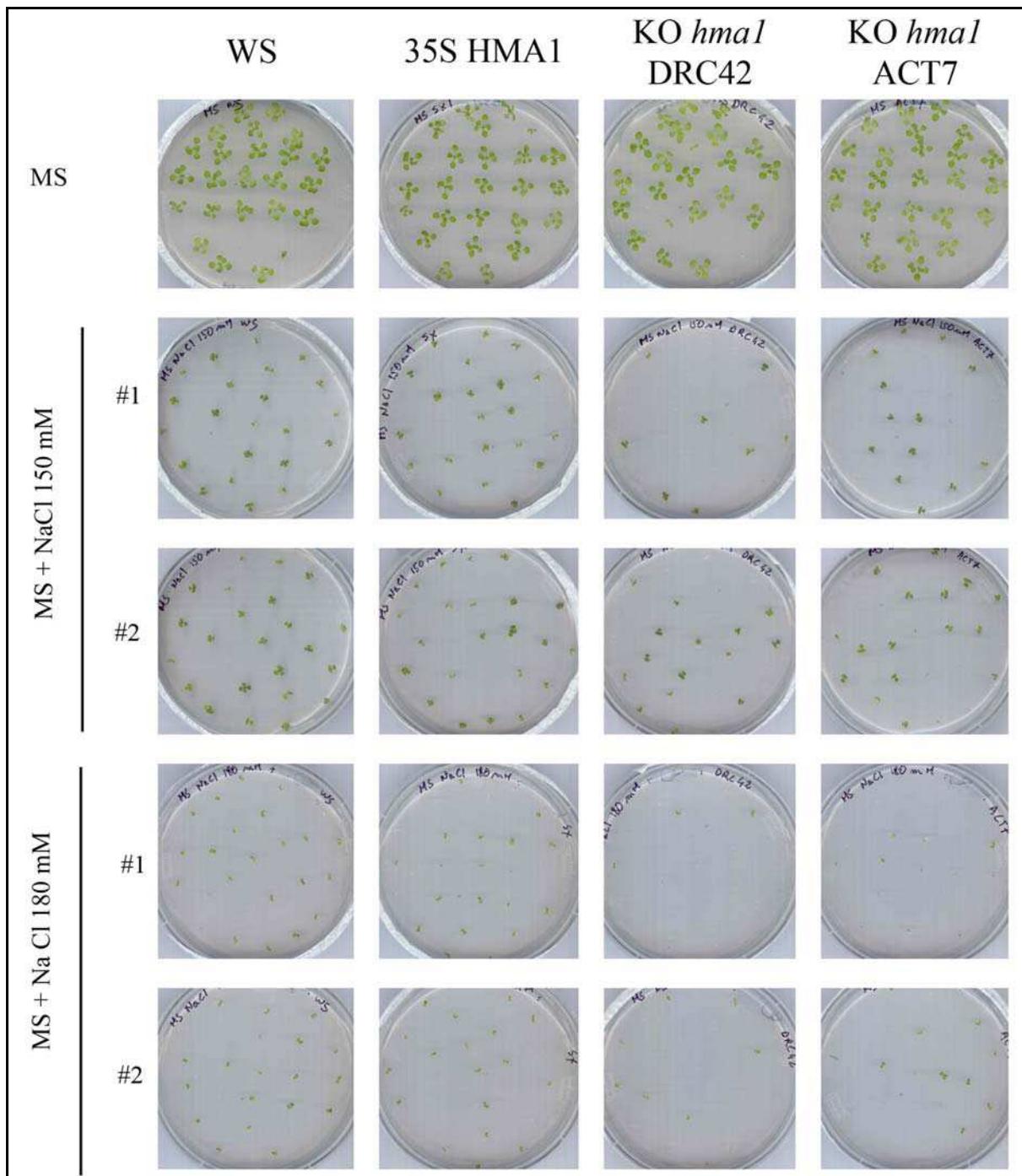


Figure 26 : Effet d'un stress salin sur la croissance de différentes lignées d'*A. thaliana* (WT, surexprimeur HMA1 ou mutants *hma1* ACT7 et DRC42).

Pour chaque condition de culture analysée, 25 graines issues de plantes WT, surexprimant HMA1 sous le contrôle du promoteur 35S (35S HMA1) et mutants *hma1* (ACT7 et DRC42) sont déposées sur milieu MS contenant du saccharose 0,5 % (p/v) et dans lequel différentes concentrations de NaCl sont présentes (NaCl 0, 150 et 180 mM). Les plantes sont cultivées pendant 21 jours sous une intensité lumineuse de 150 μmol de photons / sec / m^2 .

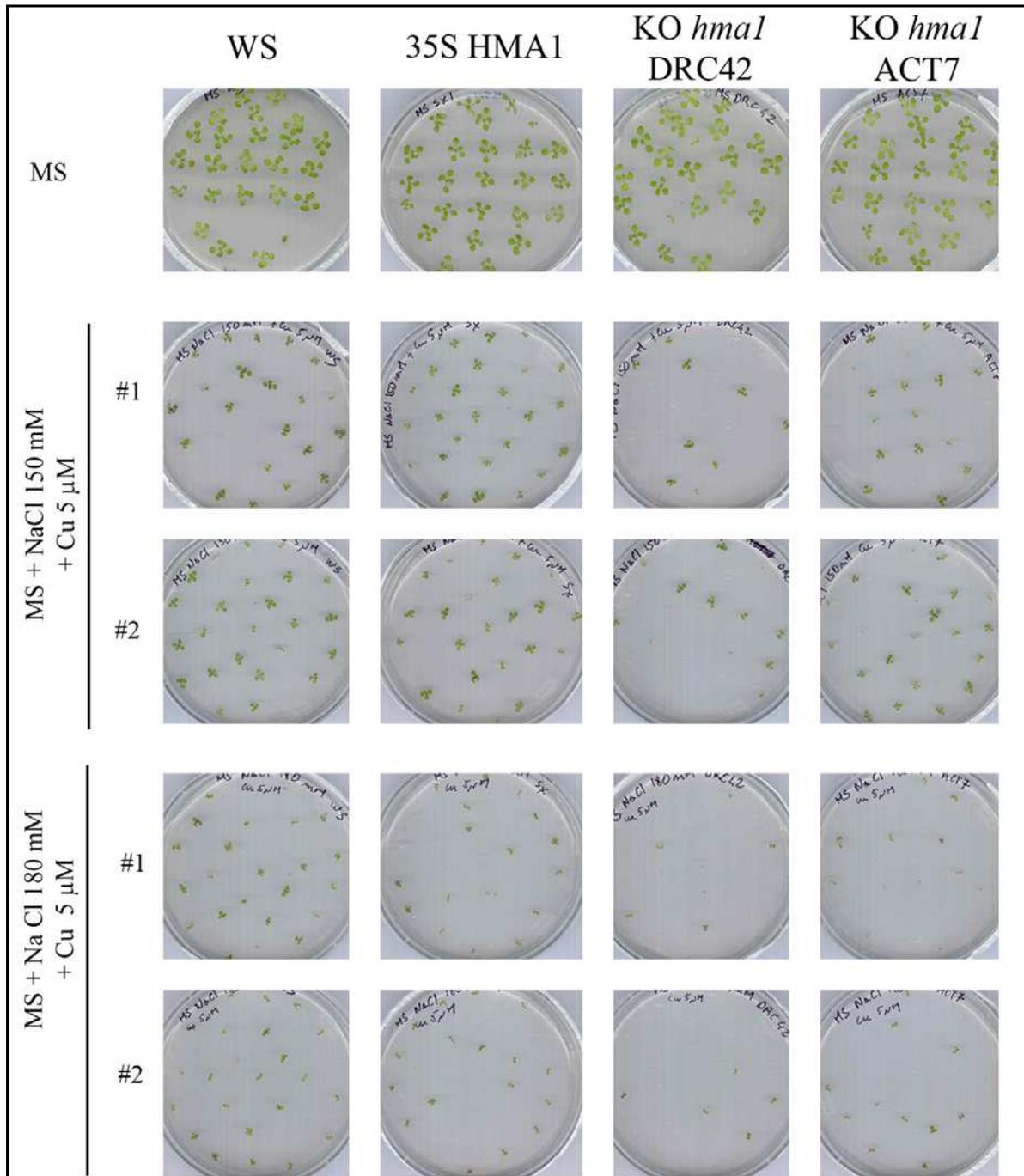


Figure 27 : Effet d'un stress salin et de l'ajout de cuivre sur la croissance de différentes lignées d'*A. thaliana* (WT, surexprimeur HMA1 ou mutants *hma1* ACT7 et DRC42).

Pour chaque condition de culture analysée, 25 graines provenant de plantes WT, surexprimant HMA1 sous le contrôle du promoteur 35S (Sx) et mutants *hma1* (ACT7 et DRC42) sont déposées sur milieu MS contenant du saccharose 0,5 % (p/v) et supplémenté avec du CuSO_4 5 μM et différentes concentrations de NaCl (0, 150 et 180 mM NaCl). Les plantes sont cultivées pendant 21 jours sous une intensité lumineuse de 150 $\mu\text{moles} / \text{sec} / \text{m}^2$.

La figure 26 montre que, sur milieu MS, les quatre lignées de plantes analysées (plantes WT, surexprimeur HMA1 et les deux mutants *hma1* indépendants) présentent une croissance similaire. Lorsque les plantes sont cultivées dans un milieu de culture contenant du NaCl 150 mM, toutes les lignées présentent un fort retard de croissance (Figure 26, NaCl 150 mM), phénotype validé par les duplicatas effectués (non montrés). Ce retard de croissance est

amplifié lorsque la concentration en NaCl augmente dans le milieu (Figure 26, NaCl 180 mM). Cependant, il semble que les deux lignées KO *hma1* présentent un problème de germination lié à la concentration saline dans le milieu de culture. HMA1 étant impliquée dans le transport du cuivre, nous cherché à savoir si un ajout de cuivre dans le milieu permettait de supprimer le phénotype observé. Pour cela, nous avons effectué la même expérience sur des milieux contenant du cuivre 5 μ M.

Comme le montre la figure 27, l'ajout de cuivre dans le milieu de culture ne permet pas de supprimer le phénotype de retard de croissance observé sur milieu MS observé dans la figure 26. En effet, plus la concentration en NaCl est élevée, plus le retard de croissance est prononcé. Enfin, les mutants *hma1* DRC42 et ACT7 semblent toujours présenter des défauts de germination lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu contenant de fortes concentrations en NaCl, et ceci indépendamment de la quantité de cuivre présente dans le milieu de culture.

L'ajout de cuivre dans le milieu ne semble donc pas supprimer le défaut de germination observé pour les mutants *hma1*. Lorsque nous comparons la croissance des plantes cultivées en présence ou absence de cuivre (Figures 26 et 27), il semble que l'ajout de ce métal améliore très légèrement la croissance des quatre lignées étudiées en particulier dans les conditions où du NaCl 150 et 180 mM a été ajouté.

Ces analyses phénotypiques suggèrent que les deux mutants *hma1* indépendants présentent un défaut de germination sur milieu enrichi en NaCl. Afin de déterminer si ce défaut est statistiquement significatif, nous avons calculé le taux de germination.

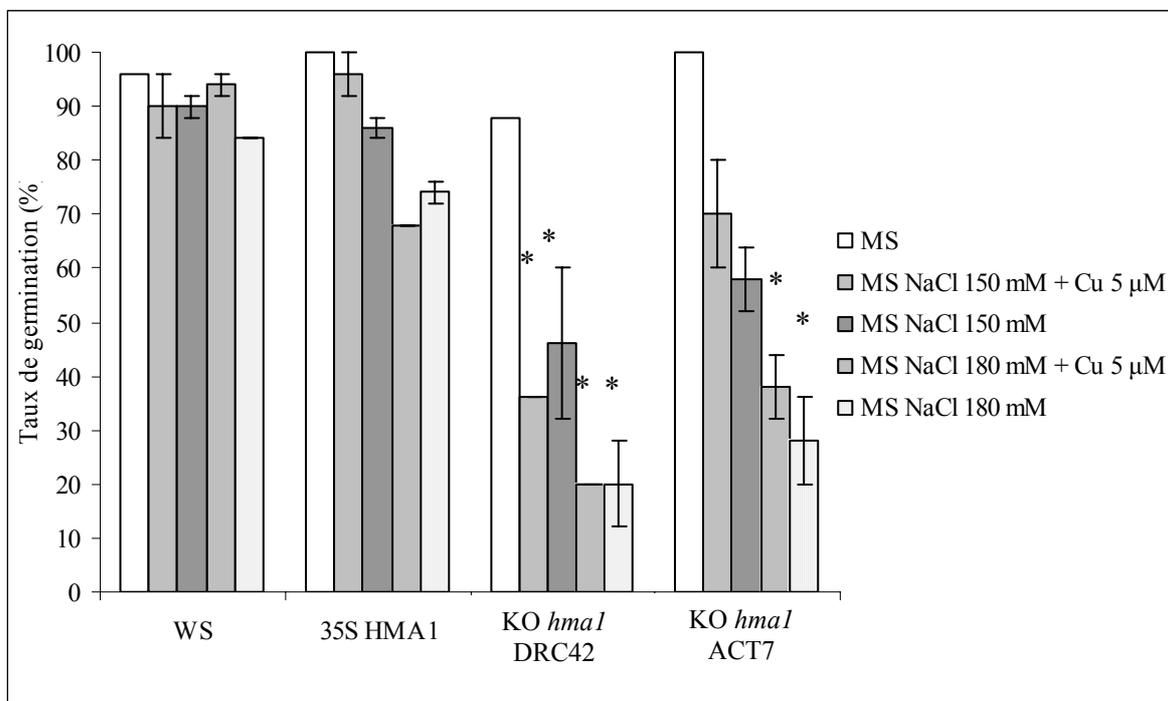


Figure 28 : Taux de germination de plantes de type WT (WS), surexprimant HMA1 (Sx) et des mutants *hma1* (ACT7 et DRC42) cultivées sur milieu salin.

Les taux de germination indiqués sont les moyennes du nombre de graines ayant germé (n=25) sur les deux expériences indépendantes présentées dans les figures 26 et 27. Les * indiquent une différence du taux de germination significative (Test du Khi 2, $p < 0,001$).

D'après la figure 28, le taux de germination des plantes WT est identique quel que soit le milieu de culture utilisé. La germination de la lignée surexprimant HMA1 n'est pas affectée non plus dans les conditions analysées. La baisse du taux de germination observée pour cette lignée sur milieu MS supplémenté avec du NaCl 180 mM n'est pas statistiquement significative.

Alors que les deux mutants indépendants de *hmal* (DRC42 et ACT7) ne présentent pas de défaut de germination lorsqu'ils sont placés sur un milieu MS classique, nous pouvons observer une baisse du taux de germination lorsque les graines sont semées sur un milieu contenant du NaCl 150 mM (Figure 28). Le taux de germination est de l'ordre de 40 % pour les mutants *hmal* issus de la lignée DRC42 et de 70 % pour les mutants *hmal* issus de la lignée ACT7. Cette diminution de la germination est statistiquement significative pour la lignée DRC42. Ces problèmes de germination sont indépendants de la quantité de cuivre présent dans le milieu de culture.

Lorsque les graines des mutants *hmal* DRC42 et ACT7 sont placés sur un milieu contenant une concentration plus élevée en sel (180 mM), le taux de germination est encore diminué et ce, de manière statistiquement significative pour les deux lignées (le taux de germination est de l'ordre de 20 % pour les mutants *hmal* issus de la lignée DRC42 et de 30 % pour les mutants *hmal* issus de la lignée ACT7). Le cuivre ajouté dans le milieu ne modifie pas ces taux de germination.

D'après la littérature, les stress salins induisent des défauts de germination sur les graines d'*A. thaliana*. Ce défaut de germination n'est pas lié à la mort de la graine mais à une inhibition des mécanismes permettant la levée de la dormance (Saleki *et al.*, 1993). Des expériences complémentaires peuvent être envisagées afin de mieux comprendre le défaut de germination observé pour les mutants *hmal* : tout d'abord, il sera nécessaire de déterminer si les graines des deux mutants *hmal* sont tuées par le stress salin ou si ce stress induit seulement une inhibition de la germination. Pour cela, les graines de ces lignées seront semées dans un milieu contenant une concentration importante de NaCl. Après une semaine de culture sur ce milieu, les graines seront transférées sur un milieu ne contenant pas une forte concentration NaCl permettant ainsi la germination et le développement des graines encore viables (Saleki *et al.*, 1993).

En parallèle, l'observation au microscope des graines des mutants *hmal* semées sur le milieu riche en NaCl, permettrait de déterminer si les graines ont commencé à germer. Si c'est le cas, il est possible que le stress salin ait induit un stress oxydant. En effet, Tsugane et collaborateurs ont montré qu'un stress salin induisait une augmentation de l'activité SOD sur de jeunes plantules d'*A. thaliana* et indiquent que l'activité SOD chloroplastique est essentielle pour conserver un PSII fonctionnel dans ces conditions (Tsugane *et al.*, 1999). D'après les travaux de Zhang et collaborateurs, CSD2 est active dans les racines d'*Elsholtzia*

haichowensis soutenant l'hypothèse que HMA1 puisse être impliquée dans la délivrance du cuivre à CSD2 au niveau des plastes des racines (Zhang *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter que l'ajout de cuivre dans le milieu ne restaure pas le taux de germination des mutants *hma1* lors d'un stress salin. Ces données suggèrent une fonction spécifique pour HMA1 qui ne peut pas être complétée par un autre transporteur de cuivre présent dans l'enveloppe des plastes comme PAA1.

B. Analyse de la croissance du mutant *hma1* en condition photoautotrophe

L'ajout de cuivre ne supprimant pas le défaut de germination des mutants *hma1* lors d'un stress salin, nous avons cherché d'autres conditions pour lesquelles le phénotype des mutants *hma1* est dépendant de la quantité de cuivre présent dans le milieu de croissance, permettant ainsi de conforter son rôle dans le transport de cuivre de HMA1 *in planta*.

Du saccharose est généralement ajouté dans le milieu de culture gélosé MS pour apporter une source de carbone réduit directement assimilable par la plante et lui permettre ainsi de croître plus rapidement (Truernit, 2001). La présence de saccharose permet donc aux plantes de se développer en condition hétérotrophe et de pallier ainsi à d'éventuelles carences de la fonction photosynthétique. Le rôle de HMA1 ayant un lien avec la photosynthèse, nous avons cultivé le mutant *hma1* DRC42 sur un milieu dépourvu de sucre. Pour effectuer ces expériences, nous avons utilisé un milieu MS dépourvu de cuivre. Ces expériences ont été réalisées dans l'équipe par Daphné Seigneurin-Berny.

Lorsque les plantules sont cultivées sur un milieu dépourvu de cuivre et de saccharose et sous faible intensité lumineuse ($50 \mu\text{moles de photons} / \text{s} / \text{m}^2$), le mutant *hma1* présente un retard de croissance (Figure 29, 50 μE) ainsi qu'un jaunissement des feuilles par rapport à des plantes sauvages (WS). Ce phénotype est partiellement supprimé par l'ajout de cuivre $0,1 \mu\text{M}$ (concentration présente dans les milieux de culture MS standard), et totalement supprimé en présence de cuivre $5 \mu\text{M}$ (Figure 29, 50 μE , Cu $0,1 \mu\text{M}$ et Cu $5 \mu\text{M}$).

Pour une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles de photons} / \text{sec} / \text{m}^2$, le phénotype observé pour le mutant *hma1* est encore plus prononcé lorsque les plantes se développent sur un milieu dépourvu en cuivre (Figure 29, 100 μE , Cu $0 \mu\text{M}$). Le phénotype du mutant *hma1* est partiellement supprimé après ajout de cuivre dans le milieu (Figure 29, 100 μE , Cu $0,1 \mu\text{M}$ et Cu $5 \mu\text{M}$). Nous pouvons aussi remarquer que l'ajout de cuivre $5 \mu\text{M}$ permet aussi une meilleure croissance des plantes WT sous cette intensité lumineuse indiquant que ce métal est essentiel pour un développement optimal de la plante.

Pour une intensité lumineuse de $200 \mu\text{moles de photons} / \text{sec} / \text{m}^2$, et sur un milieu dépourvu de cuivre, ni le mutant *hma1*, ni les plantes de type WT ne peuvent se développer (Figure 29, 200 μE , Cu $0 \mu\text{M}$). Le cuivre est un métal essentiel pour le fonctionnement de la photosynthèse et en particulier pour la PC et la SOD Cu/Zn CSD2. Il est possible que les traces de cuivre présentes dans les milieux puissent être suffisantes pour une croissance des plantes en faible intensité lumineuse. En revanche, en présence d'une intensité lumineuse plus

forte, la carence en PC et CSD2 fonctionnelles induite par la carence en cuivre ne permet probablement pas de dissiper l'énergie absorbée et les ROS produits. L'ajout de cuivre dans le milieu de culture (dès 0,1 μM) permet de restaurer la croissance des plantes WT mais pas celle des mutants *hma1*. Ce résultat indique que la perte de fonction de HMA1 n'est pas complétée par l'ajout de cuivre dans le milieu lorsque les plantes sont cultivées sous de trop fortes intensités lumineuses.

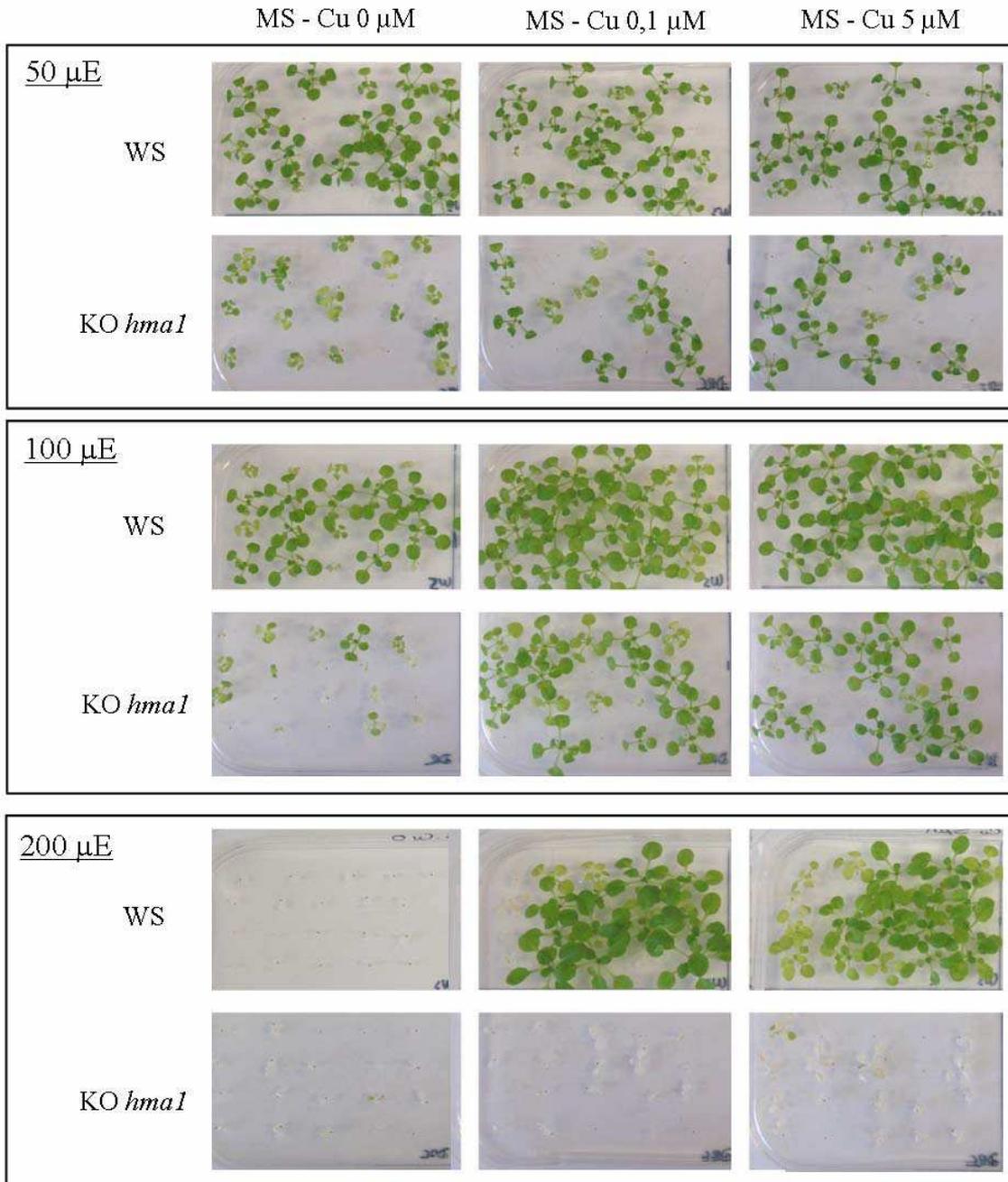


Figure 29 : Le mutant *hma1* présente un phénotype dépendant de la lumière et de la quantité de cuivre disponible sur milieu MS dépourvu de saccharose.

Des graines issues de plantes WT (d'écotype WS) et d'un mutant *hma1* (DRC42) sont semées sur milieu MS sans saccharose et contenant différentes concentrations de cuivre (0 ; 0,1 ou 5 μM CuSO_4). Les photos des boîtes ont été prises après 24 jours de croissance sous une intensité lumineuse de 50, 100 et 200 μE ($\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$).

Ce phénotype n'est pas visible dès la germination. En effet, lorsque nous avons analysé la croissance de ces plantes après 9 jours de culture (stade cotylédons), aucune différence de croissance n'a été observée entre les différentes lignées (non montré). Ce résultat est expliqué par le fait que la graine contient des réserves de carbone réduit, réserves consommées le temps que la photosynthèse prenne le relai pour permettre une croissance autotrophe des plantules (Eastmond & Grahaam, 2001).

Cette sensibilité du mutant *hma1* sur milieu dépourvu en cuivre et en saccharose est tout à fait en accord avec les rôles proposés pour la fonction de HMA1 (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Higuchi *et al.*, 2009). Ces travaux concluent que HMA1 pourrait fournir du cuivre à la SOD Cu/Zn chloroplastique, CSD2, en condition de stress lumineux. Cette enzyme est impliquée dans la détoxification des radicaux libres issus de l'oxygène par le cycle water-water. Plus le stress lumineux est intense, plus la production de ROS augmente par la réaction de Fenton au niveau du PSI, et plus l'activité de CSD2 devient essentielle, donc plus l'activité de HMA1 devient importante.

Ces cultures en condition autotrophe permettent d'accentuer le phénotype de photosensibilité déjà mis en évidence par l'équipe (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). En effet, en condition hétérotrophe, la photosensibilité du mutant *hma1* n'est observé que pour des intensités lumineuses supérieures à 280 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$. De plus, en condition autotrophe et pour de faibles intensités lumineuses, l'ajout de cuivre dans le milieu permet de compléter le phénotype du mutant *hma1*. Cette suppression du phénotype de photosensibilité par le cuivre présent dans le milieu diminue lorsque l'intensité lumineuse augmente. Ces expériences confortent l'hypothèse selon laquelle HMA1 est effectivement liée à l'homéostasie du cuivre *in planta*.

C. Conclusion

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le rôle de HMA1 *in planta*, nous avons recherché des conditions de culture pour lesquelles la surexpression ou la perte de fonction de HMA1 induit un phénotype différent de celui observé pour une plante WT.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'impact d'un stress salin car 1) l'excès de sels induit des stress ionique et oxydatif, et 2) des données transcriptomiques indiquaient une surexpression des transcrits *HMA1* dans les racines lors d'un stress salin (Maathuis, 2006). Les résultats obtenus (Figures 26, 27 et 28) indiquent que **les deux mutants *hma1* présentent un faible taux de germination lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu riche en NaCl, phénotype non supprimé par l'ajout de cuivre** dans le milieu. Ceci indique que HMA1 pourrait être essentielle lors de la germination ou au niveau des racines en cas de stress salin. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer si la perte de HMA1 en condition de stress salin a un effet sur l'inhibition de la dormance ou sur le développement des racines. Il sera aussi nécessaire d'analyser l'impact d'autres molécules permettant d'induire un stress osmotique (mannitol) ou un stress oxydant (méthyl-viologène).

HMA1 est une protéine chloroplastique, impliquée dans le transport du cuivre et qui est essentielle en condition de forte intensité lumineuse. Nous avons donc analysé la croissance du mutant *hma1* en condition photoautotrophe permettant d'exacerber les phénotypes liés à un défaut du fonctionnement de la photosynthèse. En effet, lorsque des plantes sont cultivées sur un milieu dépourvu en saccharose, la photosynthèse est la seule source de carbone réduit. Les résultats obtenus montrent que sur un milieu dépourvu de sucre et de cuivre, le mutant *hma1* présente un retard de croissance et un jaunissement des feuilles par rapport à des plantes WT. Ce phénotype est d'autant plus prononcé que l'intensité lumineuse est élevée. **L'ajout de cuivre, en condition photoautotrophe, permet de supprimer le phénotype du mutant *hma1*.** Toutefois, cette complémentation est inversement proportionnelle à l'intensité lumineuse : plus l'intensité lumineuse augmente, moins l'ajout de cuivre a un impact sur le développement du mutant *hma1*.

Ces résultats indiquent aussi que des mécanismes de compensation sont mis en place suite à la perte de HMA1, mais qu'ils ne sont pas suffisants pour pallier à sa carence. Ces résultats confirment donc le rôle essentiel de HMA1 en condition de stress lumineux, et le fait que sa perte de fonction ne puisse pas être compensée par un autre transporteur de cuivre. **Ces résultats sont aussi en accord avec les travaux récents de Higuchi et collaborateurs** (Higuchi et al., 2009) qui concluent que la fonction de HMA1 est de fournir du cuivre à la SOD Cu/Zn, enzyme impliquée dans le cycle water-water. Ce cycle est important en condition de stress lumineux pour dissiper l'excès d'énergie produite par la photosynthèse et diminuer la production de radicaux libres issus de l'oxygène. En condition de culture autotrophe, seule la photosynthèse est capable de fournir le carbone réduit nécessaire au développement de la plante. Ainsi, la photosynthèse et les mécanismes de dissipation d'énergie doivent fonctionner de manière optimale, en particulier lorsque la plante est placée en condition de stress lumineux.

En revanche, **le phénotype du mutant *hma1* décrit ici est totalement différent de celui observé par Kim et collaborateurs** (Kim et al., 2009). En effet, ces autres auteurs observent un phénotype de sensibilité au zinc indépendant de la lumière et en déduisent que HMA1 est impliquée dans la détoxification du zinc chloroplastique. Kim et collaborateurs (2009) soulignent que ce phénotype n'est visible que pour des mutants *hma1* issus de l'écotype Col (utilisés dans leur étude) et qu'il n'est pas visible pour des mutants *hma1* issus de l'écotype WS. Or, les mutants *hma1* que nous utilisons au laboratoire sont issus de l'écotype WS. Les impacts différents de la délétion de HMA1 dans ces deux écotypes peuvent être expliqués par la **différence de tolérance aux métaux des écotypes Col et WS**. Schiavon et collaborateurs ont montré que l'écotype WS présente une meilleure tolérance au cuivre que les écotype Col

(Schiavon *et al.*, 2007). De plus, l'écotype WS est aussi plus résistant à une carence en cuivre car l'acquisition de ce métal est plus efficace dans l'écotype WS. Verret et collaborateurs ont montré que l'écotype WS accumule plus de zinc que l'écotype Col (Verret *et al.*, 2004). Nous pouvons donc en déduire que les phénotypes de sensibilité liés à des excès de métaux sont plus visibles sur l'écotype Col que sur l'écotype WS. Afin d'étudier le rôle de HMA1 indépendamment de son écotype, ces expériences (stress salins, cultures en conditions photoautotrophes et ajout de cuivre) seront reproduites très prochainement avec un mutant *hmal* issu d'un écotype Col. Ce mutant *hmal* provient du SALK Institute et présente une insertion de l'ADN-T au niveau du onzième intron du gène codant pour *HMA1*, c'est-à-dire au même niveau que les insertions présentes dans les lignées ACT7 et DRC42 (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006).

Lors d'expériences complémentaires, nous avons aussi étudié l'impact d'un stress lumineux couplé à une carence en fer sur la croissance de nos différentes lignées (non montré). L'idée était de limiter le fer qui alimente les SOD à fer chloroplastiques afin que ces enzymes ne puissent pas compléter (ou moins bien) une diminution de l'activité de la SOD cuivre/zinc chloroplastique CSD2 (Kliebenstein *et al.*, 1998). Ces conditions auraient théoriquement pu exacerber le phénotype lié à la perte de HMA1. Ces expériences n'ont toutefois pas permis de révéler un phénotype associé à la surexpression ou la délétion de HMA1.

III. MISE EN EVIDENCE D'UNE TROISIEME VOIE D'IMPORT DU CUIVRE DANS LE CHLOROPLASTE

HMA1 et PAA1 sont deux ATPases impliquées dans l'homéostasie du cuivre chloroplastique localisées dans la membrane interne de l'enveloppe. Afin de déterminer si ces protéines sont les deux seules voies d'entrée du cuivre dans le chloroplaste, nous avons entrepris d'obtenir un double mutant *hmal/paal*. Si HMA1 et PAA1 sont les deux seules voies d'import du cuivre dans le chloroplaste, la perte de fonction de ces deux protéines devrait être létale. En effet, une plante dépourvue de plastocyanine, protéine chloroplastique qui utilise le cuivre comme cofacteur, n'est pas viable en condition autotrophe (Weigel *et al.*, 2003).

A. Stratégie utilisée pour l'obtention du double mutant

Le double mutant a été obtenu en croisant les simples mutants homozygotes, le mutant *hmal* DRC42 (caractérisé au laboratoire) et le mutant *paal-1* fourni par Marinus Pilon (USA). L'obtention du double mutant ainsi que sa caractérisation phénotypique ont été effectuées dans l'équipe par Daphné Seigneurin-Berny.

Le mutant *hmal* est un mutant d'insertion provenant de la banque de l'INRA de Versailles. Le marqueur de sélection associé à l'insertion de l'ADN-T est le gène conférant une résistance à la kanamycine (pour description de ce mutant, lire Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Le

mutant *paal.1* a été obtenu suite à une mutagenèse aléatoire induite par l'EMS. Le gène codant PAA1 contient une mutation sur un nucléotide qui insère un codon STOP à la place de la glutamine 457. Le mutant *paal-1* exprime donc une protéine tronquée (pour description, lire Shikanai *et al.*, 2003).

Le mutant *paal-1* présente un phénotype très prononcé de photosensibilité et de retard de croissance supprimé après ajout de cuivre dans le milieu (Shikanai *et al.*, 2003). Les conditions dans lesquelles le phénotype est supprimé sur milieu gélosé sont décrites dans les travaux de Shikanai et collaborateurs (2003). D'après ces données, et après plusieurs essais de culture au laboratoire, nous avons déterminé que les meilleures conditions de croissance de cette lignée sont obtenues lorsque les plantes sont cultivées en terre, arrosées avec de l'eau contenant du CuSO_4 30 μM , et cultivées sous une intensité lumineuse de 50 μmoles de photons / sec / m^2 . Ces conditions permettent d'obtenir un cycle complet jusqu'à l'obtention des graines mais le retard de croissance de cette lignée n'est pas entièrement supprimé : **le cycle de reproduction est de 4 à 5 mois pour ce mutant *paal-1*.**

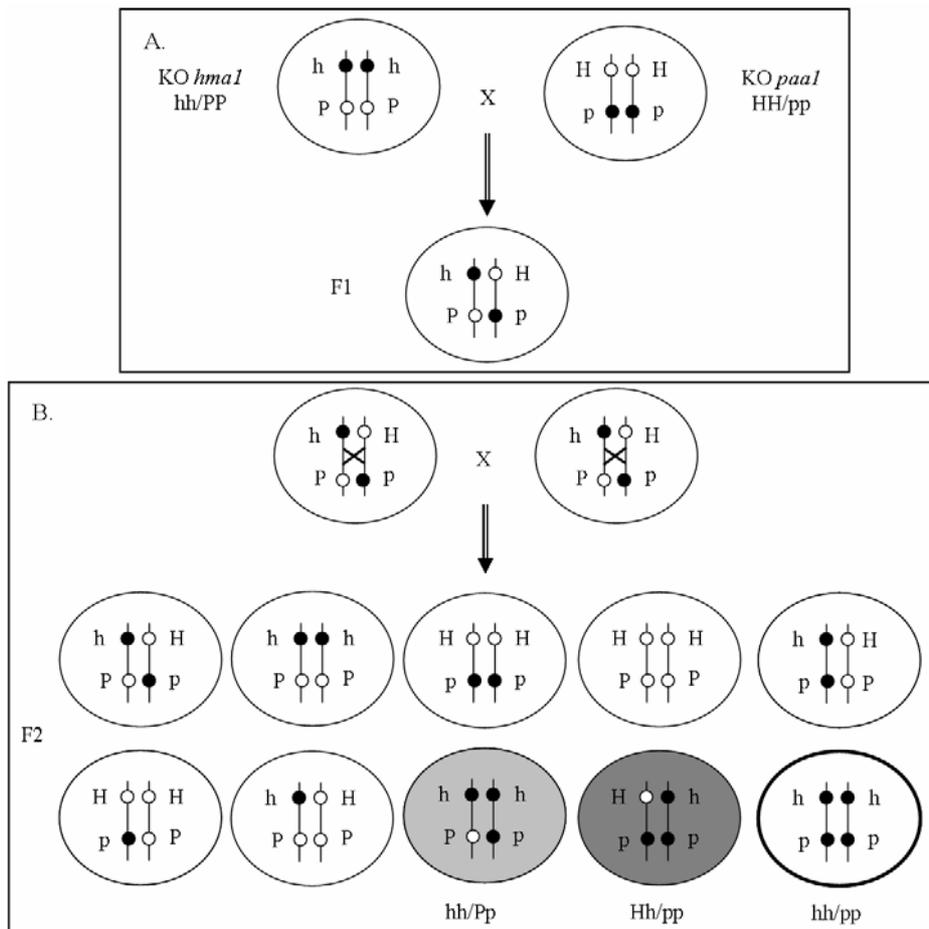


Figure 30 : Stratégie employée pour l'obtention du double mutant *hmal/paal*.

A. Croisement des simples mutants *hmal* et *paal* et descendance en résultant. Ces plantes sont hétérozygotes pour chacune des mutations. B. En croisant les plantes issues de la F1 entre elles et en prenant en compte un événement de recombinaison homologe entre les loci des gènes *hmal* et *paal*, 10 plantes de génotype différent peuvent être obtenues. Parmi elles, le double mutant homozygote (*hh/pp*, cercle gras), et les lignées homozygotes pour une mutation et hétérozygotes pour l'autre (*hh/Pp*, cercle gris clair ; *Hh/pp*, cercle gris foncé).

Le croisement des deux simples mutants homozygotes (Figure 30, KO *paal-1* HH/pp et KO *hmal* hh/PP), obtenu par fécondation des mutants *paal* par le pollen des mutants *hmal*, produira une F1 hétérologue pour chacune des mutations (Hh/Pp) (Figure 30 A). Les graines récoltées en F1 sont semées sur milieu contenant de la kanamycine permettant d'éliminer les plantes de génotype HH. Les gènes *HMA1* (AT4G37270) et *PAA1* (AT4G33520) étant localisés sur le même chromosome, des événements de recombinaison homologue dans les plantes de la génération F2 devront être sélectionnés pour obtenir le double mutant. La distance physique entre les deux gènes est d'environ 1,4 mégabases ce qui correspond à une distance génétique de 7 cM. Cet événement de recombinaison homologue ne se produit donc que dans 7 % des cas lors de la méiose. Les plantes obtenues en F2 auront l'un des dix génotypes décrit dans la figure 30 B et le tableau 10.

Allèles transmis par les plantes de la génération F1	Hp 1-d/2	hP 1-d/2	HP d/2	hp d/2
Hp 1-d/2	Hp Hp	hP Hp	HP Hp	hp Hp
hP 1-d/2	Hp hP	hP hP	HP hP	hp hP
HP d/2	Hp HP	hP HP	HP HP	hp HP
hp d/2	Hp hp	hP hp	HP hp	hp hp

Tableau 10 : Différents génotypes pouvant être obtenus en F2.

Le tableau récapitule les différents génotypes pouvant être obtenus après avoir croisé les plantes de la génération F1 entre elles avec la probabilité « d » qu'un événement de recombinaison entre les locus codant pour *hmal* et *paal* se produise. $d = 0,07$. Le génotype correspondant au double mutant homozygote (hh/pp) portant les deux mutations est entouré en gras, le génotype correspondant aux plantes homozygotes pour l'une ou l'autre des mutations et hétérozygote pour l'autre sont teintées en gris clair (Hh/pp) et en gris foncé (hh/Pp).

La probabilité d'obtenir en F2 un mutant homozygote pour les deux mutations est d'environ 1/800. Pour augmenter la probabilité d'obtenir le double mutant homozygote, nous avons, dans un premier temps, sélectionné des plantes de génotype Hh/pp (gris foncé dans les figures 30 et 31, tableau 10) ou hh/Pp (gris clair dans les figures 30 et 31, tableau 10). En effet, la descendance de ces plantes contiendra 1/4 de doubles mutants homozygotes (hh/pp) permettant de faciliter leur identification par PCR.

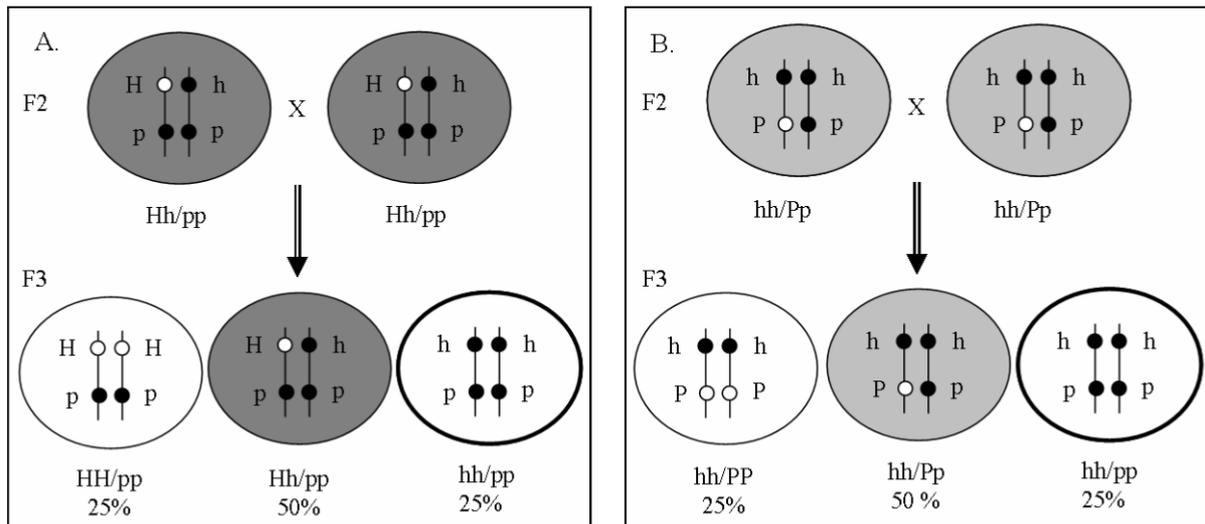


Figure 31 : Obtention des doubles mutants homozygotes à partir de plantes homozygotes pour un des allèles mutés (*hma1* ou *paal*) et hétérozygotes pour l'autre allèle muté.

La descendance des plantes sélectionnées en F2, de génotype Hh/pp (hétérozygote pour *hma1* et homozygote pour *paal* ; A) ou hh/Pp (homozygote pour *hma1* et hétérozygote pour *paal* ; B) est obtenue par autofécondation. La F3 en résultant contient 25 % de doubles mutants homozygotes de génotype hh/pp.

B. Obtention du double mutant homozygote

La sélection des plantes de génotype Hh/pp ou hh/Pp (voir figures 30 et 31) dans la F2, ainsi que des doubles mutants homozygotes (hh/pp) dans la génération F3, a été effectuée par PCR sur l'ADN génomique des différentes plantes. Pour cela, nous avons utilisé différents couples d'amorces permettant d'amplifier spécifiquement les allèles mutés et sauvages de *hma1* et de *paal*. L'allèle muté de *HMA1* est amplifié en utilisant une amorce spécifique de l'ADN-T (tag5) et une amorce spécifique du gène. L'allèle sauvage de *HMA1* est amplifié par un couple d'amorces spécifiques du gène (positionnées de part et d'autre du site d'insertion de l'ADN-T). La mutation dans *paal* étant liée à la substitution d'une seule base, nous avons utilisé des amorces antisens pour lesquelles la dernière base des amorces est spécifique soit de la forme sauvage du gène *PAA1* soit de sa forme mutée. L'ADN génomique est extrait à partir des premières paires de feuilles des plantules.

L'analyse de 140 plantules de la génération F2 a permis de sélectionner la lignée 136 (Hh/pp : hétérozygote pour *hma1* et homozygote pour *paal*) et la lignée 31B (hh/Pp : homozygote pour *hma1* et hétérozygote pour *paal*). Après autofécondation, les graines issues de ces deux lignées ont permis d'obtenir (génération F3) 46 plantules pour la lignée 136 et 56 plantules pour la lignée 31B.

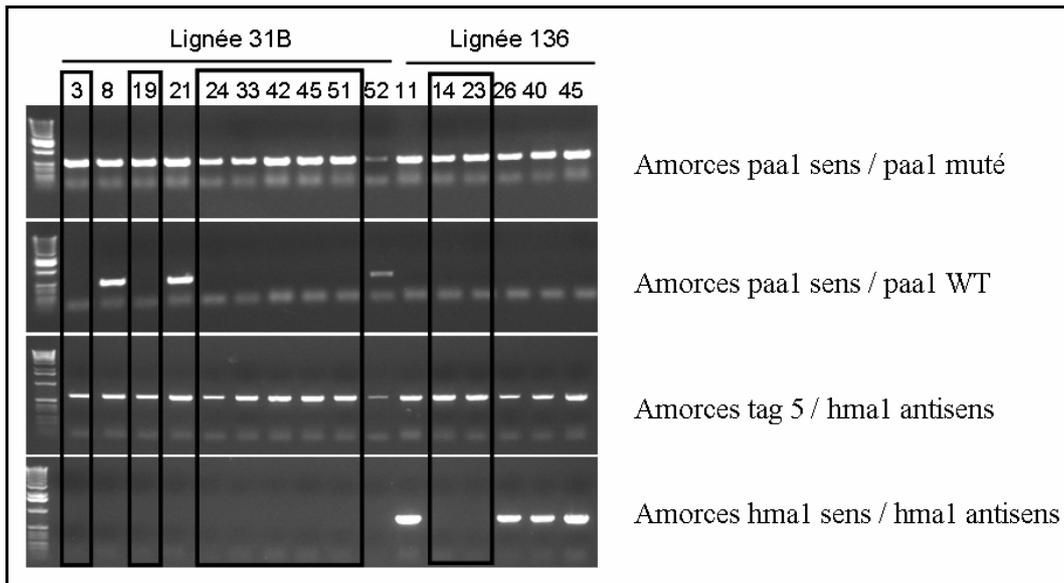


Figure 32 : Sélection par PCR du double mutant homozygote (hh/pp)

Les PCR ont été effectuées sur l'ADN génomique de la descendance de plantes homozygotes pour l'un des deux gènes mutés et hétérozygotes pour l'autre (lignée 31B et lignée 136). L'amorce "Tag 5" s'hybride avec l'ADN-T inséré dans le gène *hma1*, l'amorce "hma1 sens" s'hybride avec *HMA1*, l'amorce "hma1 antisens" s'hybride avec *hma1* et *HMA1*, l'amorce "paal sens" s'hybride avec *PAA1* et *paal*, l'amorce "paal muté" s'hybride avec *paal* et l'amorce "paal WT" avec *PAA1*. Les amplifications correspondant aux résultats attendus pour des doubles mutants sont encadrées. Afin de valider le génotype des doubles mutants homozygotes, deux amplifications PCR indépendantes ont été effectuées à partir de deux extractions d'ADN génomique.

La figure 32 présente un exemple d'amplifications PCR obtenues à partir d'ADN génomique extrait de différentes plantules de la génération F3. Les plantules 19, 24, 33, 42, 45 et 51 issues de la lignée 31B sont homozygotes (hh/pp) pour les deux mutations car une amplification est obtenue seulement avec les couples d'amorces "paal sens"/"paal muté" et "Tag 5"/"hma1 antisens", qui ne permettent d'amplifier que les allèles mutés de *HMA1* et *PAA1*. Les plantes 8, 21 et 52 issues de la lignée 31B sont homozygotes pour la mutation *hma1* car une amplification est observée seulement avec les amorces "tag5"/"hma1 antisens", et ces plantes sont hétérozygotes pour la mutation *paal* car une amplification est observée avec les deux couples d'amorces "paal sens"/"paal muté" et "paal sens"/"paal WT".

Pour ce qui concerne la lignée 136, les résultats obtenus par PCR indiquent que les plantes 14 et 23 sont des mutants homozygotes (hh/pp) pour les deux mutations car une amplification est obtenue seulement avec les couples d'amorces "paal sens"/"paal muté" et "Tag 5"/"hma1 antisens". L'amplification observée avec les amorces "paal sens"/"paal muté" mais pas avec les amorces "paal sens"/"paal WT" indiquent que les plantes 11, 26, 40 et 45 sont homozygotes pour *paal*. Par contre, elles sont hétérozygotes pour *hma1* car une amplification est observée lorsque l'amplification est effectuée avec les couples d'amorces "hma1 tag5"/"hma1 antisens" et "hma1 sens"/"hma1 antisens". Pour chaque double mutant homozygote identifié, deux analyses par PCR ont été réalisées à partir de deux extractions

indépendantes d'ADN génomique. Pour les analyses suivantes, nous avons utilisé les lignées 31B.33 et 136.23.

Comme nous avons pu identifier parmi les différentes lignées, des plantes homozygotes pour les deux mutations, cela signifie que ces mutants sont capables de se développer sur terreau (supplémenté en cuivre) et d'effectuer un cycle complet. En d'autres termes, ces résultats montrent donc que le **double mutant *hmal/paa1* homozygote est viable** et qu'il existe donc **une troisième voie d'import du cuivre dans le chloroplaste**.

C. Caractérisation phénotypique du double mutant *hmal/paa1*

Le double mutant *hmal/paa1* étant viable, nous avons cherché à savoir si ce double mutant présente des différences morphologiques par rapport aux simples mutants *hmal* et *paa1*.

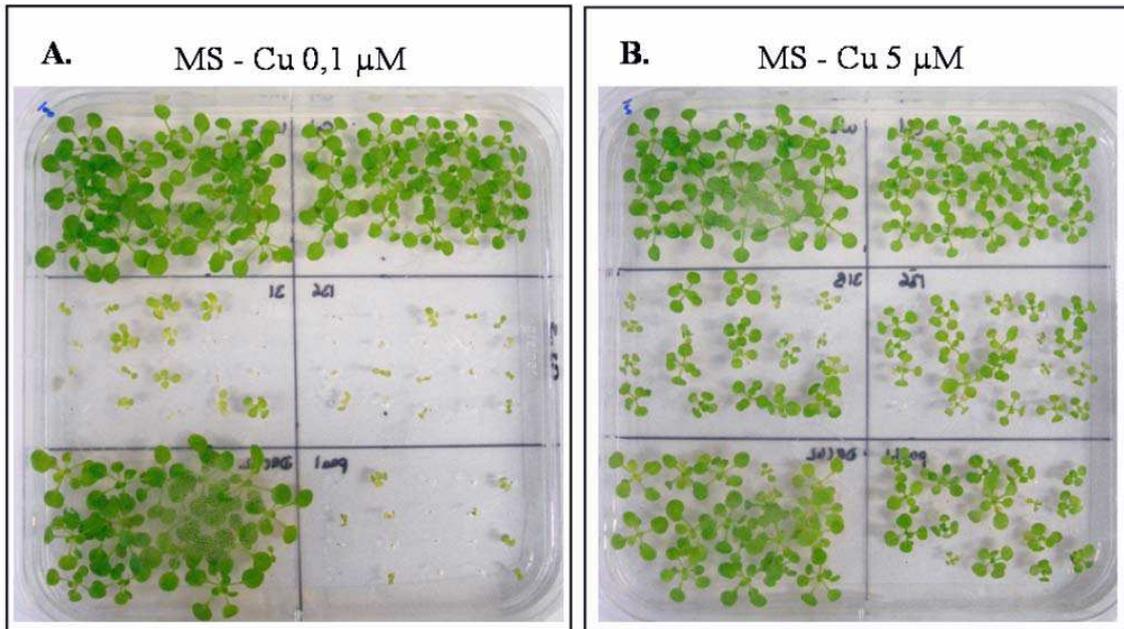
1. Comparaison de la croissance du double mutant *hmal/paa1* par rapport à celle des simples mutants *hmal* et *paa1*.

Les premiers tests effectués pour la caractérisation phénotypique du double mutant *hmal/paa1* ont consisté à comparer sa croissance avec celles des simples mutants *hmal* et *paa1* et des plantes sauvages d'écotypes Col et Ws. Le double mutant possède en effet un fond génétique "mixte" puisqu'il est issu du croisement de mutants d'écotypes différents.

Afin de déterminer l'impact de la concentration en cuivre présent dans le milieu de culture sur la croissance de ces six lignées et en particulier du double mutant *hmal/paa1*, nous avons utilisé un milieu MS contenant du saccharose non supplémenté en cuivre (Figure 33, A, Cu 0,1 μM) et un milieu MS supplémenté en cuivre (Figure 33, B, Cu 5 μM). La figure 33 montre que l'ajout de cuivre dans le milieu de culture n'a pas d'impact sur la croissance des plantes WT, ni sur celle du mutant *hmal*. En revanche, sur un milieu MS standard, le mutant *paa1* et les doubles mutants *hmal/paa1* présentent un retard de croissance très prononcé par rapport aux plantes sauvages et au mutant *hmal*. Ce retard de croissance est partiellement supprimé par l'apport de cuivre 5 μM dans le milieu de culture (Figure 33, B). Sans ajout de cuivre dans le milieu, le mutant *paa1* et les doubles mutants *hmal/paa1* présentent aussi une photosensibilité pour des intensités lumineuses supérieures à 50 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$ (au delà de ce seuil, les plantules meurent).

Dans ces conditions, la croissance des doubles mutants *hmal/paa1* est semblable à celle du simple mutant *paa1*. La suppression du phénotype du mutant *paa1* par ajout de cuivre dans le milieu de culture a été décrite par Abdel-Ghany et collaborateurs (2005). Les auteurs ont conclu qu'il existait une seconde voie d'import de cuivre dans le chloroplaste (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Cette deuxième voie pourrait correspondre à HMA1, la deuxième ATPase à cuivre associée à l'enveloppe des chloroplastes (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Nous démontrons ici, que lorsque les deux voies d'import du cuivre dans les plastes (voies dépendantes des protéines HMA1 et PAA1) sont affectées, ce n'est pas létal pour la plante. De plus, bien que la croissance de ces plantes soit très affectée, l'ajout de cuivre dans le milieu

peut partiellement "sauver" ces doubles mutants *hmal/paal*. En d'autres termes, ces résultats démontrent qu'il existe dans l'enveloppe des chloroplastes, une troisième voie d'import de cuivre, voie encore non caractérisée à ce jour.



WT Ws	WT Col
Double KO 31B-33	Double KO 136-23
KO <i>hmal</i>	KO <i>paal</i>

Figure 33 : Le double mutant *hmal-paal* est viable et se comporte comme le simple mutant *paal* sur un milieu contenant du saccharose.

Des plantes de type WT d'écotype Col et WS, les deux doubles mutants *hmal/paal* 31B.33 et 136.23 ainsi que les simples mutants *hmal* et *paal* ont été mis en culture sur milieu MS supplémenté avec du saccharose 0,5 % (p/v) et contenant A : du CuSO_4 0,1 μM et B : du CuSO_4 5 μM . Les photos ont été prises après 29 jours de culture sous une intensité lumineuse de 100 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$.

2. Le double mutant *paal/hmal* est plus photosensible que le simple mutant *paal*

Le mutant *paal* est photosensible mais peut se développer presque normalement en présence de cuivre dans le milieu et sous une faible intensité lumineuse. Le mutant *hmal* présente uniquement un phénotype de photosensibilité pour de fortes intensités lumineuses, qui se traduit par un blanchiment total ou partiel des feuilles. Nous avons analysé l'impact de l'intensité lumineuse sur la croissance du double mutant *hmal/paal*. Afin de permettre un développement optimal du mutant *paal* et du double mutant *hmal/paal*, du cuivre en concentration supérieure ou égale à 5 μM a été ajouté au milieu de culture.

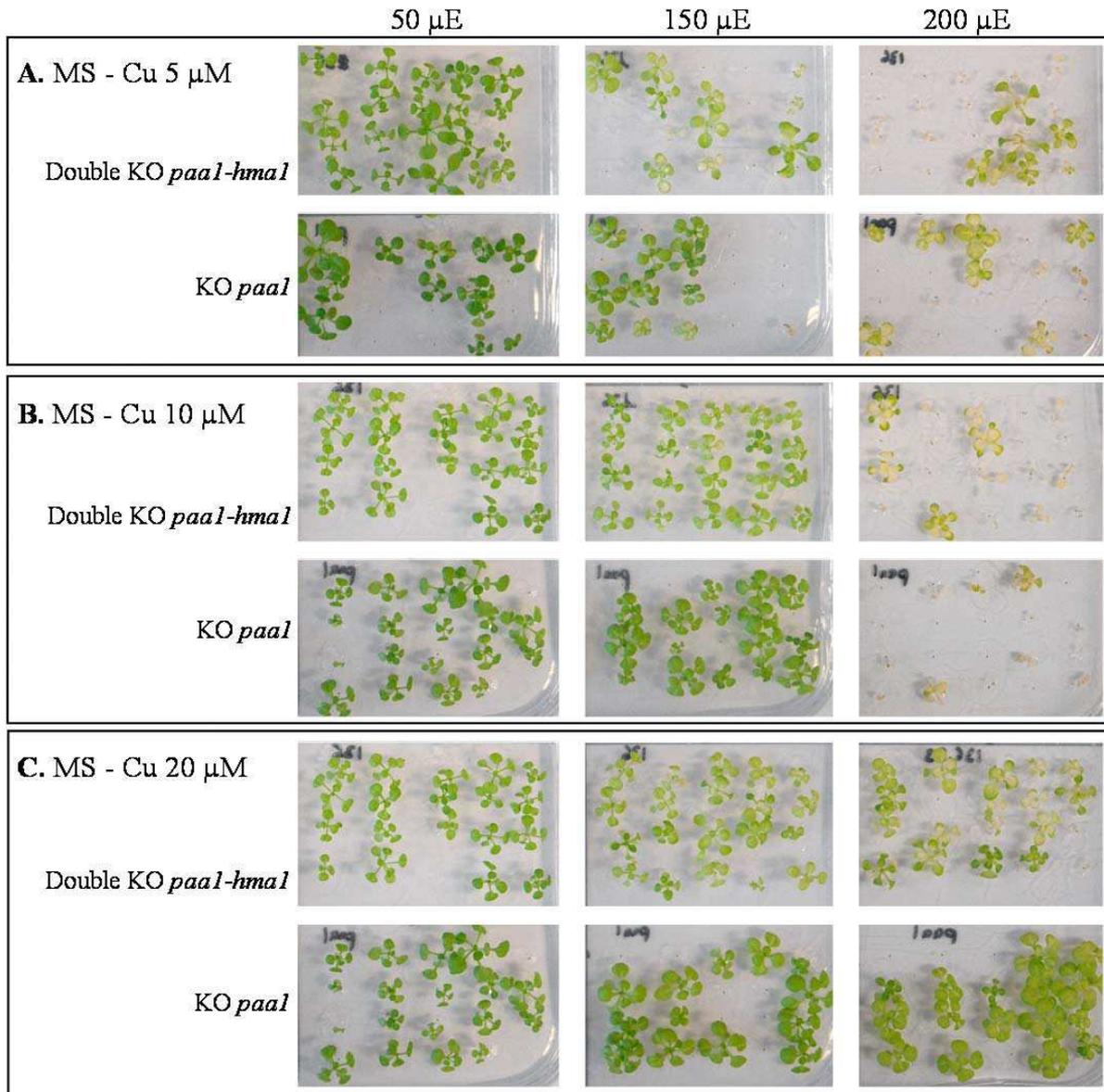


Figure 34 : Le double mutant *hma1/paal* est plus photosensible que le mutant *paal*.

Des graines issues du double mutant *hma1/paal* (lignée 136.23) et du simple mutant *paal* sont mises en culture sur du milieu MS contenant du saccharose 0,5 % (p/v) et différentes concentrations de cuivre (A : CuSO₄ 5 μ M ; B : CuSO₄ 10 μ M ; C : CuSO₄ 20 μ M). Les photos ont été prises après 21 jours de culture sous une intensité lumineuse de 50, 150 et 200 μ moles de photons / sec / m².

L'ajout de 5 et 10 μ M de cuivre dans le milieu de culture permet au double mutant *hma1/paal* et au mutant *paal* de se développer pour des intensités lumineuses allant jusqu'à 150 μ moles photons /sec / m² (Figure 34, colonnes 50 et 150 μ E). Une concentration de cuivre plus importante (20 μ M) est toutefois nécessaire pour que ces mutants puissent se développer en lumière plus forte (200 μ moles photons /sec / m²). Ces résultats indiquent que la suppression du phénotype de photosensibilité est dépendante de la quantité de cuivre présent dans le milieu, mais qu'elle n'est pas totale, en particulier lorsque l'activité photosynthétique augmente (à 200 μ moles photons / sec / m²).

En présence de 5 μM de cuivre et sous une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{moles photons / sec / m}^2$, le double mutant *hmal/paal* se développe comme le mutant *paal* (Figure 34, A.). Lorsque les plantes sont placées sous une intensité lumineuse plus forte (150 $\mu\text{moles photons / sec / m}^2$), le double mutant *hmal/paal* semble présenter un blanchiment de ses feuilles. La différence de phénotype n'est plus visible lorsque les plantes sont placées sous une intensité lumineuse de 200 $\mu\text{moles photons / sec / m}^2$, car les deux lignées sont très fortement affectées. La photosensibilité du double mutant *hmal/paal*, se traduisant par un blanchiment partiel des feuilles, est aussi observée lorsque les plantules se développent dans un milieu contenant 10 et 20 μM de cuivre et pour des intensités lumineuses de 150 et 200 $\mu\text{moles photons / sec / m}^2$ (Figure 34, B. et C.).

Ces résultats indiquent probablement un effet cumulatif de la perte de fonction de HMA1 et de PAA1. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle ces deux protéines ont des rôles complémentaires dans la cellule. Elles suggèrent aussi que la troisième voie d'import du cuivre dans le chloroplaste utilise probablement un transporteur de faible affinité pour le cuivre qui ne peut compléter la perte de HMA1 et PAA1 seulement en condition de faible intensité lumineuse et en présence de fortes concentrations en cuivre dans le milieu.

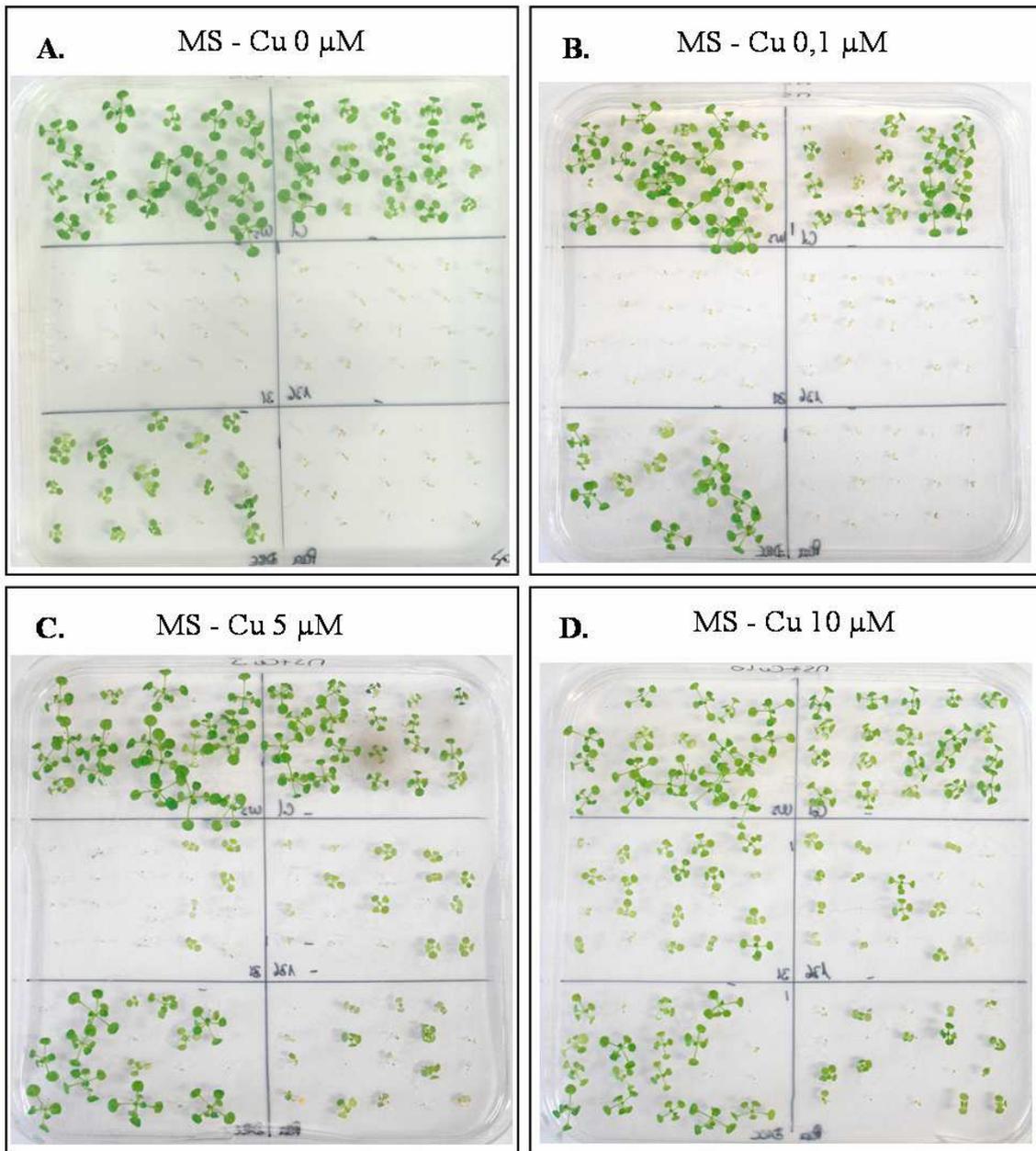
3. Croissance du double mutant *hmal/paal* en condition photoautotrophe

Les conditions de culture photoautotrophes ont permis de révéler un phénotype associé à la perte de HMA1 (Figure 29). Nous avons donc analysé la croissance des doubles mutants *hmal/paal* dans ces mêmes conditions.

Dans ces conditions de culture, les deux lignées de plantes WT (écotypes Col et WS) ont une croissance comparable quel que soit le milieu (Figure 35). Comme décrit précédemment, le mutant *hmal* présente un jaunissement des feuilles et un retard de croissance par rapport aux plantes WT en absence de cuivre dans le milieu (Figures 29 et 35 A.). Ce phénotype est supprimé par l'ajout de cuivre dans le milieu de culture et le mutant *hmal* présente une croissance similaire aux plantes WT lorsque du cuivre (5 et 10 μM) est ajouté au milieu de culture.

Les deux lignées du double mutant *hmal/paal*, tout comme le simple mutant *paal* ne sont pas viables sur milieu MS dépourvu de saccharose contenant une concentration en cuivre inférieure ou égale à 0,1 μM (Figure 35 A et B). Lorsque du CuSO_4 (5 μM ou 10 μM) est ajouté au milieu de culture, le phénotype de ces trois lignées est partiellement supprimé. Les plantules sont viables mais présentent un retard de croissance par rapport aux lignées sauvages.

La photosensibilité de ces différentes lignées n'a pu être testée en condition photoautotrophe car les plantules meurent dès qu'elles sont cultivées sous une intensité lumineuse supérieure à 100 $\mu\text{moles photons / sec / m}^2$ (non montré).



WT WS	WT Col
Double KO 31B-33	Double KO 136-23
KO <i>hmal</i>	KO <i>paal</i>

Figure 35 : Le double mutant *hmal/paal* présente un phénotype similaire au mutant *paal* lorsqu'il est cultivé en condition autotrophe

Des plantes de type WT (écotypes Col et WS), les deux doubles mutants *hmal/paal* 31B.33 et 136.23 ainsi que les simples mutants *hmal* et *paal* sont mis en culture sur milieu MS dépourvu de saccharose et contenant différentes concentrations de cuivre : A, CuSO_4 0 μM ; B, CuSO_4 0,1 μM , C : CuSO_4 5 μM et D, CuSO_4 10 μM . Les photos ont été prises après 21 jours de culture sous une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$.

Ces résultats indiquent qu'en condition photoautotrophe et en présence de faibles concentrations en cuivre, la troisième voie d'import du cuivre dans le chloroplaste n'est pas fonctionnelle. Dans ces conditions, seules HMA1 et PAA1 peuvent importer du cuivre dans le chloroplaste pour garantir le fonctionnement de la photosynthèse et donc le développement de

la plante en condition photoautotrophe. La troisième voie d'import du cuivre pourrait donc dépendre d'un transporteur de basse affinité pour le cuivre (suppression partielle du phénotype en présence de concentration en cuivre supérieure à 5 μM). En condition de fortes intensités lumineuses, l'utilisation d'une concentration en cuivre élevée ne permet pas non plus de compléter le double mutant *hmal-paal*. Cela suggère que dans ces conditions, la troisième voie d'import du cuivre est limitante et ne peut pas fournir suffisamment de cuivre pour garantir le fonctionnement de la chaîne de transfert d'électron et la détoxification des ROS produits en forte lumière.

D. Conclusion

Le double mutant *hmal/paal* a pu être obtenu et contre toute attente, il est viable. La caractérisation de son phénotype indique que sa croissance est très similaire à celle du mutant *paal* et qu'il existe très probablement une troisième voie, encore non caractérisée, pour l'import du cuivre dans le chloroplaste.

Abdel-Ghany et collaborateurs ainsi que Shikanai et collaborateurs (Shikanai *et al.*, 2003 ; Abdel-Ghany *et al.*, 2006) ont observé que le phénotype du mutant *paal* peut être supprimé lorsque l'on augmente la concentration en cuivre dans le milieu de culture. La suppression de ce phénotype est liée la formation d'holo-plastocyanine et de holo-SOD Cu/Zn attestant qu'une plus grande quantité de cuivre est présente dans le chloroplaste. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse qu'il existait deux transporteurs de cuivre dans l'enveloppe du chloroplaste. En 2006, les résultats obtenus lors de la caractérisation de HMA1 ont permis de proposer que cette protéine est le deuxième transporteur de cuivre associé à l'enveloppe du chloroplaste mais aussi un bon candidat pour expliquer la suppression du phénotype de *paal* (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006).

Le double mutant *hmal/paal* présente un phénotype très similaire à celui du mutant *paal* suggérant que HMA1 n'est pas le transporteur impliqué dans la suppression du phénotype de ces deux lignées. En effet, si tel était le cas, le phénotype du double mutant ne pourrait être supprimé par ajout de cuivre dans le milieu de culture.

Il existe donc une troisième voie d'import de cuivre encore non caractérisée dans le chloroplaste. L'enveloppe des plastes contient un très grand nombre de protéines dont la fonction est inconnue (Ferro *et al.*, 2002 ; Ferro *et al.*, 2003 ; Ferro *et al.*, *Soumis*). Parmi les protéines de l'enveloppe déjà caractérisées, PIC1 qui est impliquée dans le transport du fer, pourrait être un candidat pour ce troisième transporteur de cuivre. En effet, Duy et collaborateurs ont montré que l'expression de cette protéine pouvait supprimer la perte de fonction de CTR1, un transporteur de cuivre présent chez la levure (Duy *et al.*, 2007). Nos expériences suggèrent aussi que ce troisième transporteur aurait une faible affinité pour le cuivre. Ceci est cohérent avec l'hypothèse qu'un transporteur de métal, autre que le cuivre, puisse dans certaines conditions extrêmes, transporter du cuivre à la place de son substrat

naturel. La faible affinité pour le cuivre permettrait à cette protéine PIC1 de transporter en priorité son substrat spécifique.

En présence de cuivre dans le milieu de culture, le double mutant *hmal-paal* présente un phénotype de photosensibilité (dès 150 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$) qui se traduit par un blanchissement partiel ou total des feuilles. Ce phénotype n'est pas observé pour le mutant *paal* et correspond au phénotype déjà observé chez le mutant *hmal* pour des intensités lumineuses supérieures à 280 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$. Ces observations suggèrent que le phénotype du mutant *hmal* se cumule au phénotype du mutant *paal*. La photosensibilité est observée pour des intensités lumineuses plus faibles dans le cas du double mutant *hmal-paal*. Ceci est probablement dû à la carence en cuivre plus importante dans ces lignées. Ces informations suggèrent des rôles complémentaires pour HMA1 et PAA1.

Nous avons aussi noté que ce phénotype est plus marqué pour la lignée double mutante 31B.33 issue des plantules de génotype hh/pP. Les doubles mutants résultant d'un croisement entre un mutant issu de l'écotype WS et un mutant issu de l'écotype Col, il est possible que ces deux lignées n'aient pas le même fond génétique et ne se comportent donc pas de façon tout à fait similaire. En effet, Schiavon et collaborateurs (2007) ont montré que l'écotype Col est plus sensible au cuivre que l'écotype WS. Ces auteurs mettent aussi en évidence des différences d'expression de certains gènes liés à l'homéostasie du cuivre entre les deux écotypes. Par exemple, le gène codant pour *ATX1*, une chaperonne à cuivre cytosolique est surexprimé lorsque l'écotype Col est placée dans un milieu riche en cuivre alors qu'il est réprimé dans l'écotype WS (Schiavon *et al.*, 2007). Cela indique que les mécanismes de contrôle de l'homéostasie du cuivre entre ces deux écotypes sont sensiblement différents. Le brassage génétique entre ces deux écotypes peut donc induire des variations dans la régulation de l'homéostasie du cuivre.

La caractérisation du double mutant *hmal-paal* va être poursuivie par l'analyse des réponses transcriptionnelles de gènes liés à l'homéostasie du cuivre ainsi que par le dosage de métaux dans les feuilles et les chloroplastes de ces plantes.

IV. IMPACT DE LA SUREXPRESSION DE HMA1 DANS UN FOND GENETIQUE MUTANT PAA1

Afin de déterminer si HMA1 présente des redondances fonctionnelles avec PAA1, nous avons cherché à savoir si HMA1 était capable de compenser la perte de fonction de PAA1 *in planta*. Pour cela, nous avons surexprimé HMA1 sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort dans le mutant *paal-1*. S'il y a une redondance fonctionnelle entre les deux protéines, il était attendu que le phénotype de photosensibilité de *paal* puisse être partiellement supprimé par la surexpression de HMA1.

Comme le démontrent les résultats obtenus en système hétérologue levure, HMA1 possède une domaine N-terminal riche en histidines potentiellement impliqué dans la régulation de

l'enzyme (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Mana-Capelli et collaborateurs ont démontré que le domaine *N*-terminal riche en histidines de CopB a un rôle de régulation de l'enzyme. En effet, cette ATPase d'*Archaeoglobus fulgidus* est affectée dans sa déphosphorylation lorsque son N-MBD est manquant (Mana-Capelli *et al.*, 2003). La surexpression de HMA1 dépourvue de cette séquence *in planta* pourrait nous permettre de mieux comprendre le fonctionnement de ce domaine riche en histidines. Pour ces raisons, nous avons surexprimé deux formes de HMA1 dans le mutant *paal* : la forme entière de HMA1 et une forme dépourvue de sa séquence riche en histidines appelée HMA1 Δ HIS.

A. Obtention de surexpresseurs homozygotes

Les ADNc codant pour la protéine HMA1 avec sa séquence de transit chloroplastique et une forme dépourvue de sa séquence riche en histidines (délétion des acides aminés 69 à 89) ont été insérés dans un vecteur adapté à la surexpression de protéines *in planta* sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (double promoteur 35S).

Le mutant *paal-1* a été transformé par *Agrobacterium tumefaciens*. Le marqueur de sélection associé à l'insertion du vecteur était la GFP (codée par un gène positionné dans le vecteur, et exprimée sous la dépendance d'un promoteur exprimé essentiellement dans la graine). Après transformation des plantes et récolte des graines, les graines transgéniques ont été sélectionnées grâce à la fluorescence de la GFP. Afin de sélectionner les plantes surexprimant HMA1, des immunomarquages ont été réalisés sur des extraits de protéines membranaires issus des feuilles de ces plantes.

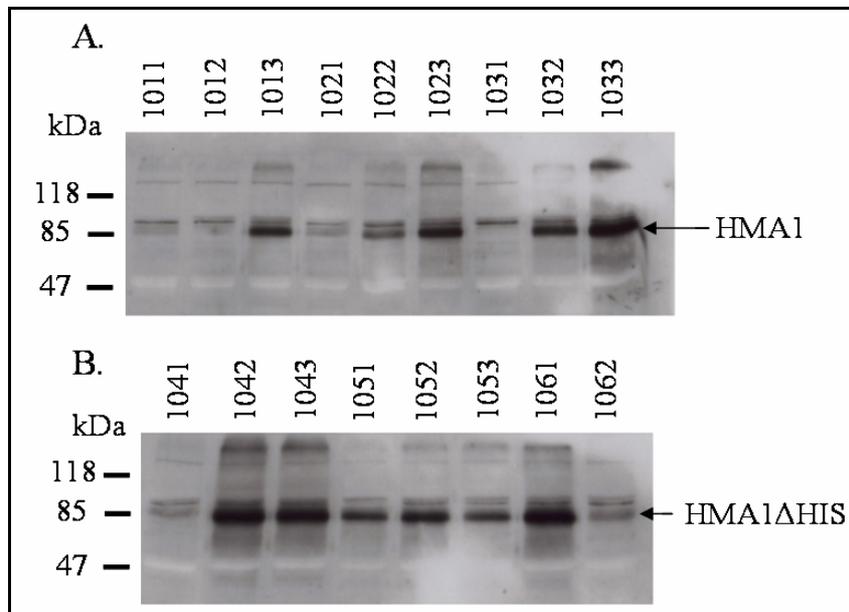


Figure 36 : Analyse de l'expression de HMA1 et HMA1 Δ HIS dans les mutants *paal.1*.

Les protéines membranaires issues de différentes lignées de mutant *paal* transformées par un vecteur d'expression contenant l'ADNc codant pour HMA1 (A) ou HMA1 Δ HIS (B) sont séparées par SDS-PAGE. La présence des protéines HMA1 et HMA1 Δ HIS est révélée par immunomarquage à l'aide de l'anticorps dirigé contre HMA1 (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006).

Comme indiqué dans la figure 36, plusieurs lignées (1013, 1023, 1032 et 1033) ont été obtenues qui surexpriment fortement HMA1 (Figure 36, A.). Les lignées 1023 et 1032 ont été sélectionnées pour la suite des expériences. Pour les plantes transformées par un plasmide codant pour HMA1 Δ HIS sous le contrôle du promoteur 35S, toutes les lignées analysées, à l'exception de la lignée 1041, surexpriment cette forme mutée de HMA1 (Figure 36, B.). Les plantes 1042 et 1043 ont été choisies pour la suite des expériences.

Afin de valider qu'une seule insertion s'est produite lors de la transformation des plantes, des tests de ségrégation ont été réalisés sur les graines issues des plantes sélectionnées. Pour les quatre lignées de plantes choisies, le test de ségrégation réalisé sur 50 graines indique qu'un seul événement d'insertion du transgène s'est produit. Des lignées homozygotes ont ensuite été identifiées dans la descendance des plantes sélectionnées. Les expériences suivantes ont été réalisées avec les lignées 1023-4, 1032-4, 1042-5 et 1043-7 qui sont toutes homozygotes pour leur insertion (produisent 100 % de graines fluorescentes).

B. Phénotype des surexpresseurs HMA1 et HMA1 Δ HIS dans *paa1*

Afin de déterminer si les surexpressions de HMA1 ou de HMA1 Δ HIS permettent de compenser le phénotype lié à la perte de fonction de PAA1, nous avons analysé le phénotype de ces lignées dans différentes conditions de culture.

Comme cela a déjà été observé précédemment, le phénotype de retard de croissance du mutant *paa1* par rapport à des plantes sauvages est supprimé après ajout de cuivre dans le milieu de culture (Figure 37, A. et B.).

La surexpression de HMA1 ou de HMA1 Δ HIS dans le mutant *paa1* ne permet pas de supprimer le phénotype induit par la perte de fonction de PAA1, lorsque les plantes sont cultivées dans un milieu MS standard et **en faible intensité lumineuse** (Figure 37, A.). En effet, les plantes qui surexpriment les deux formes de HMA1 présentent la même morphologie et la même croissance que le mutant *paa1*. Aucune différence n'est visible entre ces lignées lorsque du cuivre est ajouté dans le milieu de culture, sous une intensité lumineuse de 50 μ moles de photons / sec / m². Comme observé pour le mutant *paa1*, le cuivre supprime le retard de croissance des lignées KO *paa1* x 35S HMA1 et KO *paa1* x 35S HMA1 Δ HIS (Figure 37, B.).

Lorsque ces plantes sont cultivées sous **une intensité lumineuse plus forte** et sur un milieu contenant du cuivre 2 μ M (Figure 37, C.), des différences importantes sont observées entre les différentes lignées. En effet, les plantes sauvages, le mutant *paa1* ainsi qu'une des deux lignées mutantes *paa1* exprimant la forme complète de HMA1 (Figure 37, C. #4) se développent de la même manière. En revanche, les trois autres lignées présentent un phénotype de photosensibilité très prononcé (Figure 37, C.).

La différence de phénotype entre les deux lignées KO *paa1* x 35 HMA1 étant inattendue, nous avons vérifié le **niveau d'expression de HMA1** dans ces plantes par immunomarquage.

Comme attendu, les lignées sauvages et le mutant *paal* expriment peu HMA1. De façon surprenante, la lignée KO *paal* x 35S HMA1 (Figure 37, D. #4 ; lignée 1032-4) présente aussi un signal d'immunomarquage faible indiquant que HMA1 est très peu surexprimée. Ce résultat est surprenant car cette lignée homozygote est issue d'une plante hétérozygote qui surexprime fortement HMA1 (Figure 37). Il est possible que dans la lignée homozygote, la surexpression de HMA1 ait induit une réponse de la plante par ARN interférent (Mourrain *et al.*, 2000). Les trois autres lignées (Figure 37, D. #3, #6, #7 correspondant respectivement aux lignées 1023-4, 1042-5 et 1043-7) expriment fortement HMA1 et plus particulièrement les lignées surexprimant HMA1 Δ HIS. La protéine LHCP (Light Harvesting Chlorophyll Protein) a été utilisée comme contrôle de charge. L'immunomarquage indique qu'une quantité équivalente de LHCP est présente dans les différentes fractions analysées. Nous pouvons donc conclure que le phénotype de photosensibilité observé est lié au niveau de surexpression de HMA1.

Ces résultats sont inattendus car nous supposons que la surexpression de HMA1 dans des mutants *paal* permettrait de supprimer le phénotype induit par la perte de fonction de PAA1 or nous observons le contraire : la surexpression de HMA1 amplifie la photosensibilité du mutant *paal*. La surexpression de HMA1 dépourvue de son domaine riche en histidines dans le fond génétique mutant *paal* induit le même phénotype que la surexpression de la forme entière de HMA1. Ceci indique que la protéine HMA1 Δ HIS se comporte de la même manière que HMA1, et donc que le domaine riche en histidines n'est pas essentiel pour l'activité de la protéine.

Le phénotype de photosensibilité des différentes lignées mutantes *paal* surexprimant HMA1 est en accord avec le phénotype du mutant *hmal* décrit lors de travaux précédents effectués dans l'équipe (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Ce résultat est en accord avec l'existence d'un lien entre l'activité de HMA1 et l'intensité lumineuse. Nous avons aussi remarqué que plus la concentration en cuivre dans le milieu est forte, plus le phénotype de photosensibilité est prononcé (non montré) indiquant que ce phénotype est aussi lié au cuivre.

Les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a pas de redondance fonctionnelle entre HMA1 et PAA1 car plutôt que de compenser la perte de fonction de PAA1, la surexpression de HMA1 amplifie le phénotype de photosensibilité du mutant *paal*. Cette photosensibilité accrue n'est mise en évidence que sur un milieu riche en cuivre, condition permettant de supprimer le phénotype de *paal*. Des études précédentes suggèrent que HMA1 fournirait du cuivre à une métallochaperone qui n'interagirait qu'avec la SOD CSD2 (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Ainsi, le phénotype observé pourrait être provoqué par un excès de cuivre dans le chloroplaste, cuivre qui ne serait adressé qu'à la SOD CSD2. Cette SOD pourrait constituer une réserve de cuivre dans le chloroplaste (Cohu & Pilon, 2006) mais il est possible que cette protéine ne soit pas suffisante pour prendre en charge l'excès de cuivre chloroplastique induit par la surexpression de HMA1.

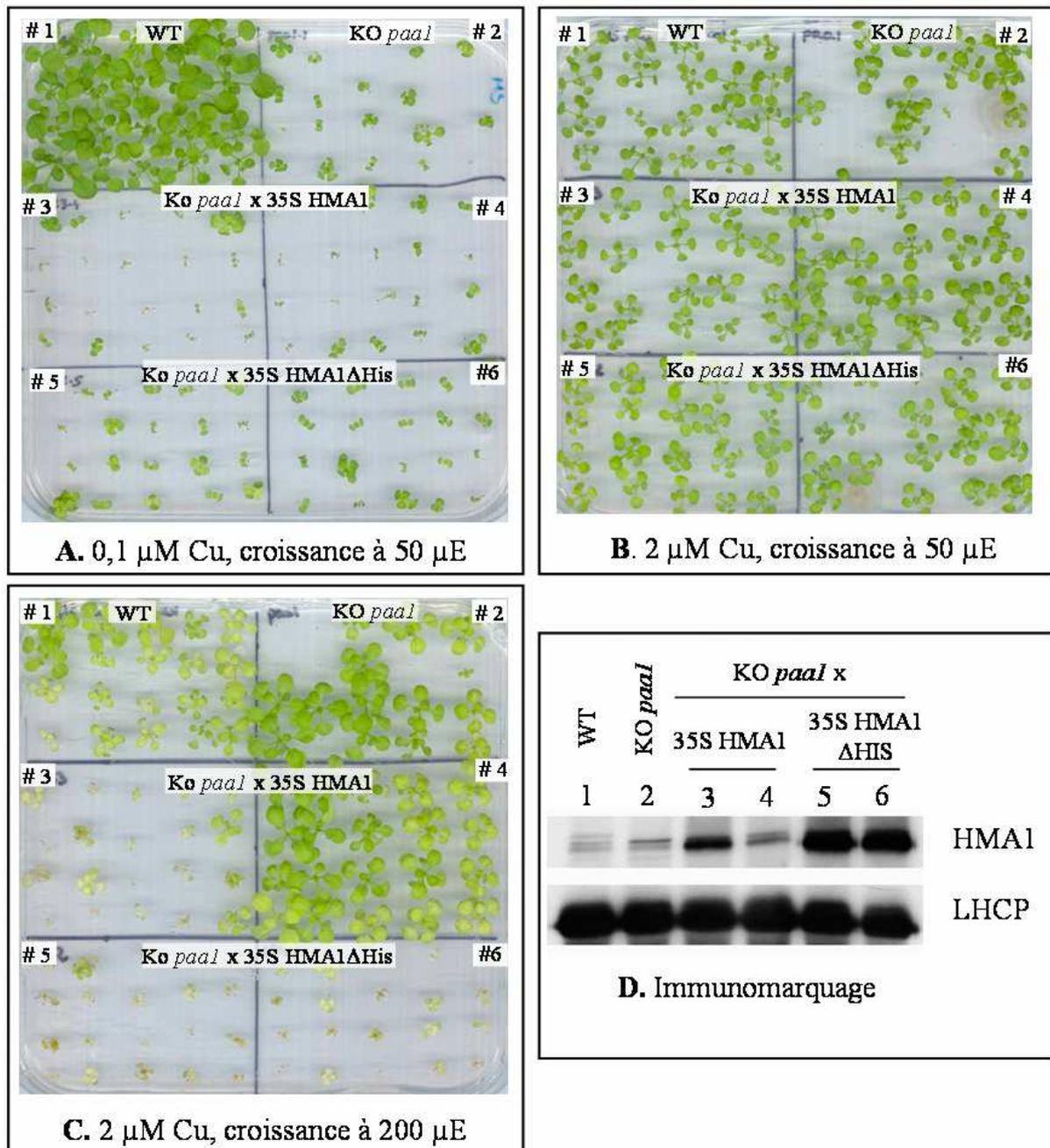


Figure 37 : Impact du cuivre et de la lumière sur la croissance les mutants *paal* surexprimant HMA1 et HMA1 Δ His.

Les graines issues de différentes lignées sont semées sur milieu MS (A) ou MS + cuivre 2 μ M (B et C). Le milieu de culture contient aussi du saccharose 0,5 % (p/v). Les plantules sont cultivées sous une intensité lumineuse de 50 μ moles de photons / sec / m² (A et B) ou 200 μ moles de photons / sec / m² (C) pendant 21 jours. 1 : WT (Col) ; 2 : KO *paal.1* ; 3 : KO *paal* x 35S HMA1 lignée 1023-4 ; 4 : KO *paal* x 35S HMA1 lignée 1032-4 ; 5 : KO *paal* x 35S HMA1 Δ HIS lignée 1042-5 ; 6 : KO *paal* x 35S HMA1 Δ HIS lignée 1043-7. Afin de vérifier le niveau d'expression de HMA1 dans les lignées de plantes utilisées pour ce test phénotypique, les protéines membranaires extraites à partir de feuilles de ces différentes lignées sont séparées (15 μ g) par SDS-PAGE et transfert sur membrane de nitrocellulose. La présence de HMA1 est révélée par un immunomarquage réalisé avec l'anticorps dirigé contre HMA1 (D). La détection de la protéine LHCP est utilisée comme contrôle de charge.

C. Dosages de métaux dans les chloroplastes des mutants *paal-1* surexprimant HMA1 et HMA1ΔHIS

La surexpression de HMA1 dans un mutant *paal* provoque une photosensibilité en présence de cuivre. Afin de déterminer si ce phénotype est lié à un excès ou au contraire à une carence en cuivre, dans le chloroplaste nous avons effectué des expériences préliminaires de dosage de métaux sur des chloroplastes purifiés à partir des différentes lignées mutantes *paal* exprimant HMA1 et HMA1ΔHIS. Les dosages ont été effectués par ICP-MS en collaboration avec Corinne Rivasseau (LPCV).

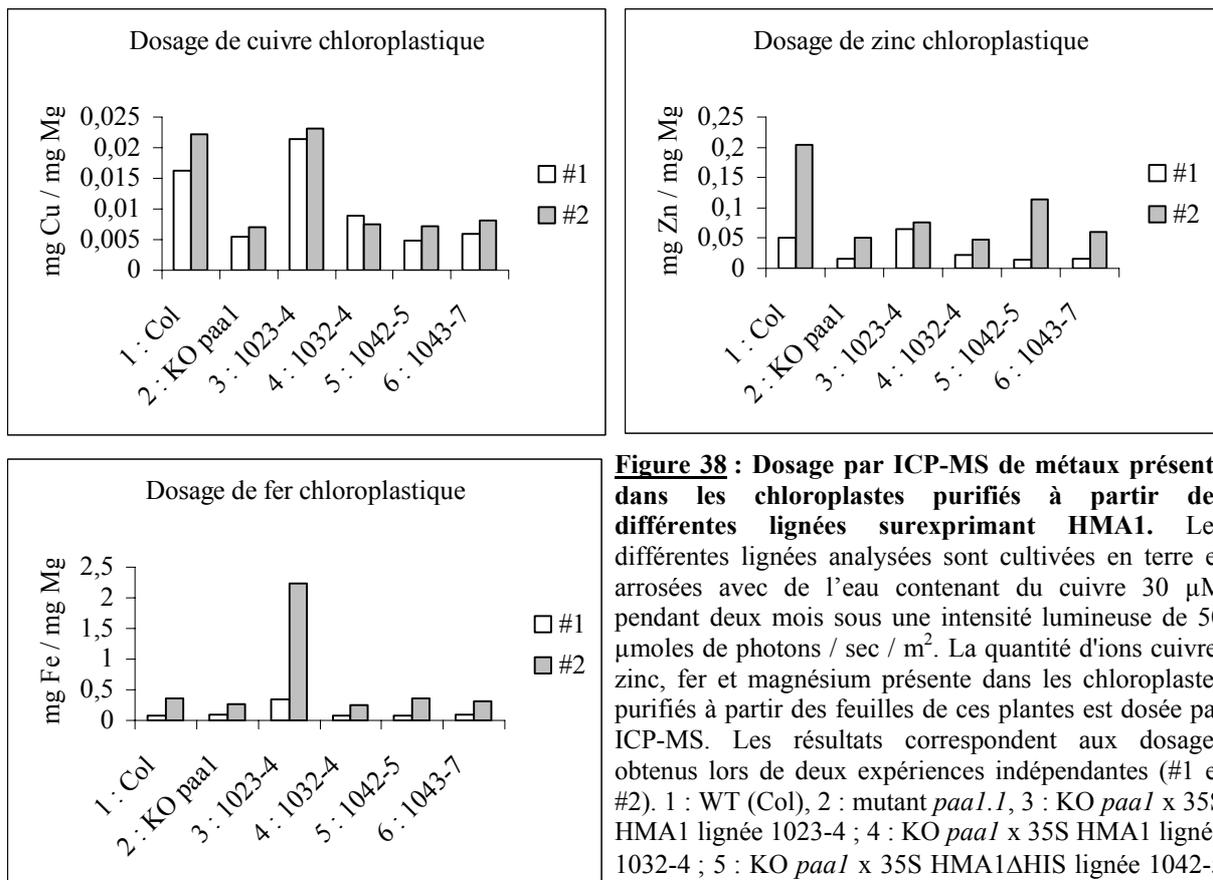


Figure 38 : Dosage par ICP-MS de métaux présents dans les chloroplastes purifiés à partir des différentes lignées surexprimant HMA1. Les différentes lignées analysées sont cultivées en terre et arrosées avec de l'eau contenant du cuivre 30 μ M pendant deux mois sous une intensité lumineuse de 50 μ moles de photons / sec / m². La quantité d'ions cuivre, zinc, fer et magnésium présente dans les chloroplastes purifiés à partir des feuilles de ces plantes est dosée par ICP-MS. Les résultats correspondent aux dosages obtenus lors de deux expériences indépendantes (#1 et #2). 1 : WT (Col), 2 : mutant *paal.1*, 3 : KO *paal* x 35S HMA1 lignée 1023-4 ; 4 : KO *paal* x 35S HMA1 lignée 1032-4 ; 5 : KO *paal* x 35S HMA1ΔHIS lignée 1042-5 ; 6 : KO *paal* x 35S HMA1ΔHIS lignée 1043-7.

Les métaux qui ont été dans les chloroplastes de ces différentes lignées sont le cuivre, le zinc, le fer et le magnésium. En effet, 1) les données bibliographiques indiquent que HMA1 pourrait transporter du cuivre et du zinc *in planta* (Kim *et al.*, 2009, Seigneurin-Berny *et al.*, 2006), 2) l'homéostasie du fer chloroplastique est liée à celle du cuivre et 3) le magnésium sert de standard interne. Nous avons vérifié que la concentration en magnésium rapportée à la quantité de chlorophylle est stable dans les différents échantillons.

Nous pouvons observer que le dosage du cuivre chloroplastique est très reproductible entre les deux expériences (Figure 38). Le mutant *paal* ainsi que les lignées KO *paal* x 35S HMA1 1032-4 et les deux lignées KO *paal* x 35SHMA1ΔHIS ont une quantité de cuivre

chloroplastique d'environ 7,5 µg / mg de magnésium. En revanche, les chloroplastes des plantes sauvages et de la lignée KO *paa1* x 35SHMA1 1023-4 présentent une quantité de cuivre deux à trois fois supérieure selon les expériences (environ 20 µg de cuivre / mg de magnésium). La diminution du cuivre chloroplastique dans le mutant *paa1* est en accord avec les données déjà disponibles dans la littérature (Shikanai *et al.*, 2003, Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Ces analyses suggèrent que **l'expression de HMA1 dans un fond génétique mutant *paa1* induit une augmentation de la quantité de cuivre chloroplastique** seulement lorsque HMA1 est fortement surexprimée. En revanche, **la surexpression de HMA1ΔHIS dans les lignées KO *paa1* n'a pas d'impact sur la concentration en cuivre chloroplastique**. Ce résultat est surprenant étant donné que ces lignées présentent le même phénotype de photosensibilité que le mutant *paa1* surexprimant HMA1. Ces données suggèrent que les phénotypes de photosensibilité observés par la surexpression de HMA1 ou HMA1ΔHIS (dans le mutant *paa1*) résultent de "mécanismes" différents. On peut noter que la quantité de cuivre chloroplastique dans la lignée surexprimant effectivement HMA1 est identique à celle d'une plante sauvage. Ainsi, la **photosensibilité observée dans cette lignée pourrait être attribué à une mauvaise distribution du cuivre chloroplastique**.

Les données obtenues pour le dosage de zinc présentées dans la figure 38 sont peu reproductibles entre les deux expériences et ne nous permettent pas d'émettre d'hypothèse sur la variation de concentration de ce métal selon les lignées.

La figure 38 montre que le contenu en fer chloroplastique est similaire dans les chloroplastes issus des lignées sauvages, du mutant *paa1*, du mutant *paa1* exprimant faiblement HMA1 ou des mutants surexprimant HMA1ΔHIS. En revanche, la lignée 1023-4 (mutant *paa1* surexprimant fortement HMA1) présente une concentration en fer chloroplastique quatre à huit fois supérieure à celle des autres lignées. Ces expériences ont été réalisées en triplicata mais seules deux de ces expériences ont permis d'obtenir des résultats similaires. A court terme, ces expériences vont être reproduites afin de valider ou d'invalidier les résultats présentés dans la figure 38.

D. Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du cuivre dans les mutants *paa1* exprimant HMA1 et HMA1ΔHIS

Afin d'analyser l'impact de la surexpression de HMA1 dans le mutant *paa1* au niveau de l'expression des gènes liés à l'homéostasie du cuivre, nous avons effectué des expériences de RT-PCR à partir d'ARNs extraits de feuilles provenant des différentes lignées étudiées. De cette manière, nous souhaitons mettre en évidence des variations de transcrits permettant de confirmer que la surexpression de HMA1 induisait une augmentation de la quantité de cuivre chloroplastique. Abdel-Ghany et collaborateurs ont observé une diminution du niveau d'expression des SOD CSD2 et CSD1 dans le mutant *paa1* (en comparaison avec une plante sauvage), lorsque les plantes sont cultivées en présence de 5 µM de cuivre (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Notre hypothèse était la suivante : **si la surexpression de HMA1 induit une**

augmentation du contenu en cuivre chloroplastique dans le mutant *paa1*, l'expression de la SOD CSD2 devrait aussi être augmentée. Nous avons donc cultivé les différentes lignées dans les mêmes conditions que celles décrites par Abdel-Ghany et collaborateurs, c'est à dire sur un milieu MS contenant du saccharose 1 % (p/v) et 5 μ M de cuivre, sous une intensité lumineuse de 100 μ moles de photons / sec / m² (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Dans ces conditions, la croissance de toutes les lignées de plantes était similaire (non montré).

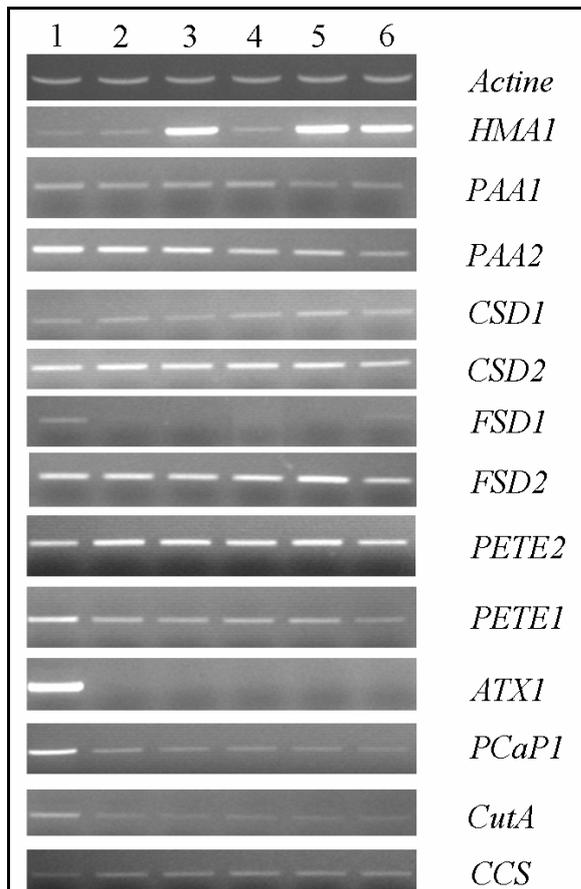


Figure 39 : Analyse de l'expression de gènes liés à l'homéostasie du cuivre par RT-PCR.

Les PCR sont réalisées sur les ADNc provenant de feuilles de différentes lignées.

1 : WT ;

2 : mutant *paa1* ;

3 : KO *paa1* x 35S HMA1 lignée 1023-4 ;

4 : KO *paa1* x 35S HMA1 lignée 1032-4 ;

5 : KO *paa1* x 35S HMA1 Δ HIS lignée 1042-5 ;

6 : KO *paa1* x 35S HMA1 Δ HIS lignée 1043-7.

Les plantes ont été cultivées sur milieu MS contenant du saccharose 1 % (p/v) supplémenté avec du cuivre (5 μ M), et sous une intensité lumineuse de 50 μ moles de photons / sec / m². L'ADNc codant l'actine 2 sert de contrôle de charge. Ces amplifications ont été réalisées en triplicata.

Les résultats présentés dans la figure 36 indiquent que **l'accumulation de la protéine HMA1** dans les lignées 1023-4, 1042-5 et 1043-7 (Figures 39 3, 5 et 6 respectivement) **est effectivement corrélé à une forte augmentation du transcrit *HMA1*.**

Aucune variation d'expression des transcrits *PAA1*, *CSD1*, *CSD2*, *CCS* et *FSD2* n'est observée dans les différentes lignées. **Contrairement aux observations faites par Abdel-Ghany et collaborateurs, l'expression de *CSD1* et de *CSD2* est similaire dans les mutants *paa1* et les plantes sauvages.** Nos conditions de culture étant similaires, ces différences sont inexplicables pour l'instant. **L'impact de la surexpression de HMA1 sur le contenu en cuivre ne peut donc pas être visualisé en étudiant les variations d'expression de ces SOD dans nos expériences.**

Une légère diminution du niveau de transcrits *FSD1* (une des SOD à fer chloroplastiques) est observée dans toutes les lignées dépourvues de PAA1 (lignées 2 à 6). Ce résultat est surprenant car l'expression de *FSD1* est régulée négativement par le cuivre.

La figure 39 montre aussi que l'expression de *PAA2* est légèrement plus faible dans la lignée KO *paa1* x 35SHMA1 1032-4 et les lignées KO *paa1* x 35SHMA1 Δ HIS 1042-5 et 1043-7 (Figure 39, 4, 5 et 6). Cette diminution n'est pas corrélée avec le niveau de surexpression de *HMA1* et ne peut être expliquée avec les données dont nous disposons actuellement.

Il existe deux isoformes de plastocyanine codées par les gènes *PETE1* et *PETE2*. La figure 39 montre aussi une faible diminution de l'expression de *PETE1* et inversement une faible augmentation de l'expression de *PETE2* dans toutes les lignées par rapport à l'expression de ces isoformes dans la plante sauvage. Ces résultats ne sont pas en accord avec des données récentes qui montrent que *PETE2* est accumulée en présence de cuivre et que *PETE1* n'est pas affecté par la concentration en cuivre (Abdel-Ghany *et al.*, 2009).

Une diminution des transcrits *ATX1*, *CutA* et *PCaP1* est observée dans les plantes dépourvues de PAA1, indépendamment du niveau de transcription de HMA1. *ATX1* est une métallochaperonne à cuivre cytoplasmique interagissant probablement avec HMA5 et RAN1 (ou HMA7), deux ATPases à cuivre de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique. La diminution d'expression d'*ATX1*, si elle est corrélée à une diminution de la quantité de protéine, pourrait permettre de diriger les flux de cuivre vers le chloroplaste plutôt que vers l'extérieur de la cellule ou le réticulum endoplasmique afin de remédier à la carence en cuivre induite par la perte de fonction de PAA1.

CutA et *PCaP1* sont deux métallochaperonnes à cuivre potentielles. *CutA* est localisée dans l'espace intermembranaire de l'enveloppe (Burkhead *et al.*, 2003). Sa fonction et ses partenaires sont encore inconnus. Si la diminution du transcrit *CutA* est corrélée à une diminution de l'expression de la protéine, on peut imaginer que *CutA* serait la métallochaperone interagissant avec PAA1 pour fournir le cuivre à PAA2. *PCaP1* est une protéine associée à la membrane plasmique pouvant lier du cuivre et est très fortement transcrite lorsque du cuivre est ajouté dans le milieu de culture (Ide *et al.*, 2007). Des données récentes de protéomique obtenues au laboratoire (Ferro *et al.*, soumis) montrent que *PCaP1* a été aussi identifiée dans l'enveloppe des chloroplastes. Si la présence de cette protéine dans l'enveloppe ne résulte pas d'une contamination croisée des fractions d'enveloppe purifiée par la membrane plasmique, cette protéine *PCaP1* pourrait être une métallochaperonne qui fournit de cuivre à PAA1 et/ou HMA1.

Ces analyses n'ont pas révélé de corrélation entre la surexpression de HMA1 (au niveau transcrit et protéique) et la variation d'expression de gènes liés à l'homéostasie du cuivre. La surexpression de HMA1 dans un fond génétique mutant *paa1* entraîne une toxicité en présence de fortes intensités lumineuses. Ainsi, il serait intéressant de reproduire ces

expériences à partir d'ADNc extraits à partir de plantes cultivées dans les conditions induisant ce phénotype de photosensibilité.

E. Conclusion

La surexpression de HMA1 ou de HMA1 Δ HIS dans le mutant *paal-1* ne permet pas de supprimer son phénotype de retard de croissance et de photosensibilité dans un milieu pauvre en cuivre. Tout comme le mutant *paal*, l'ajout de cuivre dans le milieu de culture permet de compléter le phénotype de ces lignées, en présence de faible intensité lumineuse (Figure 37). Cependant, lorsque ces mutants *paal-1* exprimant fortement HMA1 sont cultivés sous une intensité lumineuse élevée, ils montrent un **phénotype très prononcé de photosensibilité lié au niveau d'expression de HMA1**.

Les mutants *paal* ont un contenu en cuivre chloroplastique réduit, et la **surexpression de HMA1 dans ces lignées permet de retrouver des quantités de cuivre comparables à celles obtenues dans les chloroplastes de plantes sauvages**. Ces plantes étant toujours photosensibles, cela signifie que **le cuivre importé par HMA1 n'est pas utilisé pour alimenter la plastocyanine via PAA2**. Si HMA1 est impliquée dans la délivrance du cuivre spécifiquement à CSD2, il est possible que la protéine CSD2 ne soit pas présente en quantité suffisante pour garantir la chélation de l'ensemble du pool de cuivre importé et que cet excès devient toxique. Nous observons aussi une **augmentation de fer chloroplastique dans cette lignée**. Elle pourrait résulter d'une **activation des SOD à fer pour répondre au stress oxydatif généré par l'excès de cuivre dans le chloroplaste**. Cette activation se ferait au niveau protéique car nous n'avons pas observé de variation des transcrits *FSD1* et *FSD2* (cependant nous n'avons pas analysé l'expression de *FSD3*).

La **surexpression de HMA1 Δ HIS dans le mutant *paal* n'induit pas d'augmentation de la concentration en cuivre et fer chloroplastiques** (culture en terre pour extraire les chloroplastes) **alors qu'elle entraîne un phénotype de photosensibilité très prononcé** (cultures sur boîtes). Il est possible que les conditions de culture *in vitro* ou en terre aient un impact sur ces différences de résultats. En effet, les expériences réalisées en système hétérologue levure avaient montré que la délétion du domaine riche en histidine n'inactive pas la protéine mais diminue fortement son affinité apparente pour le cuivre. Les dosages de métaux ayant été réalisés à partir de plantes cultivées en terre, il est possible que dans ces conditions la concentration en cuivre disponible dans le milieu soit trop faible pour permettre le fonctionnement de la protéine HMA1 Δ HIS.

La **surexpression de HMA1 et HMA1 Δ HIS dans les KO *paal* n'a pas d'impact sur la transcription des gènes impliqués dans l'homéostasie du cuivre** dans nos conditions expérimentales. Ceci est étonnant dans le cas de la **lignée 1023-4 qui surexprime HMA1 et dont le contenu en cuivre chloroplastique est identique à celui d'une plante sauvage**. La surexpression de HMA1 ne restaure pas le niveau de transcription des gènes *FSD1*, *ATX1*,

PCaPI et *CutA* suggérant que ces gènes ne sont pas régulés par la concentration en cuivre chloroplastique.

Au bilan, ces résultats suggèrent que les mécanismes d'adressage du cuivre chloroplastique sont extrêmement contrôlés et que **HMA1 ne présente pas de redondance fonctionnelle avec PAA1 car le cuivre qu'elle transporte ne peut être adressé à PAA2**. Ces deux ATPases ont donc des fonctions bien distinctes qui justifient la présence de ces deux protéines au sein de l'enveloppe du chloroplaste.

V. CONCLUSION - DISCUSSION

A. Une nouvelle fonction pour HMA1

La recherche de nouvelles fonctions associées à HMA1 *in planta*, nous a permis de mettre en évidence que **HMA1 pourrait avoir un rôle dans la réponse à un stress salin lors de la germination**. Un stress salin pouvant induire un stress oxydant, l'implication de HMA1 serait liée à sa capacité à fournir du cuivre à CSD2, protéine impliquée dans la détoxification des ROS produits lors de stress oxydatifs. HMA1 est principalement exprimée au niveau des parties aériennes (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006) mais aussi au niveau des tiges et des racines (Kim *et al.*, 2009). Nous n'avons pas analysé l'expression de HMA1 dans la graine. Quant aux SOD, elles sont présentes dans les racines mais aucune donnée ne mentionne leur expression dans la graine. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si le défaut de germination observé est dû à une toxicité au niveau de la graine ou au niveau du développement racinaire. Pour comprendre le rôle de HMA1 lors d'un stress salin, il serait intéressant de cultiver les mutants *hma1* sur un milieu standard puis de transférer ces plantes sur un milieu riche en sels à différents stades de développement.

B. La fonction de HMA1 est liée à l'homéostasie du cuivre

D'après la littérature, HMA1 peut transporter du cuivre et du zinc *in planta* (Kim *et al.*, 2009 ; Seigneurin Berny *et al.*, 2006). Cette ATPase a longtemps été classée dans la catégorie des ATPases transportant du zinc et du cadmium sur la base d'homologies de séquences. Kim et collaborateurs ont proposé que HMA1 serait impliquée dans la détoxification du zinc chloroplastique. Ils montrent qu'un mutant *hma1*, obtenu dans un écotype Columbia, présente un phénotype de sensibilité au zinc. En nous plaçant dans les mêmes conditions de culture (concentration en zinc de 0,4 mM), nous observons que cette concentration en zinc est létale pour des plantes sauvages d'écotype Col et WS (non montré). Au cours de nos expériences, nous avons montré qu'HMA1 est impliquée dans l'homéostasie du cuivre chloroplastique dans l'écotype WS (voir figures 29 et 37). La surexpression de HMA1 dans un mutant *paal* (écotype Col) n'induit pas de résistance au zinc de ces lignées comme cela pouvait être déduit des résultats de Kim et collaborateurs (non montré). En revanche, nous avons démontré que **la**

surexpression de HMA1 dans un KO *paal* induit une accumulation de cuivre au niveau des chloroplastes.

Nous avons aussi mis en évidence des conditions pour lesquelles la perte de fonction de HMA1 induit un phénotype dépendant de la quantité de cuivre présent dans le milieu. En **condition photoautotrophe et en absence de cuivre**, le mutant *hma1* présente un **retard de croissance ainsi qu'un blanchiment des feuilles** par rapport à des plantes sauvages. Ce **phénotype est partiellement supprimé par ajout de cuivre** dans le milieu de culture. Cette suppression n'est que partielle car le mutant *hma1* est incapable de se développer lorsque l'intensité lumineuse atteint 200 $\mu\text{moles de photons / sec / m}^2$ quelle que soit la quantité de cuivre ajoutée dans le milieu. Ces résultats valident le rôle de HMA1 dans l'import du cuivre chloroplastique et sa fonction essentielle lors de stress lumineux. HMA1 est probablement impliquée dans le cycle water-water comme le proposent Higuchi et collaborateurs (2009) en délivrant du cuivre à CSD2 (Higuchi *et al.*, 2009). L'expression de HMA1 pourrait être régulée conjointement par de fortes intensités lumineuses et par la présence de cuivre dans le milieu. Si cette régulation est validée et corrélée à l'expression de la protéine, cela permettrait de fournir du cuivre à CSD2 dont l'expression est aussi régulée par la présence de cuivre dans le milieu et dont l'activité est aussi indispensable en condition de stress lumineux.

Enfin, nos expériences montrent que les **voies d'import de cuivre chloroplastique via HMA1 et PAA1 sont indépendantes et complémentaires**. HMA1 délivrerait du cuivre à une métallochaperonne qui n'interagirait qu'avec la SOD CSD2. Enfin, l'activité de HMA1 semble dépendre du contenu en cuivre chloroplastique (ou d'autres facteurs non identifiés pour l'instant) car la surexpression de cette protéine ne permet l'accumulation de cuivre chloroplastique que dans un fond génétique mutant *paal*. Cette hypothèse nécessite d'être validée par des expériences complémentaires.

C. La perte de fonction de PAA1 induit une modification profonde du contrôle de l'homéostasie du cuivre au sein de la cellule

Les données (RT-PCR) présentées dans figure 39 indiquent que la perte de fonction de PAA1 induit de profondes modifications de la transcription de gènes liés à l'homéostasie du cuivre. Abdel-Ghany et collaborateurs ont montré que la perte de PAA1 induit une augmentation de la transcription des SOD Cu/Zn par rapport une plante de type WT sur un milieu non supplémenté en cuivre (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Les résultats que nous avons obtenus ne montrent pas de différence entre la quantité de transcrits pour ces gènes entre des mutants *paal* et des plantes de type WT (Figure 39) lorsque du cuivre est ajouté dans le milieu de culture. Dans ces conditions expérimentales, Abdel-Ghany et collaborateurs indiquent que les plantes de type WT contiennent plus de transcrits CSD2 que les mutants *paal*. Sachant que la concentration en cuivre chloroplastique semble être un des facteurs contrôlant l'expression de CSD2 (Abdel-Ghany *et al.*, 2005), nous pensons pouvoir être en mesure de visualiser une

accumulation de ce métal dans l'organite grâce au niveau de transcription de CSD2, ce qui n'a pas été le cas.

Cependant, nous avons observé des différences de transcription sur ce milieu de culture entre des plantes de type WT et le mutant *paal* pour *ATX1*, *PCaP1* et *CutA* indiquant que des modifications profondes du contrôle de l'homéostasie du cuivre ont lieu dans le mutant *paal*. Les mécanismes mis en jeu semblent être beaucoup plus vastes que ce qui était présenté jusqu'à maintenant à savoir la simple suppression du phénotype par l'import du cuivre au travers d'un autre transporteur (Abdel-Ghany *et al.*, 2005).

D. Mise en évidence d'une troisième voie d'import de cuivre dans le chloroplaste

Les données obtenues sur le double mutant *hma1/paal* indiquent qu'il existe une autre protéine de l'enveloppe capable d'importer du cuivre dans les chloroplastes. **Cette troisième voie d'import de cuivre**, encore non caractérisée, permettrait seulement de compléter la perte de fonction de PAA1. Nos données suggèrent que ce transporteur aurait une faible affinité pour le cuivre, et ne permettrait pas de d'importer suffisamment de cuivre pour pallier la carence de HMA1 et PAA1 en condition de fortes intensités lumineuses. Deux protéines pourraient être des candidats potentiels pour catalyser cette troisième voie d'import de cuivre dans les plastes. La **protéine PIC1** est un transporteur de fer associé à l'enveloppe du chloroplaste et qui peut compléter fonctionnellement des levures déficientes dans l'acquisition du cuivre (Duy *et al.*, 2007). La **protéine ZIP4** possède une séquence de transit chloroplastique prédite, et peut aussi transporter du cuivre lorsqu'elle est exprimée en levure. De plus, le niveau de transcrits ZIP4 augmente fortement lors d'une carence en cuivre et en zinc (Wintz *et al.*, 2003).

Chapitre II

Production de HMA1 et de
PAA1 en système hétérologue

PRODUCTION DE HMA1 ET DE PAA1 EN SYSTEME HETEROLOGUE

L'approche *in planta* présentée dans le chapitre I nous a permis d'obtenir des informations sur les fonctions respectives de HMA1 et PAA1 dans le modèle *Arabidopsis thaliana*. Ce modèle d'étude comporte cependant des limites, en particulier pour la caractérisation biochimique de ces deux ATPases. En effet, la faible représentation de ces protéines (1/1000^{ème} des protéines de l'enveloppe pour HMA1) ne nous permet pas d'extraire et de purifier ces protéines à partir d'enveloppe de chloroplastes en quantité suffisante pour des études structure/fonction. Ce type d'étude permettrait de mettre en évidence les différences et les similarités entre HMA1 et PAA1 en particulier ce qui concerne leur spécificité ionique, leur mode de fonctionnement, leur régulation ainsi que leurs paramètres cinétiques.

L'expression de protéines membranaires en système hétérologue reste une tâche laborieuse. Lorsqu'elles sont exprimées dans des systèmes hétérologues classiques comme *E. coli*, la levure, les ovocytes de xénope ou les cellules d'insectes, ces protéines sont souvent toxiques ou faiblement exprimées ou encore mal repliées. Des travaux antérieurs à mon arrivée en thèse avaient permis d'exprimer HMA1 en système hétérologue levure. Cependant, son niveau d'expression n'était pas compatible avec une caractérisation biochimique ultérieure. Ce système d'expression a été largement utilisé pour la caractérisation fonctionnelle d'ATPases de type P_{1B} de plantes (Gravot *et al.*, 2004 ; Eren & Arguello, 2004 ; Verret *et al.*, 2005 ; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Moreno *et al.*, 2009). Cependant, aucune des ATPases exprimées dans ce système n'a pu être caractérisée biochimiquement après purification.

Les bactéries lactiques impliquées dans la fabrication des aliments fermentés (LAB) sont de plus en plus fréquemment utilisées comme moyens oraux de délivrance de protéines prophylactiques et thérapeutiques (pour revues, voir Le Loir *et al.*, 2005 ; Mierau *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2006 ; Wells et Mercenier, 2008). Parmi ces bactéries lactiques, *Lactococcus lactis* est largement utilisée pour la production de protéines hétérologues à grande échelle. Au cours de ces vingt dernières années, des progrès remarquables ont été réalisés pour le développement d'outils génétiques et la caractérisation de *L. lactis*. (Gasson & de Vos, 1994 ; de Vos & Vaughan, 1994; Wood & Warner, 2003; Wegmann *et al.*, 2007). Ces outils incluent aussi bien la transformation des bactéries, l'intégration de gènes, la délétion de gènes et la conjugaison que des systèmes d'expression inductibles ou constitutifs (pour revue, lire Morello *et al.*, 2008). Le système d'expression inductible par la nisine (système NICE) utilise les voies de régulation du quorum sensing généré par un peptide anti-bactérien : la nisine. Après une cascade de signalisation suite à la liaison de la nisine sur son récepteur, le promoteur P_{nisA} est activé, provoquant la transcription du gène placé en aval (Figure 40). Des

modifications ont été effectuées dans ce système pour que le gène d'intérêt, placé sous le contrôle du promoteur P_{nisA} dans un plasmide d'expression (comme le plasmide pNZ8148) soit exprimé après ajout de nisine dans le milieu de culture (pour revue, lire Mierau & Kleerebezem, 2005).

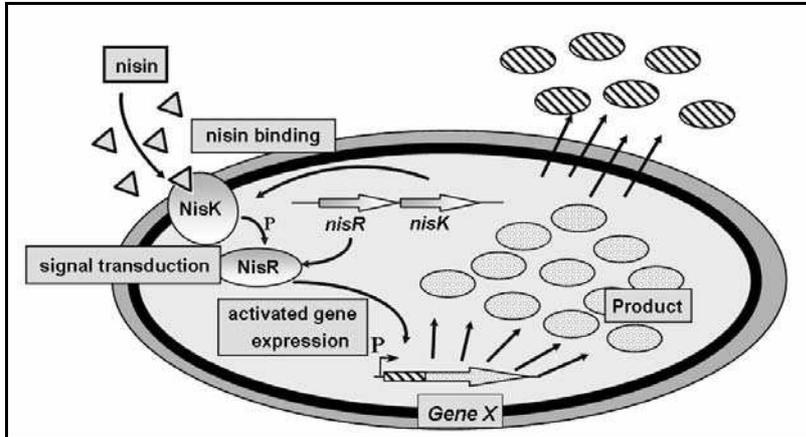


Figure 40 : Le système NICE.

Lorsque la nisine interagit avec son récepteur, NisK, ce dernier s'autophosphoryle, transfère son phosphate à NisR qui devient actif et active l'expression des gènes placés sous le contrôle du promoteur inducible par la nisine : P_{nisA} . Image tirée de Mierau & Keerebezem, 2005.

Ce système d'expression a permis de produire plusieurs protéines membranaires d'origine eucaryote (pour revues, voir Kunji *et al.*, 2003 ; Kunji *et al.*, 2005 ; Mierau *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2006; Junge *et al.*, 2008). Cependant, il n'existe aucune donnée dans la littérature sur la capacité de ce système à exprimer des protéines membranaires de plante, ni d'ATPases de type P_{1B} toutes origines confondues. Ce système présente aussi l'avantage de ne pas produire de corps d'inclusion dans lesquels sont souvent accumulées les protéines recombinantes exprimées dans le système *E. coli*.

Sachant que ce système d'expression semblait être bien adapté à la production de protéines membranaires, nous l'avons mis en place au laboratoire afin de réaliser des essais de production de nos protéines d'intérêt.

I. MISE EN PLACE DU SYSTEME D'EXPRESSION *LACTOCOCCUS LACTIS*

La mise en place de ce système d'expression a été effectuée (et financé) au laboratoire dans le cadre du projet CEA-PM (Criblage de systèmes d'Expression Alternatifs pour l'expression de Protéines Membranaire) coordonné par Norbert Rolland. Ce projet, regroupant dix laboratoires CEA, CNRS et des équipes universitaires, visait à tester l'expression d'une vingtaine de protéines membranaires issues d'organismes différents (des bactéries à l'homme en passant par les plantes) dans 7 systèmes d'expression : *E. coli* (avec ou sans fusion avec un tag Mystic), *L. lactis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Arabidopsis thaliana* (expression stable), tabac (expression transitoire), cellules humaines ou cellules d'insectes. Les protéines d'intérêt ont été exprimées sous forme mature, c'est-à-dire dépourvues de leur séquence d'adressage chloroplastique ou de leur peptide de sécrétion. Afin de permettre leur détection et leur purification ultérieures, les protéines ont aussi été fusionnées à leur extrémité C-terminale à

une étiquette *Strep-tag II*. Cette courte étiquette, composée de 8 acides aminés (WSHPQFEK), avait déjà été utilisée avec succès pour l'expression de HMA2, une ATPase de type P_{1B} issue d'*Arabidopsis thaliana*, dans le système levure (Eren et al., 2006). La présence de cette étiquette n'interférait pas avec l'activité de la protéine.

Tout le travail de mise au point concernant les conditions de culture, l'expression de protéines membranaires, la purification des protéines membranaires a été réalisé en collaboration avec Annie Frelet-Barrand, en stage post-doctoral dans l'équipe dans le cadre du projet CEA-PM.

A. Détermination des conditions d'expression

Le système *Lactococcus lactis* étant nouveau au laboratoire, nous avons mis en place l'ensemble des étapes allant de la préparation de l'inducteur, jusqu'à la purification des protéines d'intérêt.

Les premiers tests d'expressions ont été effectués en utilisant l'ADNc codant pour la protéine HMA1 dépourvue de sa séquence de transit chloroplastique prédite (c'est-à-dire l'ADNc dépourvu des nucléotides codant les 69 premiers acides aminés de HMA1). Les tests d'expression ont permis de déterminer la densité optique (DO) optimale pour l'induction de la protéine cible, la quantité d'inducteur à utiliser, la température et le temps d'expression les plus adaptés.

Référence bibliographique	DO d'induction	Température d'expression	Temps d'expression	Quantité d'inducteur
Margolles <i>et al.</i> , 1999	DO 660 nm = 0,8	30°C	1 heure	Dilution au 1/250 ^e de la solution stock
Monné <i>et al.</i> , 2005	DO 600 nm = 0,5	30°C	ND	Dilution au 1/1000 ^e de la solution stock
Lubelski <i>et al.</i> , 2004	DO 600 nm = 0,8	30°C	2 heures	Dilution au 1/500 ^e de la solution stock
Ce travail	DO 600 nm = 0,8	30°C	4 heures	Dilution au 1/200 ^e de la solution stock

Tableau 11 : Conditions d'expressions utilisées pour la production de diverses protéines membranaires chez *L. lactis* et conditions de cultures optimales pour l'expression de HMA1.

Sont comparées les conditions d'expression de protéines membranaires par *L. lactis* avec les conditions optimales d'expression pour HMA1.

Ces tests d'expression ont été effectués en tenant compte des données disponibles dans la littérature qui sont présentées dans le tableau 11. Les DO d'induction sont comprises entre 0,5 et 0,8 (pour des longueurs d'onde variant de 600 et 660 nm), la température d'expression est de 30°C dans les travaux présentés et le temps d'expression varie entre une et deux heures. Enfin, la quantité de nisine utilisée pour induire l'expression des protéines cibles varie entre des dilutions au 1/250^{ème} et 1/1000^{ème} d'une solution stock contenant la nisine. Nous reviendrons ultérieurement sur la quantité d'inducteur utilisée pour induire l'expression des protéines d'intérêt. Le tableau 11 résume les conditions optimales déterminées pour

l'expression de HMA1 dans le système *Lactococcus lactis* : l'expression est induite lorsque la DO à 600 nm atteint 0,8 et se déroule à 30°C pendant 4 heures.

La température d'expression utilisée par les auteurs des études présentées dans le tableau X est de 30°C. Nous avons souhaité diminuer la **température d'expression** pour essayer de ralentir le métabolisme des bactéries et augmenter ainsi l'expression de HMA1. Nos résultats indiquent que les rendements d'expression sont plus faibles lorsque les bactéries sont cultivées à 20°C (non montré).

Nous avons pu observer que le **temps d'expression** nécessaire pour une expression optimale de HMA1 est plus long que ce qui est généralement décrit dans la littérature. Nous avons analysé des durées d'expression d'une heure, de deux heures et de 10 heures mais les rendements obtenus se sont avérés systématiquement moins bons. Les tests d'expressions effectués sur la nuit ne permettent pas d'augmenter le rendement de production. Il est probable que, dans ces conditions, nous sélectionnons les bactéries qui n'expriment pas ou peu de protéine HMA1, ces bactéries pouvant ainsi se diviser plus vite que les bactéries exprimant la protéine d'intérêt.

Afin de d'augmenter la **pression de sélection** sur les bactéries exprimant le plus HMA1 (bactéries qui auraient pu mieux résister à un excès ou une carence en métaux), nous avons aussi essayé d'ajouter différentes concentrations de cuivre ou d'EDTA dans le milieu de culture. Ces essais se sont révélés infructueux.

Nous avons enfin remarqué que la **quantité d'inducteur** (la nisine) est un facteur primordial pour une expression optimale des protéines cibles.

B. Impact de la nisine sur le niveau d'expression de HMA1

La nisine est un peptide antibactérien de 34 acides aminés produit par certaines souches de *L. lactis* (Cheigh & Pyun, 2005). Ce peptide est utilisé comme inducteur par le système d'expression NICE. Au laboratoire, nous utilisons de la nisine produite par la souche NZ9700 de *L. lactis*. La nisine étant excrétée, elle est contenue dans le milieu de culture de ces bactéries. La nisine étant stable à -80°C, le milieu de culture contenant la nisine est préparé en grande quantité puis stocké à -80°C afin de pouvoir réutiliser le même stock au cours de plusieurs expériences d'expression. L'induction de l'expression des protéines d'intérêt se fait en ajoutant un volume défini du milieu de culture contenant la nisine.

Lors des tests d'expression, nous avons remarqué que la quantité de nisine doit être ajustée de façon très précise pour obtenir une production optimale (Figure 41).

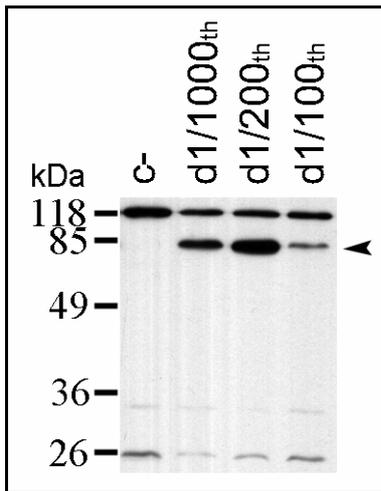


Figure 41 : Effet de la concentration en inducteur sur l'expression de HMA1.

Des bactéries transformées avec un plasmide non recombinant (C-) ou un plasmide contenant l'ADNc codant pour HMA1 sont cultivées en présence de différentes concentrations d'inducteur (dilution au 1/1000^{ème}, 1/200^{ème} et 1/100^{ème} de la solution stock contenant la nisine). Une dilution au 1/200^{ème} a été utilisée pour les bactéries transformées avec le vecteur non recombinant. Après 4 heures d'expression, les bactéries sont concentrées et les protéines membranaires extraites. Une aliquote (15 µg de protéines) est déposée sur gel. La présence de HMA1 est analysée par immunomarquage à l'aide du conjugué *Strep*-Tactin HRP. Image tirée de Frelet-Barrand / Boutigny *et al.*, soumis.

Comme le montre l'immunomarquage réalisé à l'aide du conjugué *Strep*-Tactin HRP, nous observons l'apparition d'un signal de taille correspondant à HMA1 (82 kDa) après induction de l'expression de bactéries transformées par un plasmide contenant l'ADNc codant pour HMA1 (Figure 41, lignes d). Ce signal est absent dans des membranes issues de bactéries transformées par un plasmide non recombinant (Figure 41, piste c-). Ce résultat montre que HMA1 est exprimée dans ce système d'expression. De plus, cette protéine migre à taille attendue et ne subit pas de protéolyse. HMA1 est retrouvée dans la fraction membranaire.

La figure 41 montre aussi la présence d'un marquage autour de 118 kDa. Il s'agit d'une protéine membranaire intrinsèque de *L. lactis* réagissant avec le conjugué *Strep*-Tactin HRP. Ce signal est utilisé comme contrôle de charge.

Nous pouvons aussi voir l'impact de la quantité d'inducteur sur le niveau d'expression de HMA1 : la concentration optimale en inducteur est une dilution au 1/200^{ème} de la solution stock de nisine. Une trop grande quantité d'inducteur (dilution au 1/100^{ème}) provoque une baisse du niveau d'expression de HMA1 qui est corrélée à une diminution du taux de croissance des bactéries exprimant cette protéine. Inversement, une quantité trop faible de nisine (dilution au 1/1000^{ème} de la solution stock de nisine) n'est pas suffisante pour obtenir une expression maximale de HMA1.

Ainsi, la quantité d'inducteur doit être ajustée de manière à ce que l'expression soit optimale sans pour autant inhiber la croissance des bactéries qui entraîne une diminution de la quantité de protéines membranaires obtenues et donc une diminution de la protéine d'intérêt.

Pour chaque nouvelle préparation d'un stock de nisine, il est ensuite nécessaire de déterminer la dilution optimale à utiliser (qui peut être différente d'un stock à l'autre ainsi qu'en fonction des protéines exprimées). Les tests d'expressions réalisés sur les bactéries exprimant d'autres ATPases de type P_{IB} (voir paragraphe II, C.) indiquent que les conditions d'expressions mises au point pour HMA1 sont aussi optimales pour ces autres protéines.

C. Extraction des protéines membranaires totales

La purification des protéines membranaires totales a nécessité d'optimiser des protocoles spécifiques à *L. lactis*. *L. lactis* est une bactérie gram positive très résistante aux techniques généralement employées pour casser les bactéries (sonication et Presse de French).

L'extraction des protéines membranaires est réalisée en trois étapes : l'éclatement des cellules, l'élimination des débris cellulaires et des bactéries encore intactes par une centrifugation à faible vitesse, et une ultracentrifugation permettant de séparer les protéines membranaires des protéines solubles.

Les premiers protocoles utilisés ont été fournis par Edmund Kunji (communication personnelle). Ces protocoles étaient basés sur l'utilisation de la presse de French après digestion de la paroi de peptidoglycane par le lysozyme. Cette technique d'éclatement des bactéries a dû être modifiée car le lysozyme était retrouvé dans toutes les étapes allant de la purification des protéines membranaires totales jusqu'à la purification des protéines d'intérêt (non montré). L'utilisation d'un « disrupteur » (Constant Cell) ne nécessite pas l'utilisation du lysozyme et permet d'appliquer une pression supérieure à celle fournie par la presse de French. L'utilisation de ce système, nous a permis d'augmenter la quantité de protéines membranaires extraites d'un facteur supérieur à trente (Tableau 12).

Utilisation d'une presse de French et de lysozyme	Utilisation du disrupteur et optimisation du protocole
0.5 - 1 mg	30-80 mg

Tableau 12 : Comparaison des rendements d'extraction des protéines membranaires issues de *L. lactis* obtenus avant et après optimisation du protocole. Les valeurs correspondent aux quantités de protéines membranaires totales extraites à partir d'un litre de culture de bactéries.

L'optimisation du protocole a tout d'abord consisté à changer de tampon utilisé pour l'éclatement des bactéries et la purification des protéines membranaires totales. En effet, le tampon phosphate, recommandé dans le protocole, peut interférer avec des mesures ultérieures d'activité de nos protéines d'intérêt (dosage de phosphate inorganique libéré par l'activité ATPase). Il a donc été remplacé par un tampon Tris-HCl, utilisé pour la purification de protéines membranaires de levures exprimant des ATPases (Eren & Arguello, 2004). Selon les expériences réalisées ensuite sur ces extraits membranaires, le Tris-HCl est remplacé par un tampon Hepes, ce qui n'a pas d'impact sur le rendement d'extraction des protéines membranaires.

Le protocole fourni recommandait l'utilisation d'EDTA pour inhiber les activités des protéases libérées lors de l'éclatement des bactéries. L'ajout d'EDTA permet aussi de limiter l'agrégation des vésicules membranaires (Yao *et al.*, 2007). L'EDTA chélate les métaux divalents et pouvait ainsi interférer avec les tests d'activités réalisés sur les extraits membranaires. Nous avons donc utilisé des milieux dépourvus d'EDTA et ceci a permis d'augmenter la quantité de protéines membranaires extraites d'un facteur 3. Nous expliquons

ce résultat par le fait que l'EDTA pouvait limiter l'agrégation des vésicules lors de la purification des protéines membranaires totales. L'analyse par SDS-PAGE du profil des protéines membranaires suggère qu'il n'y a pas de protéolyse liée à l'absence d'EDTA.

Enfin, l'utilisation du disrupteur a été optimisée. Plutôt que de traiter l'échantillon trois fois successivement le disrupteur, l'échantillon est traité une première fois puis centrifugé à basse vitesse afin de distinguer les protéines déjà extraites et les débris cellulaires et bactéries intactes. Le culot obtenu contenant ces débris cellulaires et bactéries intactes est alors remis en suspension puis déposé une seconde fois dans le disrupteur. Ainsi, c'est encore un extrait enrichi en bactéries intactes qui est traité la seconde fois. Cette procédure n'a pas d'impact sur le rendement d'extraction des protéines membranaires. Outre le fait que cette technique est moins fastidieuse que ce qui était recommandé, cela permet d'éviter des changements de pression trop brutaux aux protéines bactériennes déjà extraites pouvant induire une dénaturation (thermique) des protéines.

II. PRODUCTION DE DIFFERENTES FORMES DE HMA1 ET DE PAA1

A. Impact des séquences att sur le niveau d'expression de HMA1

L'ADNc codant HMA1 a été intégré dans le vecteur d'expression pNZ8148 en utilisant une méthode compatible avec la technologie Gateway. De fait, le clonage de cet ADNc a été réalisé dans le cadre d'un programme global (programme CEA-PM) visant à intégrer plus d'une vingtaine de gènes ou d'ADNc dans une dizaine de vecteurs d'expression distincts. Bien que plus rapide, cette méthode de clonage a pour conséquence d'ajouter en 5' de l'ADNc (et après le codon initiateur) 51 nucléotides (correspondant aux séquences att permettant les recombinaisons homologues) qui sont traduits lors de l'expression de HMA1. Cette construction conduit donc à la production d'une protéine recombinante, nommée AtHMA1att, qui est en fait une protéine de fusion.

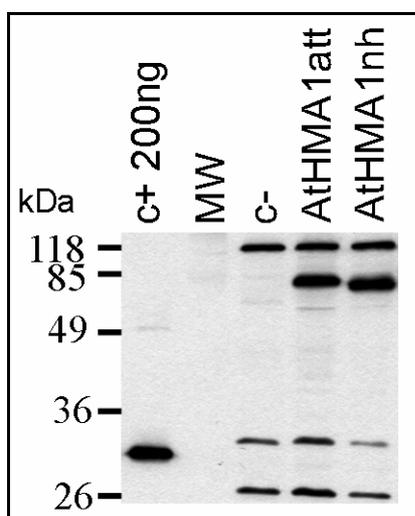


Figure 42 : Impact des séquences att sur l'expression de HMA1.

La présence de HMA1 est détectée à l'aide du conjugué *Strep*-tactin HRP après migration en SDS-PAGE et transfert sur membrane de nitrocellulose. Les extraits membranaires bruts analysés (15 µg de protéines) sont obtenus à partir de bactéries transformées par 1) un plasmide non recombinant (c-), 2) un plasmide contenant l'ADNc codant HMA1 fusionné à la séquence att (AtHMA1att) et par 3) un plasmide contenant l'ADNc codant pour la forme mature de HMA1 (AtHMA1nh).

La quantification est réalisée en utilisant 200 ng d'une protéine contrôle contenant une étiquette *Strep*-tag II (c+ 200 ng).

Afin d'analyser l'impact de l'ajout de ces 17 acides aminés sur le niveau d'expression de HMA1, nous avons aussi intégré l'ADNc codant HMA1 dans le vecteur d'expression pNZ8148 en utilisant des techniques classiques de clonage avec des enzymes de restriction pour produire la forme nommée AtHMA1nh.

Les protéines membranaires issues des bactéries exprimant les deux formes de HMA1 (AtHMA1att et AtHMA1nh) sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, et la présence de HMA1 est analysé après un marquage avec le conjugué *Strep*-Tactin HRP (Figure 42). La différence de taille entre les deux formes de HMA1 exprimées est due à la présence de la séquence de 17 résidus fusionnée en *N*-terminal de la protéine AtHMA1att. La figure 42 montre que l'ajout des séquences *att* n'a pas d'impact sur le niveau d'expression de HMA1.

Afin de quantifier la production de HMA1, nous avons déposé sur le gel une protéine contrôle reconnue spécifiquement par le conjugué *Strep*-Tactin HRP (Figure 42, piste c+). Le signal obtenu après révélation à la luminescence est identique pour la protéine contrôle et HMA1, ce qui signifie qu'il y a autant de molécules de HMA1 dans 15 µg de protéines membranaires qu'il y a de molécules de protéine contrôle (correspondant à 200 ng). HMA1 ayant un poids moléculaire trois fois supérieur à celui de la protéine contrôle, il y a donc 600 ng de HMA1 dans les 15 µg de protéines membranaires déposées sur gel. Sur la base de cette quantification, HMA1 représente donc 4 % des protéines membranaires totales. L'optimisation du protocole d'extraction des protéines membranaires ayant permis d'obtenir des rendements de 30 mg de protéines membranaires totales par litre de culture, nous arrivons ainsi à produire, de façon reproductible, 1,2 mg de protéine HMA1 par litre de culture.

En conclusion, ces premiers résultats sont encourageants puisqu'ils suggèrent que *L. lactis* est un système adapté pour l'expression de HMA1. Le niveau de production (4 % des protéines membranaires) de cette protéine est compatible avec des essais de purification et de caractérisation biochimique ultérieurs.

B. Obtention de formes mutées de HMA1 et expression de PAA1

Pour la caractérisation biochimique de HMA1, nous avons produit plusieurs formes mutées de cette protéine : 1) une forme inactive qui possède une mutation dans le domaine catalytique (aspartate 453 muté en alanine) et 2) une forme dépourvue de la séquence riche en histidines qui est probablement impliquée dans la régulation de l'activité de HMA1. Enfin, pour pouvoir comparer les caractéristiques enzymatiques des deux ATPases de type P_{IB} associées à l'enveloppe des chloroplastes, nous avons produit la protéine PAA1.

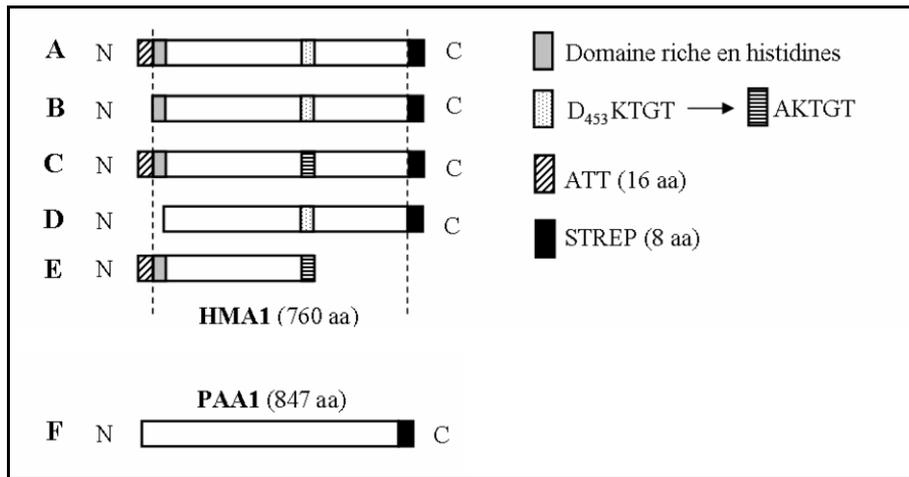


Figure 43 : Représentation schématique des différentes constructions obtenues pour HMA1 et PAA1.

A : HMA1 contenant une fusion de 17 résidus (codés par la séquence *att*) en *N*-terminal (HMA1att) ; B : HMA1 mature ; C : HMA1 mutée au niveau du site de phosphorylation D₄₅₃→A (HMA1 AKT) ; D : HMA1 dépourvue de sa séquence riche en histidines (HMA1ΔHIS) ; E : HMA1 tronquée après son site de phosphorylation (HMA1 60-465) ; F : PAA1 mature. PAA1 et toutes les formes de HMA1 sont exprimées sous forme mature donc sans leur séquence de transit chloroplastique prédite.

L'optimisation des protocoles d'expression puis d'extraction des protéines membranaires a été réalisée avec la forme de HMA1 contenant la séquence *att* (Figure 43, ligne A). Tous les essais d'expressions ultérieurs ont été effectués avec la forme mature de HMA1 (Figure 43, ligne B). Dans le paragraphe précédent, nous avons montré que le niveau de production de ces deux formes est équivalent.

- La forme de HMA1 mutée au niveau de son site de phosphorylation **DKTGT** a été utilisée comme contrôle négatif lors des expériences de mesure de l'activité de cette protéine. L'aspartate est remplacé par une alanine (**AKTGT**) empêchant la phosphorylation de HMA1 lors de son cycle catalytique (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Lowe *et al.*, 2004) (Figure 8, p. 21, et Figure 43, ligne C). Cette forme inactive de HMA1 est appelée HMA1-AKT.

- Une forme tronquée de HMA1 ne contenant que les résidus 60 à 465 a été obtenue (Figure 43, ligne E). Cette forme de HMA1 ne contient pas les deux dernières hélices transmembranaires prédites. Des études précédentes (réalisées en système hétérologue levure) avaient montré qu'une mutation dans le motif HEGG situé dans la dernière hélice transmembranaire abolit l'activité de transport de cuivre de HMA1 (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). La forme tronquée de HMA1 est très probablement inactive car elle ne contient pas ce motif HEGG. Cette forme de HMA1 ne contenant pas d'étiquette *Strep*-tag II, son expression est révélée grâce à un anticorps dirigé spécifiquement contre HMA1 (non montré). Cette forme de HMA1 est appelée HMA1 60-465.

- Le domaine *N*-terminal de HMA1 contient une séquence riche en histidine probablement impliquée dans la régulation de l'enzyme (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). La comparaison des différents paramètres cinétiques obtenus sur une forme mature de HMA1 et une forme

dépourvue de cette séquence riche en histidines permettrait de mieux comprendre le rôle de ce domaine de régulation (Figure 43, ligne D). Cette forme de HMA1 est appelée HMA1 Δ HIS.

- Afin de comparer les caractéristiques biochimiques de HMA1 et PAA1, nous avons produit PAA1 sous forme mature (sans séquence d'adressage au chloroplaste) en fusion avec l'étiquette *Strep*-tag II en C-terminal (Figure 43, ligne F).

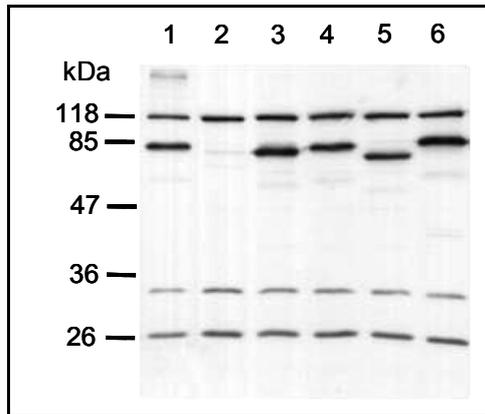


Figure 44 : Expression des différentes formes de HMA1 et de PAA1.

La présence des protéines d'intérêt est détecté à l'aide du conjugué *Strep*-tactin HRP après migration sur SDS-PAGE et transfert sur membrane de nitrocellulose. 15 μ G de protéines membranaires issues de *L. lactis* transformées par différentes constructions sont déposées par puits

1 : HMA1 en fusion avec 17 résidus *N*-terminaux codés par la séquence att.

2 : contrôle négatif, bactéries transformées avec un vecteur non recombinant.

3 : HMA1 mature.

4 : HMA1 mutée au niveau de son site de phosphorylation **DKTGT** \rightarrow **AKTGT** la rendant inactive (HMA1 AKT).

5 : HMA1 dépourvue de sa séquence *N*-terminale riche en histidines (HMA1 Δ HIS).

6 : PAA1 mature.

D'après l'immunomarquage présenté figure 44, toutes les formes de HMA1 ainsi que PAA1 s'expriment de façon équivalente et ces protéines ne semblent pas être protéolysées. Les différences de taille observées correspondent à la taille attendue pour chacune des protéines exprimées. Toutes ces protéines sont retrouvées dans la fraction membranaire et sont produites en quantité suffisante pour envisager des analyses biochimiques ainsi que la purification de ces protéines.

C. Lactococcus : un système adapté pour l'expression d'ATPases de type P_{1B} de plantes

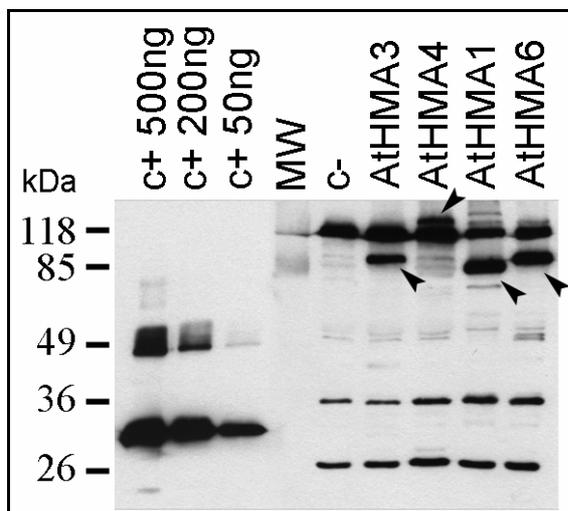


Figure 45 : Expression chez *L. lactis* de quatre ATPases de type P_{1B} d'*A. thaliana*.

Protéines membranaires totales (15 μ g) extraites à partir de souches de *L. lactis* transformées par un plasmide codant pour HMA3, HMA4, HMA1 et PAA1 (AtHMA6) ou un plasmide non recombinant (c-). Après expression, les protéines membranaires ont été séparées par SDS-PAGE 12 % et analysées par immunomarquage à l'aide du conjugué *Strep*-tactin HRP. Pour la quantification, des quantités connues de protéine contrôle (500 ng, 200 ng et 50 ng de protéine fusionnée avec le *Strep*-tag II ont été déposées sur le même gel).

Image tirée de Frelet-Barrand / Boutigny *et al.*, soumis.

De manière plus générale, *L. lactis* semble être un système d'expression particulièrement adapté pour les ATPases de type P_{1B} issues d'*A. thaliana*. En effet, nous avons aussi pu exprimer HMA3 et HMA4, deux autres ATPases de type P_{1B}. *In planta*, HMA3 est localisée au niveau du tonoplaste (Morel *et al.*, 2009) tandis que HMA4 est associée à la membrane plasmique (Verret *et al.*, 2004).

La figure 45 montre que les quatre ATPases de type P_{1B} d'*A. thaliana* peuvent être exprimées dans ce système. Les signaux détectés correspondent aux tailles attendues pour les différentes protéines exprimées. La quantification réalisée à l'aide d'une protéine contrôle (Figure 45, pistes c+) montre que le signal obtenu pour les protéines HMA1, HMA3 et PAA1/HMA6 correspond à environ 100 ng de protéine contrôle. Ces protéines représentent donc environ 1 à 3 % des protéines membranaires totales. L'expression de HMA4 est plus faible, elle représente environ 0,2 % des protéines membranaires totales.

D. Conclusion

Le travail réalisé démontre clairement que *L. lactis* est un système d'expression procaryote parfaitement adapté à la production des ATPases de type P_{1B} de plantes. En effet, les 4 ATPases testées (sur les 8 que contient d'*A. thaliana*) ont pu être exprimées avec succès. Ces protéines sont associées au système membranaire de la bactérie et ne semblent pas subir de protéolyse. L'optimisation du protocole d'expression a permis d'obtenir des niveaux de production de l'ordre de 0,2 à 3 % des protéines membranaires totales. D'autre part, grâce à l'optimisation des techniques d'extraction des protéines membranaires, nous arrivons ainsi à produire, de façon reproductible, environ 1 mg de protéine recombinante par litre de culture pour les ATPases les plus exprimées. Ces quantités sont compatibles avec des études biochimiques ainsi que des essais de cristallisation. Ces extraits membranaires ont été utilisés pour des tests enzymatiques qui sont détaillés dans le chapitre suivant. Les protéines d'intérêt étant suffisamment exprimées, nous avons purifié ces protéines par affinité grâce à l'étiquette *Strep-Tag II* présente en C-terminal. Ceci a nécessité la mise au point des conditions de solubilisation de ces protéines.

III. SOLUBILISATION ET PURIFICATION DE HMA1 ET PAA1

A. Solubilisation de HMA1 et de PAA1 à partir de membranes de *Lactococcus*

Les protéines membranaires sont extraites de la bicouche lipidique à l'aide de détergents. Le choix des détergents à utiliser est crucial pour préserver l'activité de ces protéines. Les détergents ont comme particularité de posséder une tête polaire hydrophile et une queue hydrophobe. Lorsqu'ils sont sous forme de micelles, les détergents ont leur tête polaire en contact avec le milieu composé essentiellement d'eau et leur queue hydrophobe localisée à l'intérieur de la micelle qui est dépourvue d'eau. Les parties hydrophobes des protéines vont

interagir avec les queues hydrophobes, et les domaines solubles sont en contact avec le milieu hydraté, mimant la bicouche lipidique.

Le détergent utilisé ne doit pas dénaturer les protéines que nous voulons solubiliser. De plus la partie hydrophobe du détergent choisi doit être de la taille des hélices transmembranaires des protéines étudiées afin que les parties hydrophobes des protéines ne soient pas en contact avec le milieu hydraté. Comme il n'existe pas de détergent universel permettant de solubiliser et de conserver l'activité de toutes les protéines membranaires, il est nécessaire de cribler plusieurs détergents afin de déterminer celui ou ceux qui sont les plus adaptés aux protéines d'intérêt. Nous avons utilisé des détergents non ioniques qui sont le n-dodécyl β -D-maltoside et l'octaéthylène glycol monododécyl ether.

Le n-dodécyl β -D-maltoside (DDM) est le détergent le plus couramment utilisé pour la solubilisation des protéines membranaires. Il s'agit d'un détergent non ionique composé d'une queue hydrophobe constituée de 12 atomes de carbones et d'une tête hydrophile comportant deux groupements maltose (Figure 46). La Concentration Micellaire Mixte (CMC) de ce détergent est de 0,17 mM. La CMC correspond à la concentration à partir de laquelle le détergent s'organise sous forme de micelles. En dessous de cette concentration, les molécules de détergent sont libres dans le milieu.

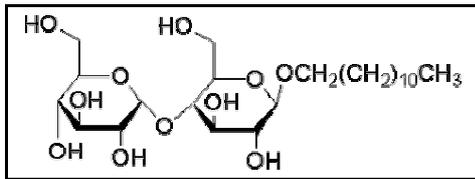


Figure 46 : Représentation selon Lewis du n-dodécyl β -D-maltoside (DDM).

Plusieurs ATPases de type P_{1B} (CopA d'*Archaeoglobus fulgidus* ainsi que CtrA2 et CtrA3 d'*Aquifex aeolicus*) ont déjà été solubilisées avec succès à l'aide de ce détergent et des mesures d'activité ont pu être réalisées sur ces protéines suggérant que ce détergent n'altère pas l'activité de ce type de protéines (Mandal *et al.*, 2004 ; Chintalapati *et al.*, 2008). L'octaéthylène glycol monododécyl ether (C₁₂E₈) (Figure 47) a été utilisé pour la solubilisation et la cristallisation de SERCA1A (Marchand *et al.*, 2008), une ATPase à calcium largement étudiée. Les groupements éther et éthylène de ce détergent peuvent être de taille variable. Le C₁₂E₈ est souvent utilisé car la partie hydrophobe du détergent est de taille comparable à celle d'une membrane biologique. La CMC de ce détergent non ionique est de 80 μ M.

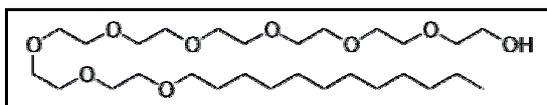


Figure 47 : Représentation selon Lewis de l'octaethylene glycol monododecyl ether (C₁₂E₈).

Les premiers essais de solubilisation n'ont permis de solubiliser qu'une faible quantité de HMA1 et de PAA1 qui s'accumulent dans les membranes de *L. Lactis*.

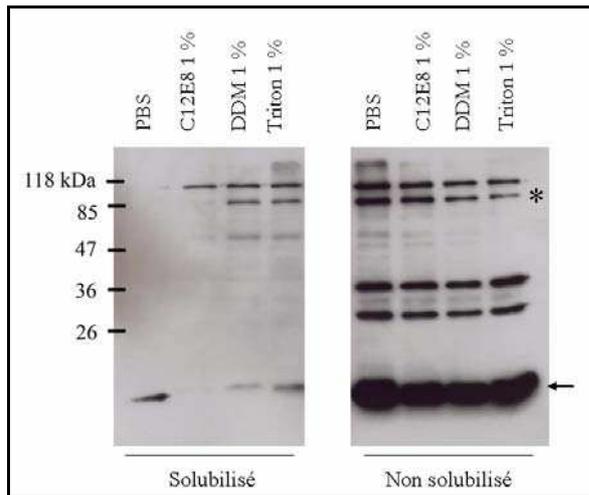


Figure 48 : Mise au point du protocole de solubilisation de HMA1.

Un extrait membranaire brut issu de *Lactococcus* exprimant HMA1 (1 mg de protéines par mL) est incubé pendant 1 h dans un milieu ne contenant pas de détergent (PBS) ou contenant 1 % (p/v) de C₁₂E₈, DDM ou Triton X-100. Après une étape d'ultracentrifugation pendant 1 h à 150 000 g, les protéines solubilisées contenues dans le surnageant sont conservées. Le culot contenant les protéines non solubilisées est remis en suspension afin d'être analysé. Une aliquote de chaque fraction est séparée par SDS-PAGE et analysé par un marquage à l'aide du conjugué *Strep*-tactin HRP. L'étoile correspond au marquage de HMA1 et la flèche correspond au lysozyme.

La figure 48 présente les premiers essais de solubilisation effectués sur des membranes totales de *Lactococcus* contenant HMA1. Comme contrôle négatif, nous avons incubé les membranes dans un milieu ne contenant pas de détergent (Figure 48, piste PBS). Dans ce cas, la totalité de HMA1 est retrouvée dans la fraction non solubilisée. L'incubation des membranes avec 1 % (p/v) de C₁₂E₈ ne permet pas de solubiliser HMA1 (Figure 48, piste C12E8). En revanche, environ 20 % de HMA1 est solubilisée en présence de DDM ou de Triton X-100 1 % (p/v). Le Triton X-100 n'est pas un détergent adapté à la solubilisation de protéines membranaires en vue de leur caractérisation fonctionnelle. En effet, la taille des molécules contenues dans ce détergent est variable (Figure 49) pouvant entraîner une dénaturation des protéines d'intérêt. De plus, des peroxydes sont présents dans les solutions contenant ce détergent pouvant aussi interférer avec l'activité des protéines d'intérêt.

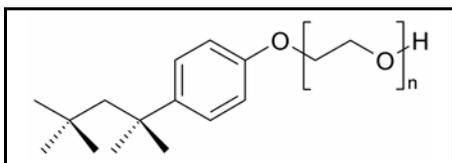


Figure 49 : Représentation selon Lewis du Triton X-100.

Dans le paragraphe I, C. nous avons discuté des différents protocoles utilisés pour casser les bactéries, et en particulier du problème rencontré lors de l'utilisation du lysozyme. La figure 48 montre que le lysozyme est retrouvé en très grande quantité dans nos échantillons de protéines solubilisées et que cette protéine réagit avec le conjugué *Strep*-tactin HRP. Les tests suivants ont donc été réalisés à partir d'extraits membranaires obtenus avec le disrupteur et en présence d'un tampon Tris (et non du tampon phosphate).

Lors des tests de solubilisation suivants, nous avons fait varier la concentration en détergent. Cependant, même des concentrations de 2 ou 4 % (p/v) n'ont pas permis d'augmenter le

rendement de solubilisation de HMA1. Ce résultat est surprenant car dans la littérature du Triton X-100, DDM et du C₁₂E₈ sont utilisés à 1 % (p/v) pour solubiliser efficacement des protéines membranaires exprimées chez *L. lactis* (Lubelski *et al.*, 2004 ; Putman *et al.*, 1999). Nous avons aussi remarqué que la solubilisation était plus efficace lorsqu'un mélange de C₁₂E₈ et DDM est utilisé.

Ce rendement de solubilisation a finalement été augmenté très significativement lorsque nous avons traité les membranes contenant les ATPases d'intérêt par sonication. Grâce à cette étape, la quasi-totalité des protéines d'intérêts est retrouvée dans la fraction soluble (Figure 50). Après une étape de lavage des membranes pour éliminer les protéines associées de façon non spécifique aux membranes (W), les protéines intrinsèques sont incubées avec le détergent et la suspension est légèrement traitée par sonication. Dans ces conditions, HMA1 et PAA1 sont retrouvées presque exclusivement dans la fraction soluble (Figure 50, piste S) indiquant que la solubilisation est presque totale.

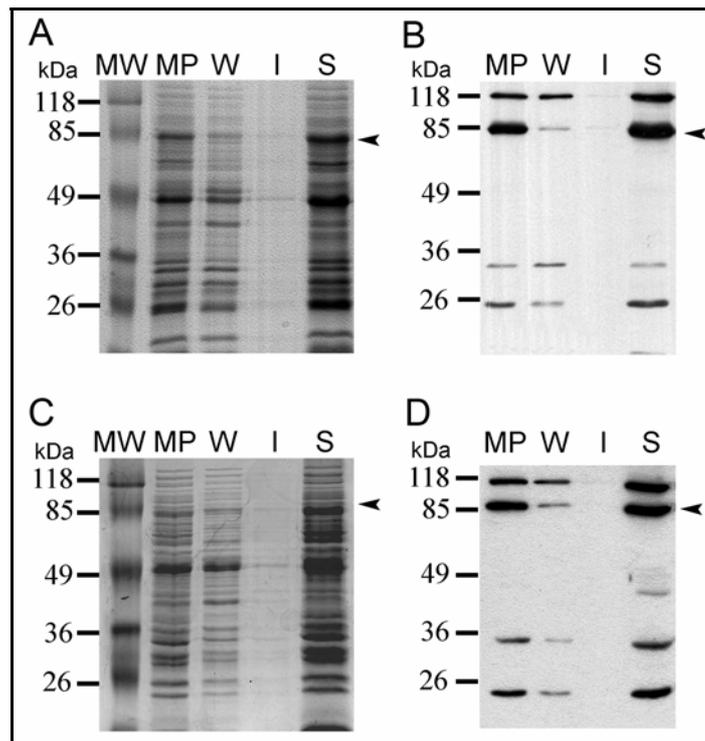


Figure 50 : Solubilisation de HMA1 et de PAA1 en présence d'un mélange de détergent.

Les protéines membranaires (4 µg / µL) sont incubées pendant 30 min à 4°C dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM et ensuite centrifugées pendant 80 min à 160 000 g, à 4°C pour éliminer les protéines solubles (W : étape de lavage). Les culots sont repris dans le même tampon contenant du DDM 1 % (p/v), C₁₂E₈ 0,32 % (p/v) et du TCEP 100 µM. Après une étape de sonication et une incubation de 90 min à 4°C sur roue, la suspension de membranes est centrifugée à 15 000 g pendant 20 min. Les protéines membranaires solubilisées sont contenues dans le surnageant (S). Les protéines membranaires non solubilisées sont reprises dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM. Une aliquote (10 µL) de chaque fraction est analysée sur un gel SDS-PAGE de 10 %. MP : 15 µg de protéines membranaires brutes. A et C : analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. B et D : détection des protéines d'intérêt (HMA1 en B, et PAA1 en D) avec le conjugué *Strep*-tactin HRP. Image tirée de Frelet-Barrant / Boutigny *et al.*, soumis.

Le fait que la solubilisation de HMA1 et de PAA1 soit augmentée après une étape de sonication, nous a suggéré que nos extraits de protéines membranaires n'étaient pas préparés de façon optimale. En effet, la sonication a pour effet de casser les agrégats et de produire de petites vésicules augmentant ainsi la surface de contact avec le détergent. La sonication pouvant dénaturer les protéines, nous avons modifié notre protocole d'extraction de protéines membranaires de manière à obtenir une solution la plus homogène possible en reprenant les agrégats de protéines membranaires obtenus après l'étape d'ultracentrifugation grâce à un Potter. De cette manière, les protéines membranaires sont mieux remises en suspension permettant ainsi un meilleur accès du détergent sur les vésicules membranaires. D'autre part, l'étape de lavage des membranes avant l'ajout de détergent a été éliminée afin d'éviter l'étape d'ultracentrifugation permettant de concentrer les protéines membranaires intrinsèques. En suivant ce protocole alternatif, la solubilisation de HMA1 et de PAA1 est presque totale (non montré).

Ces résultats indiquent que l'extraction de HMA1 et de PAA1 des membranes de *L. lactis* est dépendante de l'accessibilité des vésicules membranaires aux détergents. Afin de permettre une solubilisation efficace, il est donc nécessaire de travailler à partir d'une solution de protéines membranaires très homogène.

B. Purification des protéines HMA1 et PAA1

La purification de HMA1 et de PAA1 a été réalisée avec une matrice d'affinité (*Strep*-tactin) qui reconnaît l'étiquette *Strep*-tag II placée en C-terminal de ces protéines recombinantes. L'utilisation de la desthiobiotine (un analogue de la biotine) permet d'éluer les protéines fixées sur la matrice d'affinité. La purification de HMA1 et de PAA1 a nécessité une mise au point importante afin d'obtenir des fractions fortement enrichies pour l'une ou l'autre de ces protéines (Figure 51). Nous avons dû déterminer des conditions pour lesquelles l'interaction entre la protéine solubilisée et la matrice était efficace. Tout d'abord, nous avons fait passer trois fois successivement l'échantillon de protéines membranaires solubilisées au travers d'une colonne contenant la matrice d'affinité préalablement équilibrée dans un milieu contenant les mêmes concentrations de détergents que celles utilisées pour la solubilisation des protéines. Dans ces conditions, la majeure partie des protéines d'intérêt ne s'accrochait pas à la matrice. L'interaction entre les protéines solubilisées et la matrice d'affinité a été plus efficace lorsque nous les avons co-incubées pendant trois heures, cependant le rendement de purification n'était toujours pas satisfaisant. D'après les données du fournisseur, une concentration de détergent trop élevée dans la solution peut inhiber l'interaction entre la matrice et la protéine cible. Afin de diminuer la concentration de détergent présent dans la fraction de protéines solubilisées, nous avons dilué l'extrait de protéines membranaires solubilisées d'un facteur 10

afin d'obtenir une concentration finale de DDM de 0,1 % (p/v). Cet extrait est ensuite déposée sur une colonne contenant la matrice d'affinité avec un système de circuit fermé (utilisant une pompe péristaltique) permettant une re-circularisation de l'extrait protéique sur la nuit. Ce protocole de purification a permis d'améliorer la fixation des protéines d'intérêt sur la matrice et ainsi augmenter le rendement de purification.

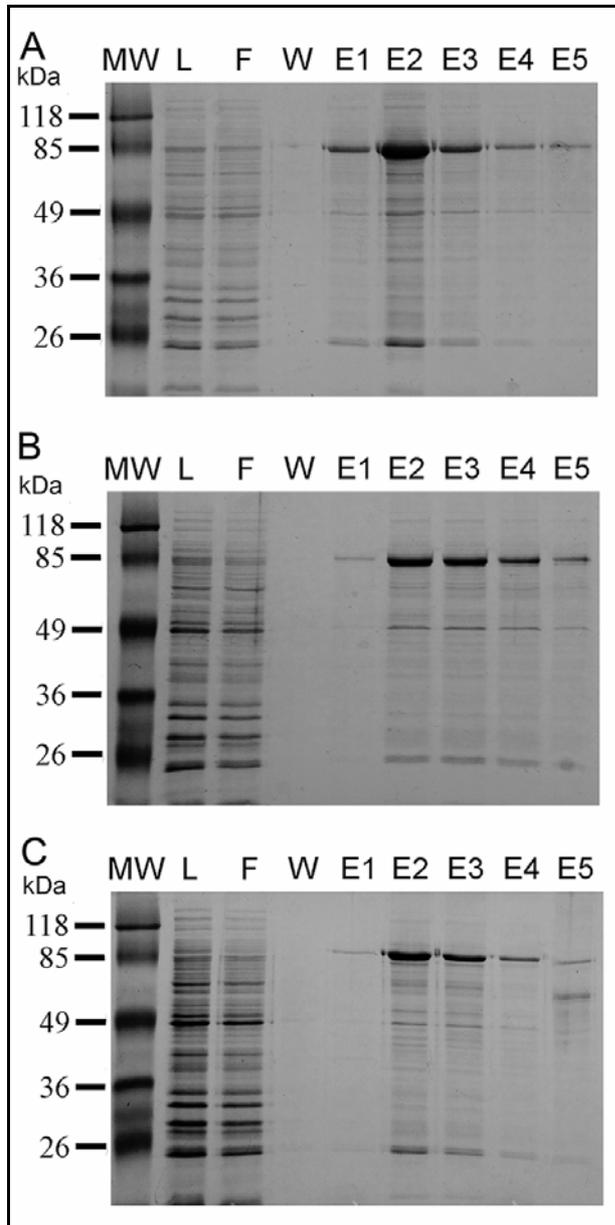


Figure 51: Purification de HMA1, PAA1 et HMA1 AKT.

Les purifications de HMA1, PAA1 et de HMA1-AKT (A, B et C respectivement) sont effectuées en utilisant une matrice de sépharose *Strep-Tactin*. Les milieux utilisés contiennent du TCEP 100 μ M et du DDM 0,1 % (p/v). Les protéines solubilisées (L) sont incubées sur la nuit avec la matrice. Après une étape de rinçage de la matrice, les protéines fixées à la matrice sont éluées par ajout de desthiobiotine. F : fraction de protéines non retenues, W : lavage, E1 à E5 : fractions d'éluions. Les fractions (10 μ L pour les fractions L, F et W, 20 μ L pour les fractions d'éluion E1 à E5) sont analysées par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

L'analyse par immunomarquage des différentes fractions obtenues lors de la purification des deux ATPases indique que les protéines d'intérêt sont majoritairement retenues sur la résine *Strep-tactin* et qu'elles ne sont pas éluées lors des étapes de lavage (non montré). L'analyse des profils protéiques des fractions L et F (Figure 51) montre en revanche que la majeure partie des protéines solubilisées n'est pas retenue sur la résine. Les protéines d'intérêt sont éluées après ajout de desthiobiotine. D'après la figure 51, le rendement de purification est de

l'ordre de 30 % pour HMA1 (Figure 51, A) et de 10 % pour PAA1 et HMA1-AKT (Figure 51, B et C). Bien que ces protéines ne soient pas purifiées à homogénéité, leur facteur d'enrichissement dans les fractions d'élutions est très élevé (de l'ordre de 80 %). Les quantités obtenues ainsi que le niveau de pureté de HMA1 et de PAA1 sont compatibles avec une caractérisation biochimique. A partir d'un litre de culture, nous pouvons donc obtenir 90 à 300 µg de HMA1 et de 30 à 90 µg de protéine PAA1 et HMA1-AKT.

C. Conclusion

Nous avons réussi à déterminer des conditions de solubilisation et de purification de la protéine HMA1 (à partir de membranes de *Lactococcus*) qui permettent d'obtenir des quantités de protéine compatibles avec des analyses biochimiques. Nous avons montré que ces protocoles peuvent s'appliquer aussi aux protéines PAA1 et HMA1-AKT avec des rendements de solubilisation et de purification similaires. Lors de l'optimisation de ces protocoles, nous avons dû minimiser les étapes ou conditions qui pouvaient induire une dénaturation des protéines, comme par exemple des concentrations trop élevées de détergent ou encore l'étape de sonication des membranes utilisée à l'origine pour augmenter le rendement de solubilisation.

IV. CONCLUSION - DISCUSSION

Lactococcus lactis s'avère être un système d'expression efficace pour la production de protéines membranaires de plantes. D'après les données disponibles dans la littérature, c'est la première fois que des ATPases de type P_{1B} de plantes sont produites, sous forme mature, dans un système procaryote et avec un taux de production compatible avec des analyses biochimiques. A ce jour, seule la partie C-terminale de HMA2 a été produite en système procaryote (Eren & Arguello, 2004). L'expression de l'ATPase AtHMA4 permet de compléter le mutant de *E. coli zntA*, mutant qui est affecté dans l'export de zinc (Mills *et al.*, 2003). AtHMA4 est donc exprimée chez *E. coli*, cependant, aucune autre étude n'a ensuite été réalisée sur la protéine recombinante produite, suggérant que le rendement de production obtenu était probablement insuffisant pour réaliser des études biochimiques.

Les problèmes d'expression de ce type de protéines chez *E. coli* peuvent provenir de leur toxicité lorsqu'elles sont exprimées dans la bactérie. Cette toxicité peut résulter de la présence d'une quantité importante de protéines dans la membrane et/ou de l'impact de ces ATPases sur l'homéostasie des cations dans la cellule. Les rendements de production que nous avons obtenus (0,2 à 3 %) sont similaires à ceux obtenus par Kunji et collaborateurs (2003) pour l'expression de protéines membranaires eucaryotes. A partir d'un litre de culture, nous obtenons 30 mg de protéines membranaires contenant 300 à 900 µg de protéine recombinante. Les ATPases HMA1, HMA3 et HMA4 ont toutes les trois été exprimées dans le système eucaryote levure (Gravot *et al.*, 2004; Verret *et al.*, 2004 ; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006).

Cependant, dans ce système, elles ne sont pas produites en quantité suffisante pour effectuer ensuite des analyses biochimique et structurales. Ainsi, *Lactococcus* est donc un système approprié pour l'expression de ce type de protéines.

D'après Mierau & Kleerebezem (2005), la probabilité d'exprimer une protéine recombinante en système hétérologue est d'autant plus importante que le contenu en GC du gène correspondant est proche de celui des gènes de l'hôte. Les rendements de production obtenus pour les protéines membranaires d'*Arabidopsis* résultent peut être de contenu similaire en GC entre les génomes d'*A. thaliana* (36 % ; The AGI, 2000) et de *L. lactis* (35 % Schleifer *et al.*, 1985).

Les quantités de protéines recombinantes obtenues étaient compatibles avec leur purification. Nous avons donc dû optimiser les conditions de solubilisation de ces protéines afin de pouvoir les purifier. Ces ATPases appartiennent à la famille des ATPases de type P dont certaines ont été bien étudiées comme l'ATPase calcium SERCA, caractérisée biochimiquement et cristallisée après expression en système hétérologue levure (Marchand *et al.*, 2008). Les détergents utilisés pour la solubilisation de cette ATPase sont le DDM et/ou le C₁₂E₈ qui n'altèrent pas l'intégrité et l'activité de cette protéine (Jidenko *et al.*, 2005). La combinaison de ces deux détergents nous a permis de solubiliser HMA1 et PAA1 avec un rendement de plus de 90 %. La purification par affinité de ces protéines a ensuite été réalisée grâce à la présence de l'étiquette *Strep*-tag II placée en C-terminal des protéines. A notre connaissance, c'est la première fois que des ATPases de type P_{1B} issues de plante sont purifiées sous forme mature. La littérature fait référence de la purification de HMA4 de *T. caerulescens* (Parameswaran *et al.*, 2007). Cependant les auteurs ont purifié une ATPase composée de deux fragments suggérant que cette protéine subit un clivage post traductionnel *in planta*. Après optimisation des conditions de purification, nous arrivons à obtenir entre 90 à 300 µg de protéines HMA1. Bien que la protéine ne soit pure qu'à 80 %, ces fractions peuvent être utilisées pour des analyses biochimiques ainsi que pour des premiers essais de cristallisation. Les protocoles et les techniques mises au point pour l'expression de protéines membranaires chez *L. lactis* ont fait l'objet d'un chapitre d'ouvrage (Frelet-Barrand *et al.*, 2009) et les résultats obtenus pour l'expression de diverses protéines membranaires chez *L. lactis* a fait l'objet d'un article scientifique (Frelet-Barrand / Boutigny *et al.*, soumis). De plus, le savoir-faire acquis pour l'expression de protéines membranaires chez *L. lactis*, la lyse des bactéries, la purification des membranes, la solubilisation et la purification des ATPases de type P_{1B} fait l'objet d'un transfert de compétence vers d'autres laboratoires impliqués dans le programme CEA-PM, et en particulier le laboratoire d'Alain Vavasseur (iBEB/LEMS) du CEA de Cadarache.

Chapitre III

Vers la caractérisation
fonctionnelle de HMA1 et
PAA1

VERS LA CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE HMA1 ET PAA1

Le chapitre précédent, décrit les étapes de clonage, les essais d'expression, l'optimisation des protocoles et rendements d'extraction des protéines membranaires totales, puis de solubilisation et de purification des ATPases HMA1 et PAA1 produites dans le système *L. lactis*. Au vu de la nature de ces protéines, ces premières données n'étaient pas acquises dans le contexte. Cette avancée méthodologique a donc permis d'initier plusieurs approches visant à caractériser ces deux ATPases par des méthodes plus directes que la complémentation fonctionnelle de mutants de levure ou les analyses des phénotypes des mutants d'*A. thaliana*. Pour l'étude de ces deux protéines, trois niveaux d'analyse ont été explorés :

- Les premières études ont porté sur **l'organisme *L. lactis* entier** exprimant ces deux ATPases.
- Des essais de caractérisation biochimique ont ensuite été réalisés sur **membranes brutes de *L. lactis***, contenant les deux ATPases recombinantes.
- Enfin, d'autres types analyses ont été réalisées sur les **fractions purifiées** de HMA1 et PAA1.

Chacun de ces trois niveaux d'analyse permet d'obtenir des informations complémentaires sur le mode de fonctionnement de HMA1 et de PAA1. Toutes les formes de HMA1 et de PAA1 utilisées dans les expériences présentées dans ce chapitre sont décrites dans la figure 43.

I. IMPACT DE L'EXPRESSION DE HMA1 SUR LA CROISSANCE DE *L. LACTIS*

Afin de déterminer si la protéine HMA1 produite était fonctionnelle lorsque produite chez *L. lactis*, nous avons dans un premier temps analysé l'impact du cuivre sur la croissance des souches de *Lactococcus* exprimant HMA1. L'idée de départ était la suivante : si HMA1 est fonctionnelle et selon son orientation dans la membrane plasmique des bactéries, elle permettra soit de faire entrer soit de faire sortir des métaux induisant ainsi un phénotype de sensibilité ou de résistance aux métaux.

Des expériences similaires pour déterminer la spécificité d'ATPases de type P_{1B} chez *E. Coli* ont été publiées très récemment (Lewinson *et al.*, 2009)

A. Impact de l'expression de HMA1 et de PAA1 sur la sensibilité au cuivre de *L. lactis*

Pour cette étude, l'impact du cuivre sur des souches de *L. lactis* exprimant HMA1 est déterminé en suivant la croissance de ces bactéries. Pour cela, les bactéries sont cultivées dans un milieu supplémenté ou non en cuivre, et le taux de division des bactéries est suivi par des mesures de DO à 600 nm effectuées régulièrement.

La figure 52 présente les courbes de croissance obtenues pour une souche bactérienne exprimant HMA1 sur un milieu dépourvu de cuivre (Figure 52, symboles ronds) ou en présence de cuivre 20 μM (Figure 52, symboles croix). Lorsque la DO à 600 nm atteint 0,4, l'expression de HMA1 est induite par ajout de nisine dans le milieu de culture. Nous pouvons voir que l'ajout de nisine induit une phase de latence dans la phase exponentielle de croissance des bactéries.

Après 45 min d'expression, du cuivre est ajouté dans le milieu de culture. Le cuivre n'est pas ajouté immédiatement dans le milieu de culture pour laisser le temps aux bactéries d'exprimer HMA1.

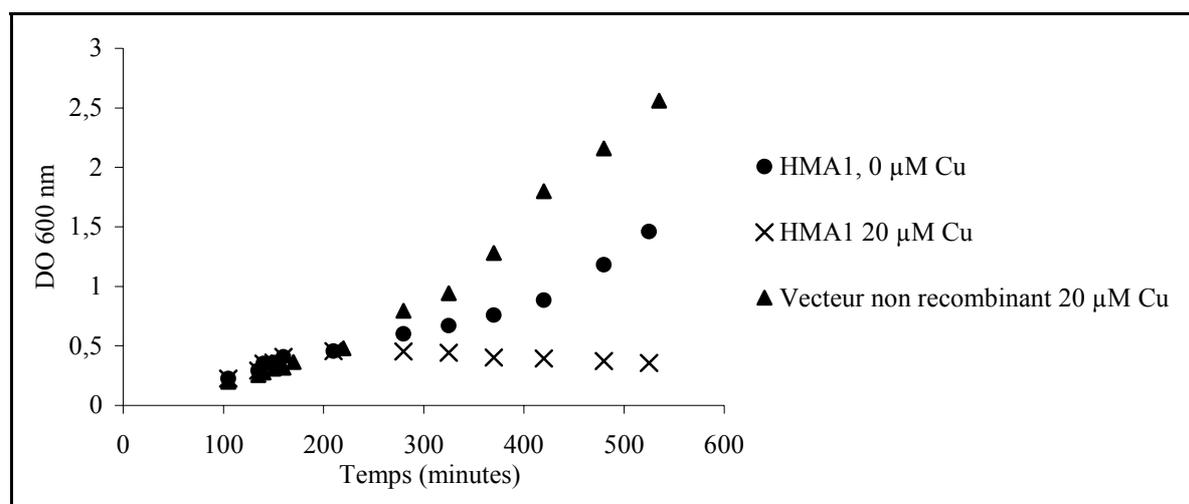


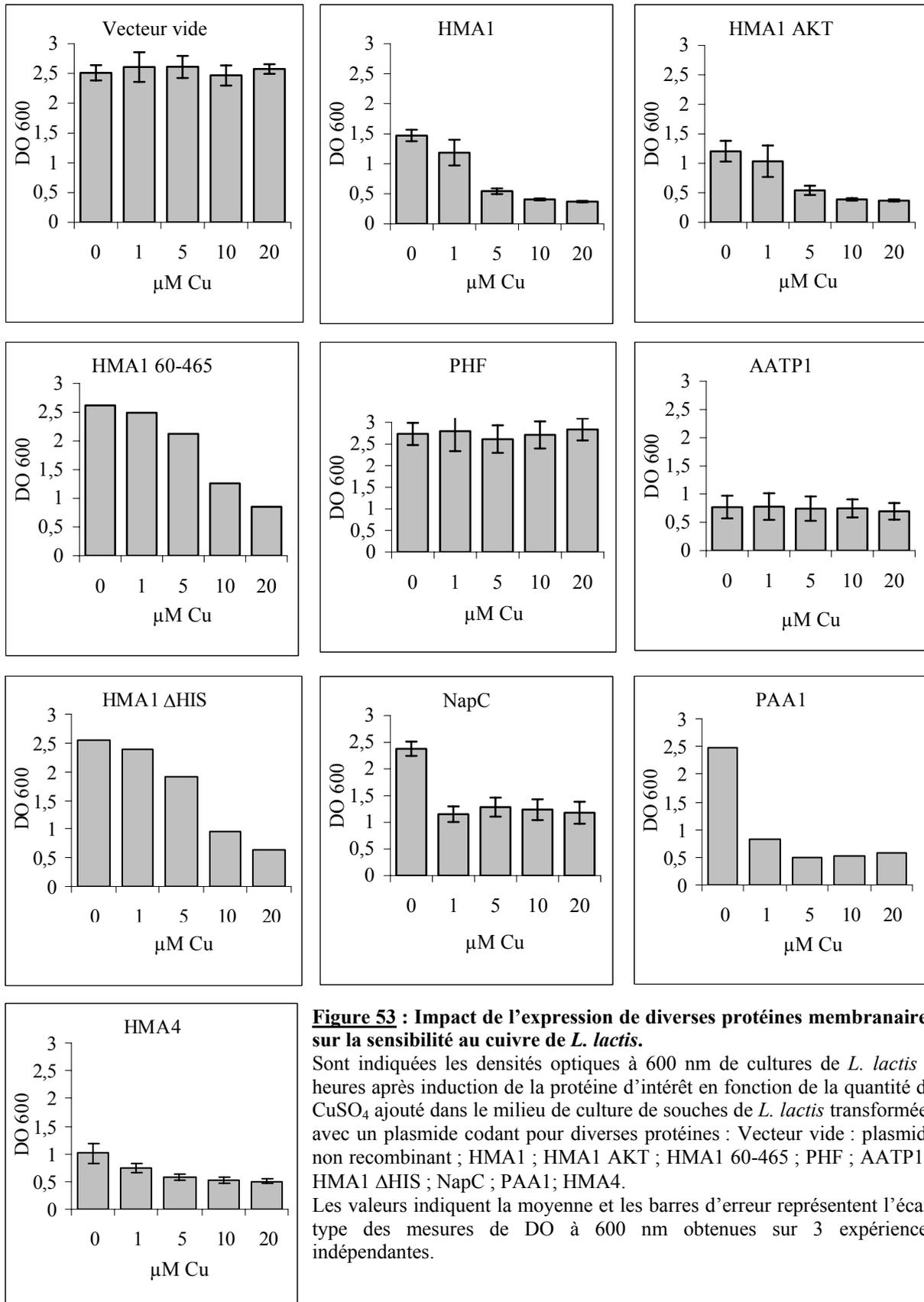
Figure 52 : Impact de l'expression de HMA1 sur la sensibilité au cuivre de *L. lactis*.

Une culture de 250 mL de milieu M17 contenant 1 % (p/v) de glucose et 10 $\mu\text{g/mL}$ de chloramphénicol est inoculée ($t = 0$) par 8 mL d'une préculture à saturation de *L. lactis* transformée par les plasmides pNZ8148 non recombinant ou contenant l'ADNc codant pour HMA1. Lorsque la DO à 600 nm atteint 0,5, l'expression de la protéine d'intérêt est initiée par l'ajout de 625 μL de nisine. Après 45 min d'expression, la culture est séparée en sous-cultures de 50 mL dans lesquelles du cuivre est ajouté à différentes concentrations (0 et 20 μM CuSO_4). La DO est mesurée régulièrement. 6 h après l'induction les cultures sont centrifugées, le surnageant est éliminé et le culot bactérien est conservé à -20°C pour analyses ultérieures.

Suite à l'ajout de cuivre (20 μM), nous observons une diminution de l'absorbance à 600 nm de la culture des bactéries indiquant que la croissance de ces bactéries est très fortement ralentie voire arrêtée. Cet arrêt de croissance n'est pas observé pour des bactéries exprimant un plasmide non recombinant (Figure 52). Nous pouvons conclure de cette expérience que cette concentration de cuivre (20 μM) est toxique pour des bactéries exprimant HMA1. Or, d'après Magnani et collaborateurs (2008), *L. lactis* peut se multiplier sur un milieu contenant du cuivre jusqu'à une concentration de 2 mM (Magnani *et al.*, 2008 ; Tong *et al.*, 2002). L'arrêt de croissance observé suggère donc que, dans ce système, HMA1 est active et catalyse le transport du cuivre en induisant une toxicité. Il est intéressant de noter que ces essais ont été réalisés en anaérobie, suggérant que le cuivre transporté pourrait être sous la forme 1^+ .

Afin de valider que la toxicité induite était bien liée à la fonction de HMA1, nous avons analysé l'impact de l'expression de formes mutées de HMA1 (HMA1-AKT, HMA1 Δ His et

HMA1 60-465, voir chapitre précédent Figure 43) mais aussi d'autres protéines membranaires (contrôles) sur la croissance des bactéries en présence de cuivre.



- Les bactéries transformées par un **vecteur non recombinant** (Figure 53, Vecteur vide) ne sont pas sensibles aux concentrations en cuivre utilisées. En effet, la croissance de ces bactéries est identique quelque soit la concentration en cuivre dans un milieu.
- Au contraire, l'expression de **la forme mature de HMA1** chez *L. lactis* confère une sensibilité au cuivre pour des concentrations supérieures à 1 μM (Figure 53, HMA1). Plus la concentration en cuivre augmente dans le milieu de culture, plus la croissance des bactéries est inhibée. Le $K_{0,5}$ apparent pour les bactéries est compris entre 1 et 5 μM CuSO_4 . Cette observation couplée au résultat obtenu avec le plasmide non recombinant (Figure 53, Vecteur vide), suggère que c'est bien HMA1 qui confère la sensibilité au cuivre.
- Nous avons alors testé l'expression de **HMA1-AKT, c'est-à-dire la protéine mutée au niveau de son site de phosphorylation** (DKTGT devient AKTGT), mutation qui inactive la protéine (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). De façon surprenante, l'expression de cette forme inactive de la protéine (Figure 53, HMA1-AKT) affecte la croissance des bactéries cultivées en présence de cuivre. Cette sensibilité est observée pour des concentrations en cuivre supérieures à 1 μM , comme cela est observé pour les bactéries exprimant HMA1 mature.
- Afin de valider le phénotype obtenu avec les bactéries exprimant HMA1-AKT, ces mesures ont été effectuées avec une **forme tronquée de HMA1** (seuls les 405 premiers acides aminés de la forme mature sont exprimés), qui devrait aussi être inactive. La figure 53 montre que l'expression de cette forme de HMA1 confère aussi à *L. lactis* une sensibilité au cuivre mais pour des concentrations en cuivre supérieures à 5 μM (Figure 53, HMA1 60-465).
- Ces différents contrôles suggèrent que la toxicité observée est liée à la présence et non pas à l'activité de HMA1. Nous avons alors analysé l'impact de l'expression de **deux protéines membranaires qui ne sont pas impliquées dans le transport des métaux** : les protéines **PHF** (protéine d'*Arabidopsis* produite chez *L. lactis* dans le cadre du projet CEA-PM contenant une hélice transmembranaire prédite) et **AATP1** (transporteur ATP/ADP du chloroplaste d'*Arabidopsis* contenant 12 hélices transmembranaires prédites). La figure 53 montre que l'expression de ces deux protéines dans *L. lactis* n'induit pas de sensibilité au cuivre (Figure 53, PHF et AATP1). Ces résultats suggèrent donc que les effets observés précédemment étaient effectivement liés à la présence de HMA1.
- HMA1 possède une extrémité *N*-terminale riche en histidines, acides-aminés qui sont impliqués dans la liaison aux métaux comme le cuivre. La fixation du cuivre à ce domaine pourrait augmenter localement la concentration du cuivre et avoir un impact sur la croissance des bactéries en provoquant un stress oxydatif, indépendant de son import dans la cellule. Cette hypothèse a été testée en exprimant une forme de **HMA1 dépourvue de sa séquence riche en histidines**. L'expression de **HMA1 Δ His** confère aussi une sensibilité au cuivre suggérant que la présence des histidines n'est pas à l'origine du phénotype observé (Figure 53, HMA1 Δ His). La toxicité induite par l'expression de HMA1 Δ His est similaire à celle observée pour les bactéries exprimant la forme tronquée de HMA1.

- Il est cependant possible que le cuivre puisse se fixer sur un autre motif de liaison aux métaux encore non identifié. Nous avons alors réalisées ces expériences avec **une protéine contenant un domaine transmembranaire et quatre motifs CXXC** (Protéine NapC de *Rhodobacter sphaeroides* produite chez *L. lactis* dans le cadre du projet CEA-PM). Cette protéine peut lier du cuivre (4 molécules par peptide) mais ne peut pas le transporter de part et d'autre d'une membrane biologique. L'expression de cette protéine chez *L. lactis* induit une diminution de leur croissance dès l'ajout de faibles concentrations en cuivre ($< 1\mu\text{M}$). L'inhibition de croissance observée est différente de celle obtenue lorsque les bactéries expriment HMA1. En effet, contrairement à l'expression des différentes formes de HMA1 qui entraînent une toxicité qui augmente lorsque la concentration de cuivre augmente dans le milieu, l'expression de la protéine NapC entraîne une sensibilité au cuivre qui est identique quelque soit la concentration en cuivre présente dans le milieu. Ceci suggère que les mécanismes conduisant à cette inhibition de croissance sont probablement différents. Dans le cas de la protéine NapC, le grand nombre de sites de liaison au cuivre entraîne probablement une augmentation de la concentration locale en cuivre toxique pour les bactéries.

- Ces différents résultats cités plus haut ne permettent pas de déterminer si seule la présence de HMA1 induit la toxicité observée, ou si l'activité de HMA1 participe effectivement à cette toxicité lorsqu'elle est produite chez *L. lactis*. Nous avons analysé l'impact de l'expression de **deux autres ATPases d'Arabidopsis : PAA1/HMA6** qui est impliquée dans le transport du cuivre et **HMA4** impliquée dans le transport du zinc, du cadmium et du plomb. Les résultats obtenus (Figure 53 PAA1 et HMA4) montrent que l'expression de HMA4 induit une légère toxicité (20 % d'inhibition de la croissance) qui semble peu dépendante de la concentration en cuivre dans le milieu. En revanche, l'expression de PAA1 induit une forte sensibilité pour de faibles concentrations en cuivre (dès $1\mu\text{M}$), et augmente avec la concentration en cuivre. La toxicité observée pour l'expression de HMA4 pourrait être due à la liaison de cuivre sur les histines ou des sites de liaison aux métaux présents dans la séquence de HMA4. Cette toxicité serait donc aussi indépendante d'un transport du cuivre à l'intérieur de la cellule.

Il est possible que seules les bactéries exprimant HMA1 fonctionnelle et PAA1 présentent une accumulation cytoplasmique de cuivre alors que la toxicité induite pour les bactéries exprimant des formes mutées de HMA1 ou les protéines NapC et HMA4 ne serait liée qu'à un stress oxydant au niveau de la membrane plasmique. Afin de répondre à cette question, nous avons donc effectué des dosages de cuivre dans les culots bactériens récoltés à la fin de ces expériences. L'objectif de ces expériences était de distinguer une accumulation de cuivre cytoplasmique ou une accumulation au niveau de la paroi de peptidoglycane.

B. Impact de l'expression de HMA1 et de PAA1 sur la concentration intracellulaire de cuivre de *L. lactis*.

Pour réaliser ces expériences, nous avons cultivé, en présence de différentes concentrations de cuivre dans le milieu, les souches de bactéries exprimant les différentes protéines analysées précédemment, puis ces bactéries ont été récoltées après 6 h d'expression. Nous avons alors dosé le cuivre contenu dans ces culots par ICP-MS. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Corine Rivasseau (LPCV).

La figure 54 montre que des bactéries transformées par un **plasmide non recombinant** (Figure 54, vecteur vide) ou par un plasmide contenant l'ADNc codant pour les protéines membranaires **PHF et AATP1** (protéines n'ayant aucun lien avec l'homéostasie des métaux) n'accumulent que peu de cuivre (Figure 54, PHF et AATP1). Cette quantité augmente légèrement lorsque les bactéries ont été cultivées en présence de plus forte concentration en cuivre. Ceci est probablement dû au cuivre qui contamine les culots de bactéries. Des résultats similaires sont obtenus avec la protéine **NapC** (Figure 54, NapC). Cependant, la quantité de cuivre est un plus importante (environ 100 pmoles au lieu de 20), ce qui résulte probablement de la capacité de cette protéine membranaire à lier du cuivre et donc à l'accumuler au niveau des membranes. Cette augmentation est dépendante de la quantité de cuivre ajoutée dans le milieu de culture des bactéries. Ce résultat indique que l'expression d'une protéine pouvant lier ce métal induit une sensibilité des bactéries vis-à-vis du cuivre sans que cela ne soit corrélé à son accumulation dans le cytoplasme.

Lorsque la protéine **AATP1** est exprimée, on observe une accumulation de cuivre sans que ceci soit corrélé avec une sensibilité au cuivre de ces bactéries (Figure 54, AATP1). Toutefois, au vu des fortes variations observées entre les différentes expériences, ces conclusions peuvent être discutées.

De façon surprenante, des bactéries exprimant l'**ATPase à zinc HMA4** présentent une forte accumulation de cuivre dépendante de la quantité de cuivre ajoutée dans le milieu de culture (Figure 54, HMA4) alors que ce métal n'est pas prédit pour être transporté par cette protéine (Mills *et al.*, 2003). Le même résultat est obtenu lorsque les bactéries *L. lactis* expriment **HMA1** et la **forme inactive de HMA1** (Figure 54 HMA1 et HMA1-AKT). L'estimation de la concentration en cuivre dans les bactéries exprimant HMA1 ou HMA1-AKT est de l'ordre de 2 mM pour une concentration en cuivre dans le milieu de 20 μ M CuSO₄. D'après ces expériences, la forme mutée de HMA1 se comporte de la même manière que la protéine native.

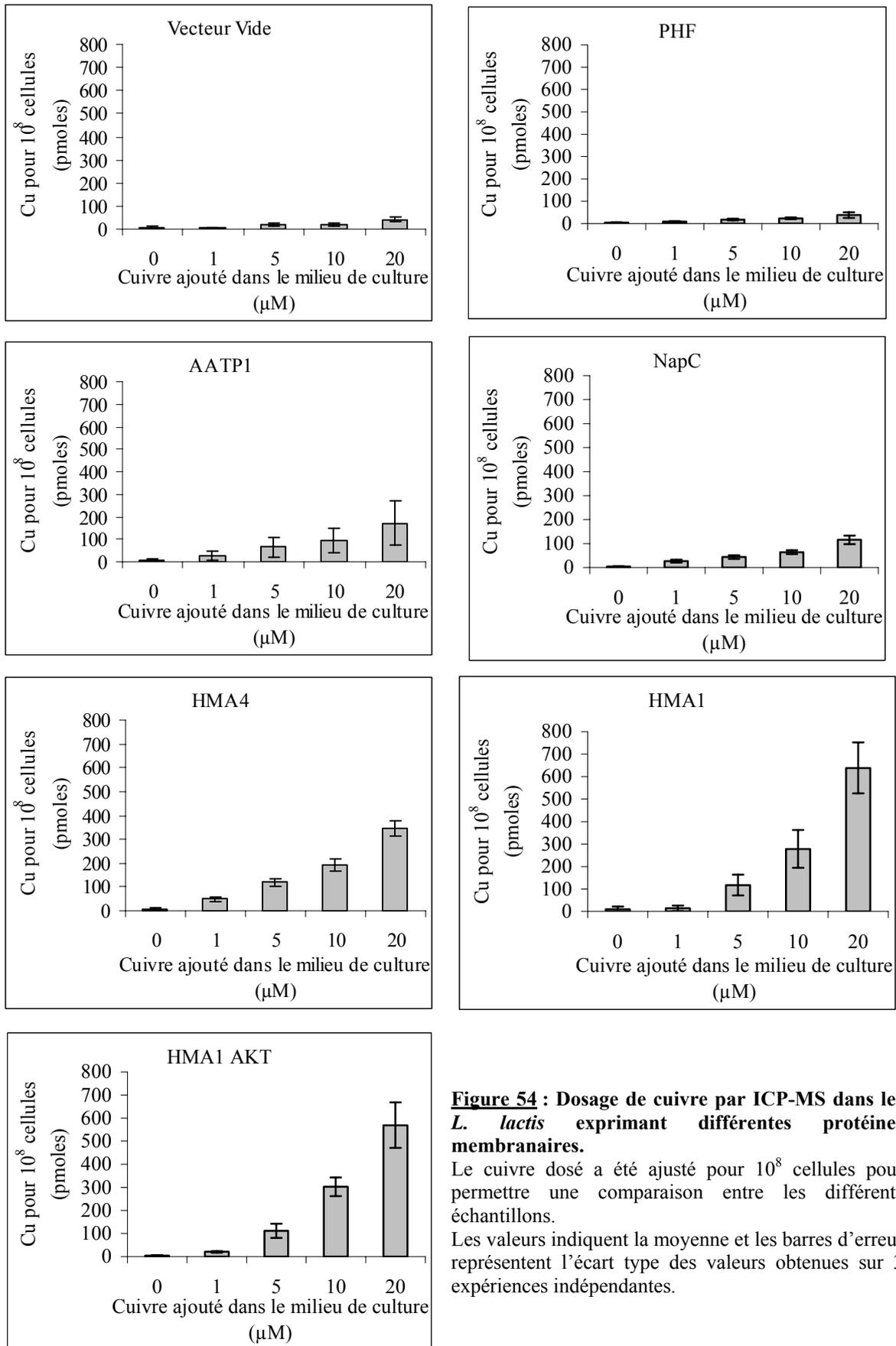


Figure 54 : Dosage de cuivre par ICP-MS dans les *L. lactis* exprimant différentes protéines membranaires.

Le cuivre dosé a été ajusté pour 10⁸ cellules pour permettre une comparaison entre les différents échantillons.

Les valeurs indiquent la moyenne et les barres d'erreur représentent l'écart type des valeurs obtenues sur 3 expériences indépendantes.

La sensibilité au cuivre observée pour les souches de *L. lactis* qui expriment HMA1 ou HMA1-AKT est donc corrélée à une très forte accumulation de cuivre dans le cytoplasme. De plus, l'expression de HMA4, une ATPase de type P_{1B}, qui n'est pas connue pour transporter du cuivre, induit aussi une augmentation de la concentration en cuivre au sein de cytoplasme de ces bactéries. Ces résultats suggèrent que nous observons peut être les effets indirects liés à la présence d'un transporteur de cuivre bactérien (endogène) dont l'expression serait induite par la production des protéines HMA1, HMA1-AKT et HMA4.

Nous pouvons aussi supposer que les mêmes résultats auraient pu être obtenus avec des souches exprimant PAA1 et les formes tronquées de HMA1. En effet, la réponse des bactéries exprimant ces protéines suite à l'ajout de cuivre est similaire à celle observée pour les souches exprimant HMA1 et HMA4, suggérant que les mêmes mécanismes sont peut être en jeu.

C. Analyse du niveau d'expression de *CopA* et *CopB* en réponse à l'expression des protéines HMA1 ou de PAA1 chez *L. lactis*

Les dosages de métaux présentés dans le paragraphe précédent indiquent que l'expression de HMA1 induit l'accumulation d'une très grande quantité de cuivre dans le cytoplasme de *L. lactis*. D'après le travail de Magnani et collaborateurs (Magnani *et al.*, 2008), l'ajout de cuivre dans le milieu de culture de bactéries de type *L. lactis* induit une très forte activation de la transcription des gènes codant pour *CopA* (Q9CHA4) et *CopB* (Q9CH87), deux ATPases de type P_{1B} transportant du cuivre (Odermatt *et al.*, 1993). D'après la littérature, *CopA* serait impliquée dans l'import de cuivre tandis que *CopB* permettrait d'exporter ce métal (Odermatt *et al.*, 1994).

Pour expliquer les résultats présentés dans le paragraphe précédent, nous avons donc cherché à savoir si l'expression de HMA1 chez *L. lactis* induisait la surexpression de ces deux ATPases endogènes *CopA* et *CopB*. Ces expériences ont été effectuées par Annie Frelet-Barrand (LPCV).

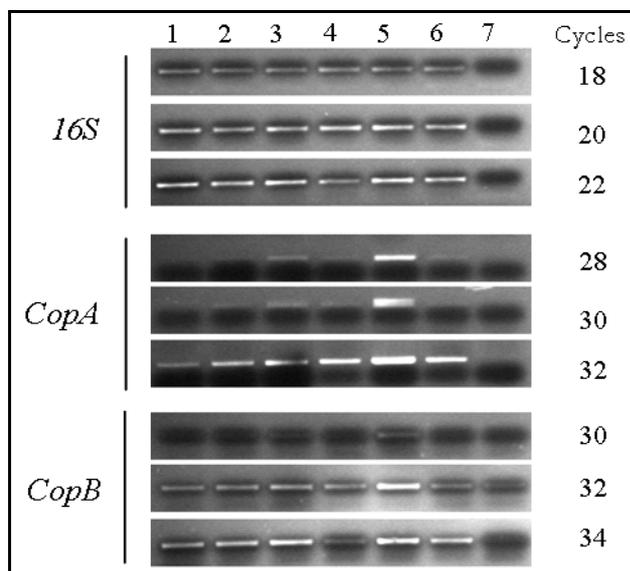


Figure 55 : Analyse de l'expression des transcrits de *CopA* et *CopB* dans des souches de *L. lactis* exprimant HMA1, HMA1-AKT, HMA1 tronquée, HMA4 et PAA1.

L'amplification PCR a été effectuée avec des amorces s'hybridant avec l'ARN ribosomal 16S (contrôle), l'ADNc codant pour *CopA* et l'ADNc codant pour *CopB*.

1 : plasmide non recombinant ; 2 : HMA1 ; 3 : HMA1-AKT ; 4 : HMA1 60-465 ; 5 : HMA4 ; 6 : PAA1 ; 7 : Contrôle négatif (PCR effectuée sans ADN matrice).

Dans cette expérience, les bactéries exprimant les différentes protéines recombinantes sont récoltées après 6h de culture dans un milieu sans ajout supplémentaire de cuivre. Après extraction des ARNs et transcription inverse en ADNc, l'expression de *CopA* et *CopB* est analysée par PCR afin de comparer des variations de niveau de transcription entre les différentes souches. L'amplification de l'ARN 16S est utilisé comme contrôle de charge car son expression est considérée comme stable (Magnani *et al.*, 2008). Le signal correspondant à l'ADN amplifié augmente entre les cycles 18 et 20 indiquant que les prélèvements d'ADN ont été effectués lorsque la réaction de PCR était en phase exponentielle. Dans la piste 7, correspondant à la réaction dans laquelle l'ADN matrice a été omis, aucune amplification n'est observée, indiquant que l'amplification est spécifique.

De façon surprenante, l'expression de *CopA* est fortement augmentée dans les bactéries exprimant HMA4 (Figure 55, piste 5). Ce résultat est surprenant car HMA4 est une ATPase à zinc (Mills *et al.*, 2003) et n'est donc pas supposée transporter du cuivre. L'expression de HMA1 (Figure 55, piste 2), HMA1-AKT (Figure 55, piste 3), HMA1 60-465 (Figure 55, piste 4) et PAA1 (Figure 55, piste 6) induit une légère augmentation du niveau de transcription de *CopA* par rapport à la quantité de transcrits détectés dans la piste contrôle correspondant à la souche bactérienne contenant le plasmide non recombinant (Figure 55, piste 1).

Lorsque l'amplification est effectuée avec les amorces s'hybridant avec *CopB*, on observe une augmentation du signal dans l'échantillon issu des bactéries exprimant HMA4 (Figure 55, piste 5) par rapport l'échantillon de référence (Figure 55, piste 1). A nouveau, si ce résultat peut surprendre car HMA4 n'est pas supposée transporter du cuivre (voir plus haut), dans la mesure où *CopA* et *CopB* sont situés dans le même opéron, ce résultat est en accord avec les résultats obtenus pour *CopA*. Dans les bactéries exprimant HMA4, la surexpression de *CopB* est moins importante que celle observée pour *CopA*. L'expression de *CopB* ne varie pas dans les bactéries exprimant HMA1 (Figure 55, piste 2), HMA1-AKT (Figure 55, piste 3) HMA1 60-465 (Figure 55, piste 4) et PAA1 (Figure 55, piste 6) par rapport à l'échantillon de référence (Figure 55, piste 1).

Au bilan, ces résultats nous indiquent que l'expression de HMA1 et de PAA1 chez *L. lactis* ne semble pas avoir de conséquence sur le niveau de transcription *CopA* et de *CopB*. De façon surprenante, c'est la souche exprimant HMA4 (qui était utilisée ici comme contrôle négatif) qui surexprime les transcrits de *CopA* et de *CopB*.

D. Identification par spectrométrie de masse de protéines potentiellement induites par l'expression de HMA1 chez *L. lactis*

L'analyse par SDS-PAGE des extraits de protéines membranaires bruts issus des souches de *L. lactis* exprimant les différentes protéines montre qu'une protéine s'accumule dans les membranes issues de souches exprimant HMA1 (Figure 56). Cette protéine, d'environ 90 Kda, ne semble pas être présente dans les autres extraits et pourrait donc être induite en

réponse à l'expression de HMA1. L'identité de cette protéine pouvant nous donner des informations sur l'impact de HMA1 lorsqu'elle est surexprimée dans les bactéries *L. lactis*, nous avons cherché à l'identifier.

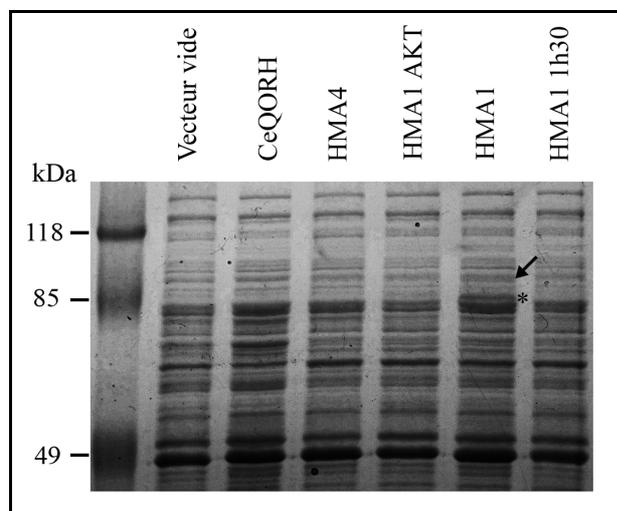


Figure 56 : L'expression de HMA1 chez *L. lactis* induit la surexpression d'une autre protéine.

Les protéines membranaires issues des différentes souches de *L. lactis* sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE (15 µg de protéines par puits) et coloration au bleu de Coomassie. Les protéines analysées sont issues des bactéries transformées par un plasmide non recombinant (vecteur vide) ou un plasmide contenant l'ADNc codant pour ceQORH, HMA4, HMA1-AKT ou HMA1. Toutes les expressions ont été effectuées pendant 4 h sauf pour l'échantillon HMA1-1h30 pour lequel l'expression a duré 1h30. L'astérisque correspond à HMA1 et la flèche correspond à la protéine qui apparaît suite à l'expression de HMA1.

Nous avons obtenu les informations de séquences correspondant aux protéines se trouvant dans une bande voisine de 90 kDa pour chacun des extraits de protéines membranaires. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire d'Etudes de la Dynamique des Protéomes (iRTSV/EDyP, CEA Grenoble).

Dans cette expérience, les contrôles négatifs utilisés sont les extraits de protéines membranaires issus de bactéries transformées par un vecteur non recombinant ou par un vecteur contenant l'ADNc codant pour la protéine ceQORH (Miras *et al.*, 2007). Cette protéine d'*Arabidopsis* n'a pas de rôle dans l'homéostasie du cuivre. Suite aux résultats obtenus sur la croissance des bactéries en présence de cuivre (paragraphe I, A.), nous avons aussi analysé les protéines membranaires issues de bactéries exprimant HMA4 et HMA1-AKT (forme inactive de HMA1). Ces différents extraits de protéines membranaires ont été obtenus après une induction de l'expression des protéines recombinantes pendant 4h. Afin de suivre l'apparition de la protéine détectée dans les protéines membranaires issus des bactéries exprimant HMA1, nous avons aussi analysé un extrait obtenu après seulement 1h30 d'induction.

Le tableau contenant les protéines identifiées est présenté en annexe 3. Cette étude n'a pas permis d'identifier une protéine présente uniquement dans les extraits membranaires issus de bactéries surexprimant HMA1 comme cela était espéré après l'analyse des profils protéiques par SDS-PAGE (Figure 56). Cependant, deux ATPases impliquées dans le transport de cations (par similarité) semblent s'accumuler dans les extraits issus des bactéries exprimant HMA4, HMA1 et HMA1-AKT. Le nombre de peptides détectés pour ces deux protéines étant assez faible, il est difficile de déterminer si ces variations sont significatives. Ces deux protéines étant impliquées dans le transport de cations, elles pourraient être impliquées dans le

phénotype de sensibilité au cuivre observé pour les bactéries exprimant HMA4, HMA1 et les formes mutées de HMA1.

E. Conclusion

Les résultats présentés dans cette partie ne nous permettent pas de mettre en évidence une activité de transport d'ions liée à la protéine HMA1. Nous avons bien observé un impact de la présence de la protéine HMA1 sur la croissance des souches de *L. lactis* ou sur l'accumulation du cuivre dans ces bactéries comparativement aux souches contrôles contenant un vecteur non recombinant. Toutefois, il semble que la forme de HMA1 mutée au niveau de son site DKTGT induise systématiquement les mêmes effets que ceux observés pour la protéine HMA1 mature (voir figures 53 et 54). Ce résultat est d'autant plus surprenant que cette mutation, qui empêche la phosphorylation de l'enzyme lors de son cycle catalytique, inactive la protéine.

L'expression des ATPases HMA1, PAA1 et HMA4 induit une sensibilité des souches de *L. lactis* vis à vis du cuivre. Ce résultat est surprenant pour deux raisons :

- L'expression d'ATPases de type P_{1B} en systèmes hétérologues induit généralement une résistance aux métaux (Liu *et al.*, 2007, Lewinson *et al.*, 2009) en permettant aux organismes d'exporter ces métaux. Toutefois, HMA1 et PAA1 sont des ATPases associées à l'enveloppe des chloroplastes et sont impliquées dans l'import de métaux dans cet organe subcellulaire. Il est donc possible que ces ATPases soient intégrées dans la membrane plasmique des bactéries dans une orientation qui est compatible avec l'import des métaux.
- De plus, nous observons que l'expression de HMA4 confère une sensibilité au cuivre alors que cette protéine n'est pas connue pour transporter du cuivre (Mills *et al.*, 2003).

L'expression des formes mutées de HMA1 (HMA1-AKT, HMA1 Δ His et HMA1 60-465) entraînant aussi une sensibilité au cuivre, nous avons dosé le cuivre contenu dans les culots bactériens récoltés après 6h d'expression. L'objectif était de pouvoir déterminer si la toxicité observée était liée à une accumulation de cuivre dans la cellule ou à une augmentation de la concentration en cuivre au niveau de la membrane plasmique entraînant un stress oxydatif. Les dosages de métaux réalisés par ICP-MS montrent que l'expression de HMA1, HMA4, PAA1 et des formes mutées de HMA1 induit une accumulation de cuivre dans le cytoplasme des bactéries. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- HMA4 et HMA1-AKT ne pouvant théoriquement pas transporter de cuivre, il est possible qu'en présence d'une forte concentration en cuivre et après plusieurs heures d'exposition au métal, ces protéines se comportent comme des porines induisant alors 1) un transport du cuivre sans utilisation d'ATP pour HMA1-AKT, et 2) une perte de la sélectivité ionique pour HMA4. Cette hypothèse pourrait être facilement vérifiée en effectuant les dosages après des

cinétiques d'expression beaucoup plus courtes pour essayer de distinguer une constante catalytique et une constante diffusionnelle dans l'accumulation des métaux.

- La deuxième hypothèse est que l'expression de ces ATPases chez *L. lactis* induit la surexpression de protéines liées à l'homéostasie du cuivre. Les ATPases de type P_{1B} CopA et CopB sont impliquées dans le transport du cuivre. Des homologues de ces protéines sont présents chez *Lactococcus* et il a été montré que leur niveau d'expression augmente en réponse à un excès de cuivre dans le milieu environnant les bactéries (Magnani *et al.*, 2008). Nous avons analysé par RT-PCR le niveau d'expression de *CopA* et *CopB* dans les bactéries exprimant les diverses protéines recombinantes en comparaison avec des bactéries transformées avec un vecteur non recombinant. Ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation du niveau de transcription de *CopA* et de *CopB* dans des bactéries exprimant HMA1 ou PAA1. En revanche, une augmentation de l'expression de *CopA* et *CopB* est observée pour les bactéries exprimant HMA4. HMA4 étant impliquée dans l'homéostasie du zinc, cette augmentation est probablement un effet indirect qui reste inexplicé pour l'instant. L'expression de *CopA* et de *CopB* étant induite par le cuivre, elle peut être directement liée à l'expression des protéines HMA1 et PAA1 si ces dernières sont actives dans les membranes de *Lactococcus*. Au contraire, cette réponse peut être indirectement reliée à l'expression des protéines HMA1 et PAA1 si ces deux ATPases sont inactives mais induisent un import de cuivre via les transporteurs de type CopT. Aucune variation des niveaux des transcrits *CopA* et *CopB* n'a été détectée dans les bactéries exprimant HMA1 et PAA1 lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu non supplémenté en cuivre. Il est donc possible que les concentrations en cuivre dans le milieu de culture soient trop faibles pour observer un import de cuivre. En effet, les dosages de métaux par ICP-MS n'indiquent pas de hausse significative de la concentration en cuivre dans les échantillons de *L. lactis* exprimant ces protéines dans un milieu non supplémenté en cuivre. Nous avons choisi ces conditions de culture car nous voulions observer des variations de transcription de *CopA* et *CopB* induites par l'expression de HMA1, PAA1 ou HMA4 et ne résultant pas des concentrations importantes de cuivre dans le milieu. Il serait intéressant de reproduire ces expériences dans des conditions de concentrations en cuivre permettant à la fois une faible induction de l'expression de *CopA* et *CopB* dans des bactéries sauvages mais permettant une accumulation suffisante de cuivre dans les bactéries exprimant HMA1, PAA1 pour voir l'impact de ce transport sur l'expression de *CopA* et *CopB*. Enfin, l'expression des transcrits peut être découplée de la quantité de protéine produite. La quantification des protéines CopA et CopB présentes dans les bactéries exprimant HMA1, PAA1 et HMA4, pourrait être effectuée par immunomarquage ou par spectrométrie de masse.

Au final, l'ensemble des expériences réalisées dans cette partie ne nous a pas permis de démontrer de façon définitive que la protéine HMA1 exprimée chez *Lactococcus* était active. Nous avons donc cherché à mesurer directement l'activité des protéines HMA1 et de PAA1

dans des extraits de protéines membranaires issus de bactéries surexprimant ces protéines et sur les protéines recombinantes HMA1 et PAA1 purifiées.

II. MESURE DE L'ACTIVITE ATPASIQUE DE HMA1 ET DE PAA1

Les ATPases de type P sont caractérisées par leur capacité à hydrolyser une molécule d'ATP lors de leur cycle catalytique. Cette hydrolyse d'ATP permet de fournir l'énergie nécessaire au transport du métal de part et d'autre d'une membrane biologique. Une méthode permettant de suivre l'activité de transport d'une ATPase de type P repose donc sur la mesure de cette activité d'hydrolyse d'ATP corrélée avec la translocation du métal de part et d'autre d'une membrane (voir introduction, Figure 8).

A. Mesure d'activité ATPase à l'aide d'un système couplé

La première technique utilisée pour mesurer l'activité d'hydrolyse d'ATP d'un échantillon est basée sur un système couplé d'oxydation du NADH dépendant de l'ADP. Lorsque qu'une molécule d'ATP est hydrolysée, sa régénération à partir d'ADP et de phosphoenolpyruvate nécessite la consommation d'une molécule de NADH dont la disparition peut être suivie à l'aide d'un spectrophotomètre (voir matériel et méthodes). Ce système, décrit par Blumwald et Poole a permis de mesurer l'activité d'hydrolyse d'ATP de protéines (Blumwald & Poole, 1985) et en particulier de SERCA1, une ATPase de type P transportant du calcium (Falson *et al.*, 1997). Ce système a aussi été utilisé pour mesurer l'activité de HMA1 à partir de préparations d'enveloppe de chloroplastes purifiées (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Ce système de régénération d'ATP permet de suivre une activité ATPasique en temps réel et permet l'ajout successif de molécules d'intérêts.

1. Mesure d'activité ATPase sur des extraits de protéines membranaires issus de souches de *L. lactis* après expression de HMA1

Afin de révéler l'activité ATPase due à HMA1 dans des extraits membranaires bruts après expression de la protéine d'intérêt, les mesures sont effectuées sur des membranes issues de bactéries transformées avec un plasmide contenant l'ADNc codant HMA1 et ces activités sont comparées à celles obtenues sur des membranes issues de bactéries transformées avec un plasmide non recombinant.

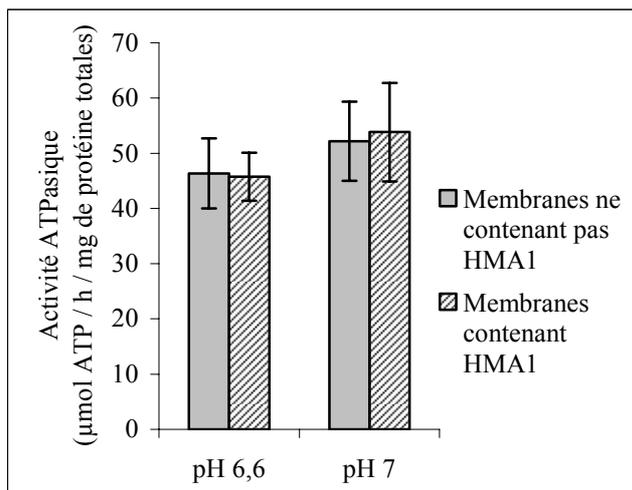


Figure 57 : Comparaison des activités ATPases totales de protéines membranaires issues de bactéries transformées par un plasmide non recombinant et de bactéries exprimant HMA1.

Les protéines membranaires (20 µg/µl) sont ajoutées au mélange réactionnel contenant du Tris/MES 30 mM pH 6,6 ou pH 7 ; du KCl 50 mM ; du MgSO₄ 3 mM ; du PEP 3 mM ; du NADH 0,150 mM ; de la pyruvate kinase 3 U/mL ; de la lactate déshydrogénase 3 U/mL ; du DTT 2,5 mM et du CuSO₄ 10 µM. La réaction est initiée par l'ajout d'ATP 0,6 mM. La réaction se déroule pendant 4 min. Les valeurs représentent les moyennes obtenues pour 3 expériences indépendantes.

Comme le montre la figure 57, aucune différence significative d'activité n'est observée entre les différentes membranes lorsque les mesures sont effectuées en présence de 10 µM CuSO₄ et 2,5 mM DTT, à pH 6,6 ou pH 7. L'ajout de DTT dans le milieu permet d'être en condition réductrice et de travailler en présence de cuivre sous forme 1+. D'autres conditions expérimentales ont été testées, incluant des concentrations variables en cuivre et en DTT ainsi que différents pH. Cependant, aucune de ces conditions n'a permis de détecter une différence significative d'activité ATPase entre les deux types de membranes (non montré). L'ajout d'autres métaux comme le zinc et le calcium a aussi été testé mais sans succès. Le tampon Tris-HCl pouvant agir comme un chélateur de métaux, nous avons renouvelé ces tests en présence d'un tampon Hepes, mais cela n'a pas eu d'impact sur les activités mesurées.

La figure 57 montre que les ATPases endogènes présentes dans les membranes de *L. lactis* ont une activité de base d'environ 50 µmoles d'ATP consommé / h / mg de protéines totales. Cette activité résulte de la présence, dans la membrane plasmique de *Lactococcus*, de nombreux de transporteurs nécessitant de l'ATP pour leur activité comme les ATPases de type P, mais aussi les ATPases à proton et les transporteurs ABC (Pour revue, lire Van Veen *et al.*, 1999 ; van den Berg van Saparoea *et al.*, 2005). L'utilisation d'inhibiteurs comme le DCCD (dicyclohexylcarbodiimide) permettant d'inhiber l'activité des ATP synthases ne nous a pas permis de diminuer l'activité endogène mesurée. L'ajout de vanadate, un inhibiteur des ATPases de type P et des transporteurs ABC, ne permet pas non plus de diminuer l'activité ATPase endogène.

D'après nos quantifications, HMA1 représente 3 % des protéines membranaires totales lorsqu'elle est produite chez *L. lactis*. Il y a donc environ 30 µg de protéine HMA1 dans 1 mg de protéines membranaires issues de *L. lactis*. D'autre part, les mesures d'activité ATPase effectuées sur l'enveloppe du chloroplaste, suggèrent que HMA1 aurait une activité spécifique de 260 µmoles d'ATP hydrolysé / h / mg de protéine (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Une telle activité représenterait 7,8 µmoles d'ATP consommé / h / mg de protéines membranaires totales soit seulement 16 % de l'activité endogène mesurée dans les

membranes de *L. lactis*. De plus, cette valeur d'activité spécifique de HMA1 a été obtenue avec une protéine insérée dans sa membrane native (la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste). Or, l'environnement lipidique peut influencer sur l'activité mesurée pour une ATPase de type P_{1B}. En effet, les travaux de Chintalapati et collaborateurs sur CtrA2 et CtrA3, deux ATPases à cuivre de *Aquifex aeolicus*, démontrent l'importance des lipides sur l'activité de ces protéines (Chintalapati *et al.*, 2008). L'environnement lipidique de la membrane de *L. lactis* étant différent de celui de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste, nous pouvons penser que cela peut avoir un impact négatif sur l'activité de HMA1. Au bilan, si l'activité spécifique de HMA1 est encore plus faible dans les membranes de *Lactococcus*, elle n'est plus significative par rapport aux activités ATPases endogènes et ne peut donc pas être détectée avec ce système de mesure. L'ATPase à cuivre CopA de *Archaeoglobus fulgidus* a une activité spécifique de 6 μmoles d'ATP hydrolysé / mg de protéine / h lorsqu'elle est exprimée chez *E. coli*. Si HMA1 avait la même activité spécifique que CopA, l'activité estimée pour HMA1 dans 1 mg de protéines membranaires de *L. lactis* serait de 0,18 μmol d'ATP consommé / h soit 0,4 % de l'activité totale mesurée. Une telle variation de différence d'activité ne peut être détectée avec ce système de mesure d'activité ATPase.

2. Mesure d'activité ATPase sur des extraits fortement enrichis en HMA1 et en PAA1

Afin d'éliminer le bruit de fond généré par les ATPases endogènes présentes dans les membranes de *L. lactis*, les mesures d'activité ATPase ont été effectuées sur des fractions fortement enrichies en HMA1. Ces fractions ont été obtenues après solubilisation et purification de HMA1 et de PAA1 par affinité. Dans ces fractions, HMA1 et PAA1 représente environ 80 % des protéines (voir chapitre II).

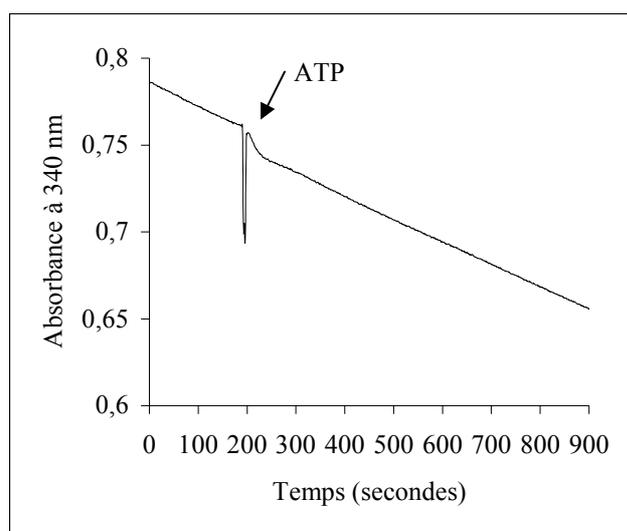


Figure 58 : Dosage de l'oxydation du NADH (corrélé à l'hydrolyse d'ATP) sur des fractions de protéine purifiée.

La protéine HMA1 purifiée (2 μg) est mélangée avec 100 μg de PC (phosphatidylcholine, préalablement portée à ébullition) pendant 20 minutes à 37°C. Ce mélange est ensuite incubé dans 1 mL du milieu réactionnel suivant : Hepes 20 mM pH 7,5 ; KCl 100 mM ; MgSO₄ 3 mM ; PEP 3 mM ; NADH 0,150 mM ; pyruvate kinase 3 U/mL ; lactate déshydrogénase 3 U/mL ; TCEP 0,5 mM ; CuSO₄ 10 μM, DDM 0,02 % (p/v). A t = 200 sec, la réaction est initiée par ajout d'ATP 0,6 mM.

La disparition du NADH (converti en NAD) est suivie par la mesure de l'absorbance à 340 nm.

La figure 58 montre une courbe représentative des mesures d'activité effectuées sur les fractions purifiées contenant HMA1 (ou PAA1) avec le système de couplage. On peut noter

que ce système de mesure n'est pas adapté à ce matériel biologique. En effet, on observe une consommation de NADH (matérialisée par une diminution de l'absorbance à 340 nm) avant même que de l'ATP ne soit ajouté au milieu réactionnel. La consommation de NADH ne devant avoir lieu que pour régénérer l'ATP consommé, le système de couplage ne devrait pas fonctionner tant que l'ATP n'est pas présent dans le milieu réactionnel et hydrolysé par l'activité de HMA1 ou de PAA1. Ce résultat indique donc que ce type de mesure n'est pas adapté aux conditions expérimentales utilisées. De plus nous n'observons pas d'augmentation de la consommation de NADH, après ajout de l'ATP pouvant mettre en évidence une activité d'hydrolyse de ce composé.

La consommation spontanée de NADH peut être expliquée par la présence de grandes quantités d'agent réducteur (TCEP ou DTT) pouvant interférer avec la réaction d'oxydation du NADH. De plus, la présence de détergent dans les fractions enrichies en HMA1 et PAA1 peut avoir un impact sur les enzymes utilisées dans le système de couplage.

Le système enzymatique utilisé pour mesurer l'activité de HMA1 et de PAA1 n'étant pas adapté que ce soit sur des extraits membranaires bruts ou sur des extraits purifiés, l'activité ATPase a été mesurée par une autre méthode.

B. Dosage du phosphate inorganique libéré par hydrolyse de l'ATP

Lanzetta et collaborateurs (1976) ont développé un système de dosage du phosphate inorganique (Pi) permettant sa quantification dans un échantillon biologique. Les ATPases hydrolysent l'ATP en ADP et Pi. Cette activité peut donc être mesurée en dosant le Pi produit dans le milieu réactionnel. Ce système de dosage est généralement utilisé pour caractériser des ATPases de type P_{1B} (Moreno *et al*, 2009 ; Chintalapati *et al*, 2008 ; Mandal *et al.*, 2004).

1. Mesure d'activité ATPase sur des extraits membranaires bruts

Avant de pouvoir déterminer si l'activité de HMA1 et de PAA1 peut être détectée dans un extrait membranaire brut de *L. lactis*, il est nécessaire de mettre au point le système de dosage de Pi pour déterminer sa gamme de réponse et construire une courbe étalon.

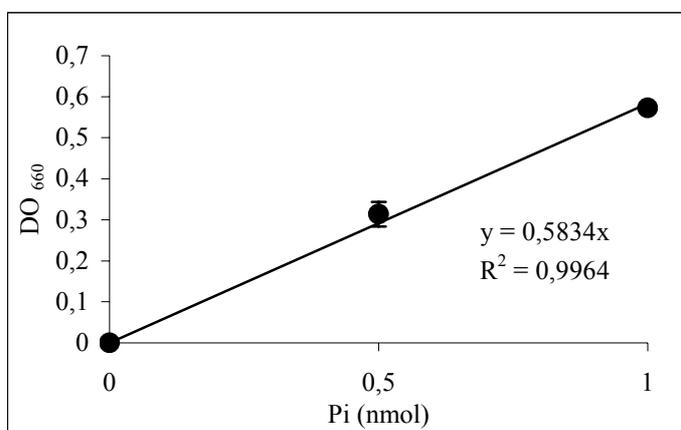


Figure 59 : Courbe étalon établie pour le dosage de phosphate inorganique.

Différentes quantités de KH₂PO₄ (0, 0,5 et 1 nmol) sont ajoutées au milieu réactionnel contenant de la cystéine 20 mM ; du TCEP 100 μM ; du Tris 250 mM pH 7 ; du NaCl 250 mM ; du MgSO₄ 15 mM ; et de l'ATP 15 mM. (Mandal *et al*, 2004). La solution est incubée pendant 10 min à 37°C. Le Pi libéré est mesuré après ajout d'un mélange de vert de malachite et de molybdate d'ammonium. La solution est mélangée au vortex et du citrate de sodium est ajouté. La DO à 660 nm est mesurée. Chaque point représente la valeur moyenne obtenue pour trois expériences indépendantes.

La courbe de dosage de phosphate inorganique présentée dans la figure 59 nous montre que la réponse colorimétrique est linéaire pour les quantités de Pi utilisées. Les barres d'erreur résultant des variations obtenues sur trois expériences indépendantes indiquent que les mesures sont très reproductibles. Cette courbe étalon est ensuite utilisée pour déterminer la quantité de Pi libéré dans nos échantillons protéiques incubés en présence d'ATP. Une mole de Pi produite correspond à une mole d'ATP hydrolysé.

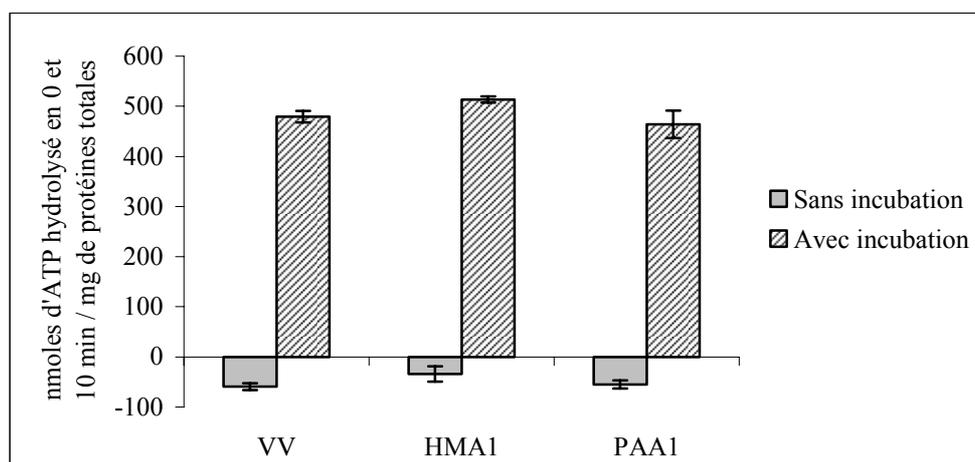


Figure 60 : Une activité d'hydrolyse d'ATP est mesurée dans des extraits membranaires bruts issus de *L. lactis*.

Des extraits membranaires (2 μ g de protéines) provenant de bactéries transformées par un plasmide non recombinant (VV) ou par un plasmide contenant l'ADNc codant pour HMA1 ou PAA1 sont ajoutés au milieu réactionnel contenant de la cystéine 20 mM ; du TCEP 100 μ M ; du Tris 250 mM pH 7 ; du NaCl 250 mM ; du $MgSO_4$ 15 mM ; et de l'ATP 15 mM. La réaction est arrêtée par ajout des solutions de coloration soit immédiatement ($t = 0$), soit après une incubation de 10 min à 37°C. La DO à 660 nm est mesurée. Les valeurs indiquent les moyennes obtenues sur 3 expériences indépendantes.

Les résultats présentés dans la figure 60 indiquent que du Pi est libéré dans le milieu réactionnel lorsque les différents extraits de protéines membranaires sont incubés à 37°C pendant 10 min en présence d'ATP. Les expériences contrôles (Figure 60, $t = 0$) montrent qu'il n'y a pas de Pi produit lorsque la réaction est arrêtée immédiatement après avoir mélangé les extraits protéiques au milieu réactionnel. Dans ces conditions, nous pouvons observer des valeurs négatives d'ATP hydrolysé par mg de protéines totales. Pour effectuer ces dosages au spectrophotomètre, nous utilisons une solution de référence qui contient seulement le milieu réactionnel et les solutions de coloration. Ainsi, les valeurs négatives observées sont probablement dues à une interaction entre les colorants et les lipides ou les protéines, modifiant ainsi l'absorbance de référence. Sachant que la même quantité de protéines et de lipides est utilisée dans chaque test, cette variation d'absorbance n'impacte pas sur les résultats. De plus, cette valeur peut être considérée comme négligeable par rapport à la quantité de Pi présent dans le milieu après 10 minutes d'incubation à 37°C. La quantité de Pi produit lors de la réaction est dépendante du temps d'incubation. En revanche, la quantité de Pi produite est nulle lorsque l'expérience est réalisée avec un échantillon préalablement porté

à ébullition (non montré). Ces résultats suggèrent que la libération de Pi dans le milieu réactionnel est effectivement due à une activité enzymatique.

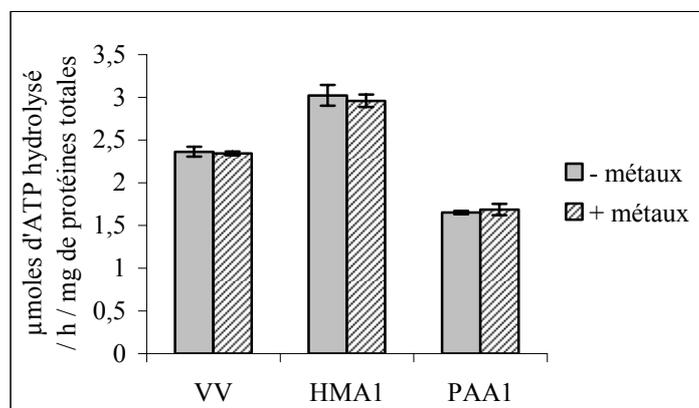


Figure 61 : Impact des métaux sur l'activité ATPase mesurée dans des extraits membranaires de *Lactococcus* par dosage du phosphate inorganique.

Des extraits membranaires bruts (2 μ g de protéines) provenant de bactéries transformées par un plasmide non recombinant (VV) ou par un plasmide contenant l'ADNc codant pour HMA1 ou PAA1 sont incubés dans le milieu réactionnel contenant de la cystéine 20 mM ; du TCEP 100 μ M ; du Tris 250 mM pH 7 ; du NaCl 250 mM ; du MgSO₄ 15 mM ; de l'ATP 15 mM en présence ou non d'un mélange contenant du CuSO₄, du ZnSO₄ et du CaCl₂ 2 μ M. Les mélanges sont incubés pendant 10 min à 37°C. Après ajout des solutions de coloration, la DO à 660 nm est mesurée. Les valeurs indiquent les moyennes obtenues pour 3 expériences indépendantes.

Ayant montré que l'hydrolyse d'ATP observée correspondait bien à une action enzymatique, nous avons cherché à mettre en évidence l'activité de HMA1 et de PAA1 en présence de métaux. Du cuivre, du zinc et du calcium ont été utilisés car ces trois ions peuvent potentiellement être transportés par HMA1 (Moreno *et al.*, 2008). Aucune variation de consommation d'ATP n'est observée suite à l'ajout de ces métaux dans le milieu réactionnel, indiquant que HMA1 et PAA1 ne sont pas activées dans ces conditions (Figure 61). Les mêmes expériences réalisées en ajoutant séparément le cuivre, le zinc et le calcium (lors de trois réactions indépendantes) ne révèlent pas d'activité ATPase induite par ces métaux.

Les valeurs d'activité spécifique ATPase mesurées (3 μ moles d'ATP consommé par heure et par mg de protéines membranaires) sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par Reuter et collaborateurs (2003) sur des extraits membranaires issus de *L. lactis*. Les auteurs de ce travail mesurent une activité dépendante du vanadate égale à 1 μ mole d'ATP consommé / heure / mg de protéines membranaires totales. Sachant que seule l'activité des protéines dépendantes du vanadate est mesurée, il est normal que la valeur d'activité qu'ils mesurent soit inférieure à celle que nous obtenons.

La figure 61 montre que l'activité ATPase totale mesurée dans les différents extraits membranaires, sans ajout de métaux, varie entre 1,6 et 3 μ moles d'ATP consommé / h / mg de protéines membranaires. Cette différence est probablement due à la variabilité biologique car les échantillons ont été préparés de la même manière et en même temps.

L'activité ATPase spécifique estimée pour HMA1 est 0,17 μ mole d'ATP consommé / h / μ g de HMA1 dans l'enveloppe des chloroplastes, sans ajout de cuivre. Si HMA1 représente 3 % des protéines membranaires de *Lactococcus*, l'activité due à HMA1 correspondrait à 7,8 μ moles d'ATP consommé / h / mg protéines membranaires totales soit plus du double de l'activité mesurée. Cependant, et comme discuté plus haut, il est possible que l'activité de HMA1 soit fortement altérée par la modification de son environnement lipidique et ainsi ne soit plus suffisamment élevée pour être détectée dans le bruit de fond des activités ATPases endogènes de *Lactococcus*. De plus, les conditions expérimentales utilisées ne sont peut être pas optimales pour mesurer les activités de ces ATPases qui dépendent très fortement du pH, de la concentration saline, de l'environnement lipidique et de la concentration en métaux utilisés (Chintalapati *et al*, 2008).

2. Mesure d'activité ATPase sur des fractions purifiées de HMA1 ; PAA1 et de HMA1-AKT

A nouveau, afin de s'affranchir de l'activité ATPase endogène des protéines membranaires de *L. lactis*, nous avons travaillé sur des fractions protéiques purifiées de HMA1, HMA1-AKT et PAA1.

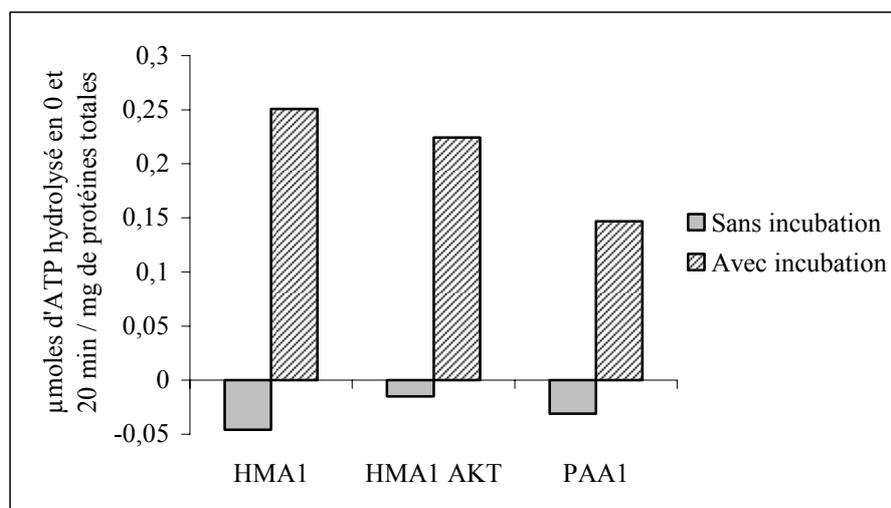


Figure 62 : Une activité d'hydrolyse d'ATP est mesurée dans des fractions fortement enrichies en HMA1, HMA1-AKT et PAA1.

Les fractions (2,5 μ g de protéines) enrichies en HMA1, HMA1-AKT ou PAA1 sont ajoutées au milieu réactionnel suivant : PC / DDM 0,01 % (p/v) cystéine 20 mM ; TCEP 100 μ M ; Tris 250 mM pH 7 ; NaCl 250 mM ; MgSO₄ 15 mM ; ATP 15 mM. La réaction est arrêtée par ajout des solutions de coloration soit immédiatement (t = 0) soit après une incubation de 20 min à 37°C. La DO à 660 nm est ensuite mesurée.

La figure 62 montre qu'il n'y a pas de Pi libéré dans le milieu lorsque la réaction est arrêtée immédiatement (Figure 62, t = 0). En revanche, lorsque les échantillons sont incubés pendant 20 minutes à 37°C, du Pi est détecté attestant la présence d'une activité d'hydrolyse d'ATP. Aucune production de Pi n'est observée lorsque le dosage est effectué sur des fractions

protéiques préalablement portées à ébullition (non montré). Les fractions protéiques utilisées contiennent donc une ou des protéines ayant une activité ATPase.

Bien que les expériences aient été réalisées sans ajouter de métaux dans le milieu, l'activité ATPase mesurée peut résulter de l'activité d'une ATPase de type P. En effet, Hatori et collaborateurs observent une activité résiduelle de CopA placée dans un milieu réactionnel sans ajout de cuivre exogène (Hatori *et al.*, 2008). Une activité est aussi observée lorsqu'un chélateur de cuivre monovalent (BCS) est ajouté, indiquant que ce type de protéine peut fonctionner avec des quantités infimes de cuivre. Les mesures d'activité ATPase réalisées sur l'enveloppe des chloroplastes montrent aussi que HMA1 a une activité basale apparente qui augmente 1,5 fois en présence de cuivre (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Cependant, il faut noter que l'activité mesurée dans l'expérience présente est extrêmement faible, environ 10^5 fois inférieure à l'activité de HMA1 estimée dans l'enveloppe des chloroplastes en absence de cuivre. Deux hypothèses peuvent expliquer cette différence : soit la solubilisation de HMA1 a fortement altérée son activité, soit l'activité mesurée est due à la présence d'une autre protéine qui catalyse aussi une activité ATPase et qui est co-purifiée avec les protéines recombinantes HMA1, HMA1-AKT ou PAA1

L'activité mesurée dans les fractions enrichies en HMA1-AKT (Figure 62, HMA1-AKT) soutient cette dernière hypothèse. En effet, la mutation de l'aspartate en alanine inactive l'enzyme (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006), ainsi l'activité observée dans cette fraction provient très probablement d'une ATPase qui contamine les protéines recombinantes purifiées.

Afin d'essayer de révéler une activité ATPase dépendante des métaux, nous avons effectué des expériences complémentaires en présence de cuivre.

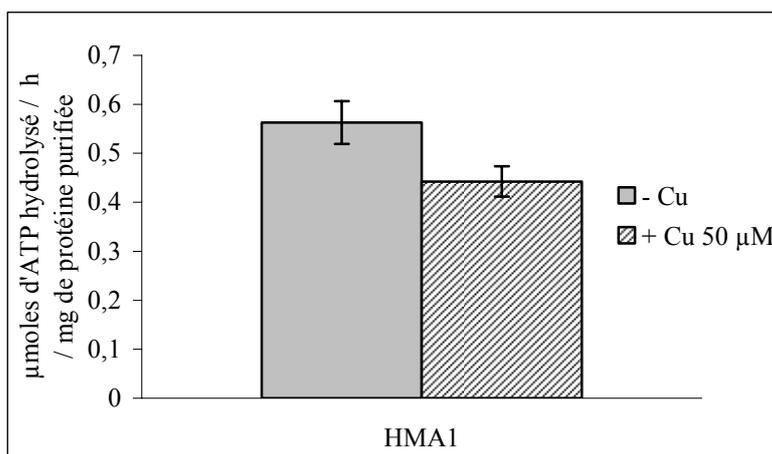


Figure 63 : Activité ATPase mesurée sur des fractions enrichies en protéine HMA1.

Une fraction enrichie en protéine HMA1 (2,5 µg) est pré-incubée avec de la PC et du DDM (2,5 µg de chaque composé) pendant 20 min à 37°C puis l'ensemble est ajouté au milieu réactionnel suivant : cystéine 20 mM ; TCEP 100 µM ; Tris 250 mM pH = 7 ; NaCl 250 mM ; MgSO₄ 15 mM ; ATP 15 mM en présence ou absence de CuSO₄ 50 µM. Après 20 min d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout des solutions de coloration, et la DO à 660 nm est mesurée. Les valeurs indiquent les moyennes obtenues pour 3 expériences indépendantes.

La figure 63 présente les résultats des mesures d'activité ATPase (dosages de Pi) effectuées sur des fractions protéiques enrichies en HMA1. On peut noter que l'activité ATPase mesurée est légèrement diminuée en présence de cuivre. De fortes concentrations en cuivre peuvent avoir un effet inhibiteur sur l'activité de certaines ATPases à cuivre (Chintalapati *et al.*, 2008). Si cette activité est liée à la protéine HMA1, cela peut signifier que les traces résiduelles de métaux présents dans le milieu sont suffisantes pour activer HMA1 et permettent d'expliquer l'activité détectée dans la figure 63.

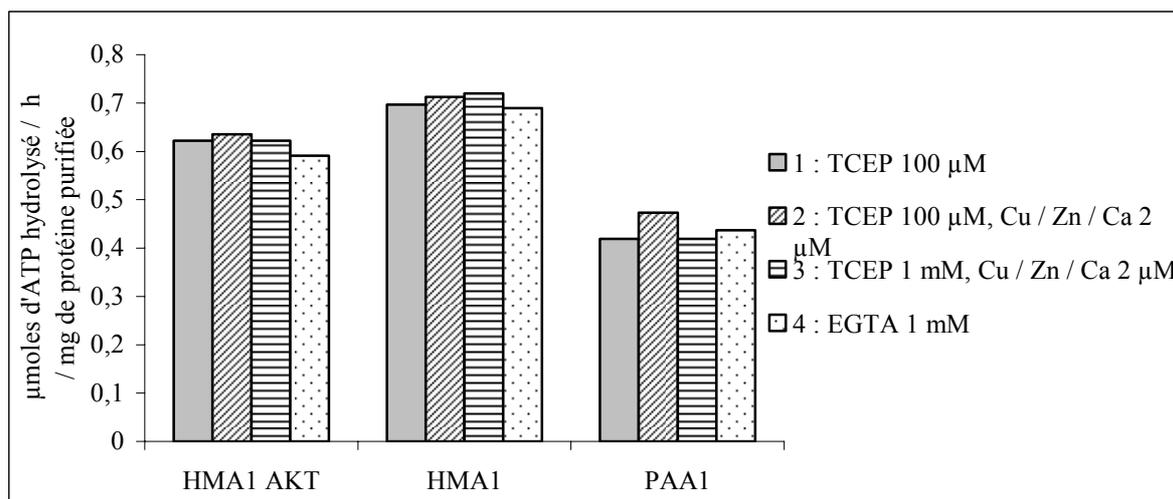


Figure 64 : Activité ATPase mesurée dans des fractions enrichies en HMA1, HMA1-AKT et PAA1 en présence de divers métaux et de réducteur.

Des fractions enrichies en protéine HMA1, HMA1-AKT ou PAA1 (2,5 µg) sont pré-incubées avec de la PC et du DDM (2,5 µg de chaque composé) pendant 20 min à 37°C, puis l'ensemble est ajouté au milieu réactionnel suivant : cystéine 20 mM ; Tris 250 mM pH 7 ; NaCl 250 mM ; MgSO₄ 15 mM ; ATP 15 mM. Suivant les conditions, du TCEP et des métaux ont été ajoutés. 1 : + TCEP 100 µM ; 2 : + TCEP 100 µM, CuSO₄ / ZnSO₄ / CaCl₂ 2µM ; 3 : + TCEP 1 mM, CuSO₄ / ZnSO₄ / CaCl₂ 2µM ; 4 : + EGTA 1mM. Après 20 min d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout des solutions de coloration et la quantité de Pi présente dans le milieu réactionnel est déterminée par dosage au spectrophotomètre à 660 nm.

Des mesures complémentaires ont été effectuées sur des fractions enrichies en protéines HMA1, HMA1-AKT ou PAA1 et dans de nouvelles conditions expérimentales. Tout d'abord, nous avons mesuré l'activité ATPase présente dans ces échantillons sans ajout supplémentaire de métaux et en présence de TCEP, un agent réducteur (Figure 64, condition 1). Dans ces conditions, une activité est mesurée dans les trois échantillons protéiques, avec des activités spécifiques du même ordre de grandeur que celles qui ont été obtenues précédemment (Figure 63).

Lorsqu'un mélange de métaux (2 µM de CuSO₄ / ZnSO₄ / CaCl₂) est ajouté, l'activité mesurée dans les trois fractions ne varie pas, indiquant qu'il n'y a pas d'activation des ATPases HMA1 et PAA1 dans ces conditions (Figure 64, condition 2). Nous avons utilisé un mélange de métaux car les données récentes publiées dans la littérature suggèrent que HMA1 pourrait être impliquée dans le transport du cuivre, du zinc et du calcium (Moreno *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*,

2009). L'utilisation de TCEP permet de réduire le cuivre 2+ en cuivre 1+. PAA1 est une ATPase à cuivre qui d'après sa classification permettrait le transport du cuivre 1+.

La concentration en TCEP étant peut être limitante pour réduire le cuivre nécessaire pour activer PAA1, l'expérience a été réalisée avec un large excès de TCEP (1 mM au lieu de 100 μ M). Aucune variation d'activité n'est observée dans ces conditions (Figure 64, condition 3).

Enfin, les résultats de l'expérience présentés figure 63 semblent indiquer que HMA1 pourrait être active en utilisant les traces de métaux déjà présents dans les milieux. Afin de vérifier cette hypothèse, l'expérience a été réalisée en présence d'un excès d'EGTA (1 mM), molécule qui chélate les métaux divalents. La figure 64 (Figure 64, condition 4) montre que l'ajout d'EGTA n'entraîne pas de diminution de l'activité ATPase suggérant que l'activité ATPase détectée dans ces fractions enrichies ne résulte pas d'ATPases transportant des cations divalents ou que HMA1 n'est pas active dans ces conditions.

Nous avons aussi analysé l'impact de la concentration en cystéine, qui pourrait jouer un rôle de chaperonne (Chintalapati *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2007), de la concentration en sels, du pH, ainsi que de la concentrations en métaux. Nous n'avons trouvé aucune condition permettant de révéler une activité ATPase associée spécifiquement à HMA1 ou à PAA1. L'ensemble de ces expériences indique que l'activité ATPase mesurée dans les fractions enrichies en HMA1, HMA1-AKT et PAA1 provient très probablement d'une protéine contaminante co-purifiée sur la matrice d'affinité *Strep*-tactin.

C. Conclusion

Les deux techniques de mesure d'activité ATPase utilisées n'ont pas permis de mettre en évidence d'activité ATPase liée à HMA1 et PAA1 après leur expression dans *L. lactis*, que ce soit à partir des protéines encore insérées dans les membranes bactériennes, ou à partir des protéines partiellement purifiées.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un système de couplage permettant de régénérer l'ATP. Nous avons montré que cette technique n'est pas adaptée pour fonctionner dans un milieu contenant des détergents et/ou de grandes quantités de réducteur. En effet, ces deux molécules doivent avoir un impact sur les enzymes du système de couplage ou sur le NADH. Nous n'avons donc pas pu utiliser cette technique pour mesurer les activités ATPases dans des fractions fortement enrichies en protéines recombinantes, fractions obtenues après solubilisation en présence de détergent et purification par affinité. Ces analyses sur fractions purifiées étaient toutefois nécessaires car les membranes de *Lactococcus* présentent une activité ATPase endogène assez élevée qui pouvait masquer l'activité associée à HMA1 ou PAA1.

Nous avons alors utilisé un autre système de mesure de l'activité ATPase qui consiste à doser le Pi libéré dans le milieu suite à l'hydrolyse de l'ATP. Avec ce système de dosage du Pi, l'activité ATPase endogène mesurée sur les membranes de *Lactococcus* est 10 fois plus faible

que celle qui est mesurée avec le système de couplage. Malgré cette diminution d'activité endogène, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité ATPase associée à HMA1 ou PAA1, suggérant que ces protéines sont inactives ou alors ont une activité spécifique très faible masquée par l'activité ATPase endogène.

Il est possible que l'environnement lipidique de HMA1 et PAA1 ne soit pas adapté pour permettre de révéler une activité maximale de ces deux protéines. La phosphatidylcholine (PC) est absente des membranes de *L. lactis* alors qu'elle représente près de 20 % des lipides de la membrane interne de l'enveloppe. Cependant, les expériences réalisées sur les fractions purifiées ont été réalisées en présence de PC et n'ont pas non plus permis de révéler l'activité de HMA1 et PAA1. La PC n'étant pas le seul lipide différent entre les deux systèmes membranaires (membrane plasmique de *Lactococcus* et membrane interne du chloroplaste), il est possible que les glycolipides aient aussi un effet sur l'activité de ces ATPases. En effet, les glycolipides issus de *L. lactis* contiennent du glucose alors que les têtes hydrophiles des glycolipides de l'enveloppe du chloroplaste sont composés de galactose (Oliveira *et al.*, 2005 ; Block *et al.*, 1983 ; Moreau *et al.*, 1998). Des expériences complémentaires avec des lipides purifiés à partir des membranes chloroplastiques pourraient nous permettre de déterminer si l'environnement lipidique a un impact sur l'activité de ces protéines. Cela permettrait ainsi d'expliquer pourquoi aucune activité ATPase n'a pu être mise en évidence pour HMA1 et PAA1 produites dans ce système d'expression.

Les résultats obtenus sur les fractions purifiées indiquent que l'activité mesurée provient d'une protéine contaminante, co-purifiée sur la matrice de *Strep*-tactin. A notre connaissance, aucune caractérisation fonctionnelle d'ATPase de type P_{1B} n'a été effectuée après expression dans la bactérie *L. lactis*, ce qui ne nous permet donc pas de comparer les protocoles expérimentaux utilisés.

Moreno et collaborateurs (2008) ont exprimé HMA1 (sous forme précurseur, donc avec sa séquence de transit chloroplastique !) dans des souches de levure et ont pu mesurer une activité ATPase associée à HMA1. Ils montrent que cette activité est fortement stimulée par le cadmium, le cobalt, le cuivre et le zinc. En présence de cuivre ou de zinc, l'activité mesurée est respectivement d'environ 80 et 95 μ moles d'ATP consommé / h / mg de protéines totale, soit une activité 200 fois plus élevée que l'activité estimée pour HMA1 mature dans l'enveloppe des chloroplastes. Ces auteurs montrent aussi que la forme précurseur de HMA1 transporte du calcium avec une activité de 1,53 nmoles de Ca²⁺ transporté / min / mg de protéines membranaires (Moreno *et al.*, 2008), ce qui correspondrait à 92 nmoles d'ATP hydrolysé / h / mg de protéines membranaires (si l'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet le transport d'une molécule de calcium). Ces résultats sont surprenants car nous ne détectons aucune activité associée à HMA1 même en présence de zinc et de calcium. De plus, nous avons montré (en collaboration avec le laboratoire d'Alain Vavasseur) que la forme

précurseur de HMA1 (donc avec sa séquence de transit chloroplastique !) exprimé en levure n'était pas fonctionnelle (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006), contrairement à la forme mature.

Il est à noter que nous n'avons pas mis en évidence non plus d'activité liées à des ATPases à calcium dans l'expérience présentée dans la figure 56, alors que d'après les résultats obtenus par microséquençage des protéines (Annexe 3), les extraits membranaires utilisés pour ces expériences contiennent des protéines similaires aux ATPases à calcium. Cela indique peut être que nous ne sommes peut être pas placés dans des conditions optimales pour mesurer l'activité de ces protéines.

En collaboration avec Aurélien Deniaud (IBS/LPM), nous avons aussi cherché à mettre en évidence des flux d'ions liés à l'activité des protéines HMA1 et PAA1 dans des membranes issues de *L. lactis*. Pour cela, les protéines HMA1 et PAA1 partiellement purifiées ont été intégrées dans des protéoliposomes. Pour suivre les flux d'ions, nous avons utilisé la technique de Solid Supported Membrane (SSM) qui a été utilisée avec succès pour mesurer l'activité de SERCA1A (Bartolomei *et al.*, 2004). Aucun transport d'ions lié à HMA1 ou PAA1 n'a pu être mis en évidence avec cette technique. Nous n'avons pas réussi à obtenir de données reproductibles en utilisant des vésicules issues des membranes brutes de *L. lactis* ou des protéoliposomes.

Enfin, récemment, nous avons initié une collaboration avec Rémi Gibrat (Laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier) afin de mesurer l'import d'ions dans des vésicules contenant HMA1 et PAA1. La technique qui sera employée est basée sur l'utilisation de fluorophores réagissant avec des métaux. N'ayant pu mesurer directement l'activité ATPase de HMA1 et de PAA1, nous avons cherché à savoir si ces deux protéines étaient toujours capables de lier l'ATP ainsi que leurs substrats métalliques.

III. CAPACITE DE HMA1 ET DE PAA1 A LIER LEURS SUBSTRATS

Afin de montrer que HMA1 et PAA1 exprimées en système hétérologue *Lactococcus* sont capables de lier leurs substrats, deux approches ont été initiées qui consistent 1) à déterminer si HMA1 et PAA1 sont toujours capables de lier l'ATP; et 2) à démontrer que HMA1 et PAA1 peuvent interagir avec le métal qu'elles transportent.

Ces expériences n'avaient pas pour but de mesurer une activité ATPase pour ces deux protéines mais devaient permettre de déterminer leur spécificité ionique et des paramètres cinétiques comme la constante d'affinité pour un métal ou pour l'ATP. Ces données pouvaient ensuite servir à déterminer de nouvelles conditions expérimentales pour effectuer des mesures d'activité ATPase supplémentaires.

A. Protéolyse limitée à la trypsine

Afin de déterminer si HMA1 et PAA1 exprimées par *L. lactis* sont capables de lier l'ATP, nous avons voulu mettre en évidence les changements de conformations de ces protéines suite à la liaison de l'ATP.

Le cycle catalytique des ATPases de type P est représenté dans la figure 65. Ce cycle est composé de quatre étapes principales. La liaison du cation et de l'ATP à la protéine dans son état E2 (étape 4) permet la formation d'un intermédiaire phosphorylé suite à l'hydrolyse d'ATP (étape 1). Les changements de conformations induits par cette autophosphorylation permettent alors l'ouverture de la protéine de l'autre côté de la membrane et la libération du métal (étape 2). Enfin, l'ATPase est déphosphorylée (étape 3) et retourne à son état initial E2. Un nouveau cycle peut commencer.

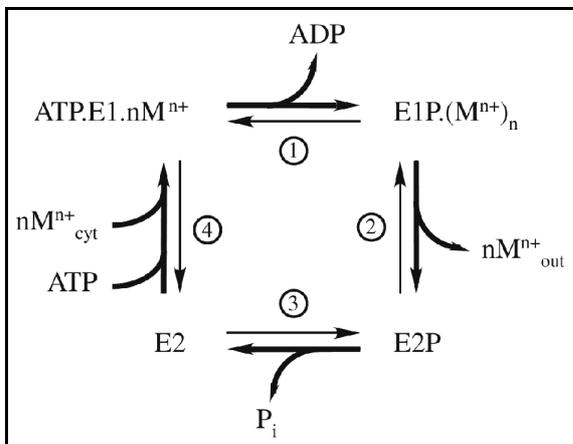


Figure 65 : Cycle catalytique des ATPases de type P_{1B} .

E1, E2, E1P et E2P représentent les conformations basiques de l'enzyme au cours de son cycle. M^{n+} représente un métal transporté par ces enzymes. N représente la stœchiométrie du transport. M^{n+}_{cyt} et M^{n+}_{out} représentent la localisation cytoplasmique ou extracellulaire/luminale du métal transporté.

Schéma tiré de Argüello et al, 2006

Les données cristallographiques obtenues pour l'ATPase SERCA indiquent l'existence de changements de conformations majeurs suite à la liaison de l'ATP sur la protéine (Figure 65, étape 4) (Kubala, 2006).

En changeant de conformation, l'ATPase peut rendre accessible ou inaccessible un site de digestion trypsique. La protéolyse limitée à la trypsine est une technique qui a été utilisée pour mettre en évidence des changements de conformation de différentes ATPase de type P dont SERCA (Danko *et al.*, 2001) et CadA, une ATPase de type P_{1B} de *Listeria monocytogenes* (Q60048) transportant du cadmium (Wu *et al.*, 2006). Les auteurs montrent un changement dans le profil de digestion trypsique de CadA selon la présence ou non d'ATP dans le milieu réactionnel attestant de mouvements au sein de la protéine.

Nous avons donc étudié les changements de conformation de HMA1 et de PAA1 en analysant les profils de digestion trypsique obtenus dans un milieu réactionnel en présence ou absence d'ATP. Ces expériences ont été réalisées par Daphné Seigneurin-Berny (LPCV) à partir des protéines recombinantes produites chez *L. lactis*.

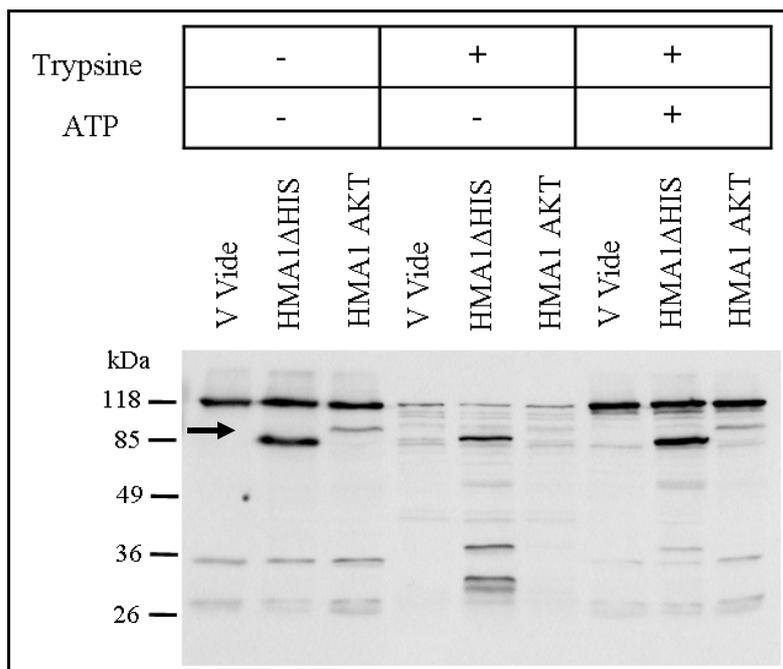


Figure 66 : Protéolyse limitée à la trypsine sur des extraits de protéines membranaires.

Les protéines membranaires provenant de bactéries transformées par un vecteur non recombinant (V Vide), exprimant HMA1 sans sa séquence riche en histidine (HMA1 Δ His) ou HMA1 mutée au niveau du site catalytique (HMA1-AKT) sont incubées pendant 5 min à 30°C dans un milieu réactionnel contenant du Tris-HCl 20 mM pH 7 ; du KCl 0,1 mM ; et du MgCl₂ 5 mM. De la trypsine (avec un ratio protéine / trypsine égal à 10 [p/p]) et de l'ATP 5 mM sont ajoutés comme indiqué. Après précipitation à l'acétone, les échantillons sont séparés par SDS-PAGE et analysés par un marquage réalisé à l'aide du conjugué *Strep*-tactin HRP. La flèche indique la taille attendue pour la protéine HMA1 non protéolysée.

La figure 66 présente les différents profils de digestion obtenus sur des extraits de protéines membranaires provenant de bactéries contrôles (bactéries transformées par un vecteur d'expression non recombinant), ou de bactéries exprimant HMA1 Δ His et HMA1-AKT. Pour chaque extrait membranaire, trois conditions sont analysées : 1) absence d'ATP et de trypsine, 2) ajout de trypsine, et 3) préincubation pendant 1 min avec de l'ATP avant ajout de trypsine. Lorsque la réaction se déroule dans un milieu dépourvu de trypsine et d'ATP (Figure 66, trois premières pistes de l'autoradiogramme), les protéines ne sont pas protéolysées et migrent à leur taille attendue.

L'ajout de trypsine (Figure 66, trois pistes du milieu) modifie le profil de marquage. En effet, le signal correspondant à HMA1 Δ His et HMA1-AKT diminue d'intensité et de nouveaux signaux apparaissent. Ces marquages correspondent probablement aux fragments C-terminaux (l'étiquette *Strep* est localisée en C-terminal) de HMA1 obtenus après digestion par la trypsine. Ces marquages ne sont pas visibles dans l'échantillon HMA1-AKT probablement à cause de la faible expression de la protéine HMA1-AKT. Les produits de dégradation sont probablement présents en trop faible quantité pour être détectés par le conjugué *Strep*-tactin HRP.

En présence d'ATP et de trypsine, nous pouvons observer que les profils de digestion tryptique sont de nouveau différents et proches des profils observés sans ajout de trypsine. En

effet, les marquages issus des fragments protéolysés de HMA1 observés précédemment ne sont plus visibles (ou très peu) et le marquage correspondant à une forme non digérée de HMA1 est beaucoup plus fort (Figure 66, trois dernières pistes).

Ces résultats montrent que l'ATP a un impact sur le profil de digestion de HMA1 par la trypsine, en induisant probablement des changements de conformation qui rendent inaccessible les sites de digestion tryptique. Ces résultats suggèrent donc que HMA1 exprimée par *L. lactis* est capable de lier de l'ATP et de changer de conformation.

Il est normal que la forme mutée de HMA1 change de conformation suite à l'ajout d'ATP dans le milieu. En effet, même si cette protéine ne peut plus être phosphorylée, elle est encore capable de lier l'ATP.

Afin de valider l'expérience présentée dans la figure 66, les extraits membranaires bruts ont été remplacés par de la sérum-albumine bovine (SAB), une protéine non connue pour lier l'ATP ni pour avoir une quelconque interaction avec ce nucléotide.

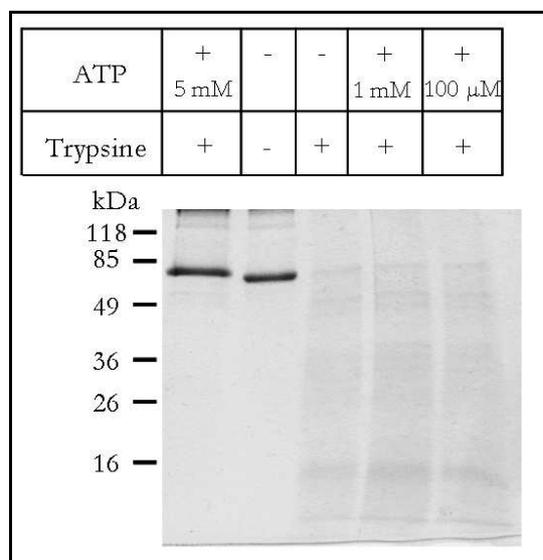


Figure 67 : L'ATP a un effet sur l'activité protéolytique de la trypsine.

La SAB (2 μ g) est incubée pendant 5 min à 30°C dans un milieu réactionnel contenant du Tris-HCl 20 mM pH 7 ; du KCl 0,1 mM ; et du MgCl₂ 5 mM. Les expériences sont effectuées avec ou sans trypsine (avec un ratio protéine / trypsine égal à 10 [p/p]). Trois concentrations en ATP sont utilisées : 5 mM, 1 mM et 100 μ M. Les échantillons sont ensuite précipités à l'acétone et analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

La figure 67 montre que la SAB est totalement digérée en présence de trypsine. En revanche, l'ajout d'ATP 5 mM inhibe la digestion de la SAB qui est de nouveau détectée à une taille légèrement supérieure. Cette protéine n'étant pas connue pour lier l'ATP, ni changer de conformation lorsqu'elle est en présence d'ATP, nous avons soupçonné que l'ATP puisse inhiber l'activité protéolytique de la trypsine. L'utilisation d'une concentration plus faible en ATP (1 mM et 100 μ M) permet de restaurer l'activité protéolytique de la trypsine. Cette expérience a été reproduite avec la protéine ceQORH, une quinone oxydo-réductase associée à l'enveloppe des chloroplastes (Miras *et al.*, 2002) qui n'est pas connue pour lier l'ATP et a conduit à des résultats identiques (non montré). Ainsi, les résultats obtenus suite à la première expérience réalisée sur les extraits de protéines membranaires ne peuvent être pris en compte. Nous avons donc reproduit cette expérience en utilisant des concentrations d'ATP inférieures à 5 mM.

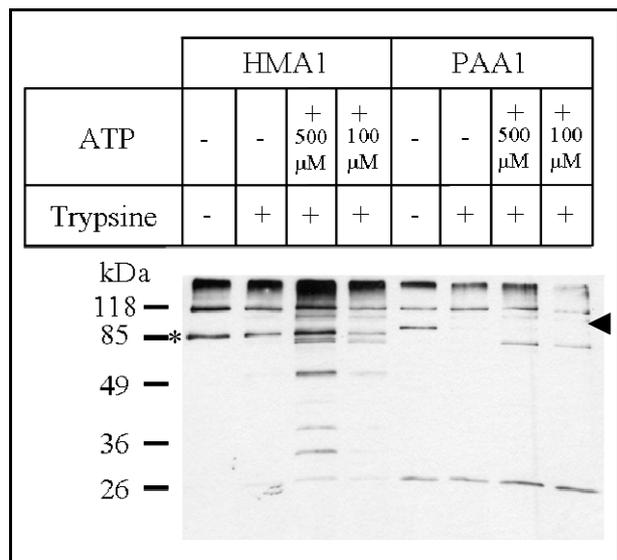


Figure 68 : Protéolyse limitée à la trypsine sur des fractions purifiées de HMA1 et de PAA1.

Des extraits purifiés de HMA1 et de PAA1 sont incubés pendant 20 sec à 30°C dans un milieu réactionnel contenant du Tris-HCl 20 mM pH 7 ; du KCl 0,1 mM ; et du MgCl₂ 5 mM. Les expériences sont effectuées en présence ou absence de trypsine (avec un ratio protéine / trypsine égal à 10 [p/p]). Deux concentrations en ATP ont été utilisées : 500 μM et 100 μM. Les protéines sont ensuite précipitées à l'acétone, séparées par SDS-PAGE et analysées par un marquage avec le conjugué *Strep*-tactin HRP. L'étoile indique la taille attendue pour la protéine HMA1 non protéolysée et le triangle indique la taille attendue pour la protéine PAA1 non protéolysée.

La figure 68 présente les résultats de protéolyse limitée effectuée à partir des fractions enrichies en protéines HMA1 et PAA1. Lorsque la trypsine est ajoutée dans le milieu réactionnel, le marquage correspondant à PAA1 disparaît indiquant que la protéine est protéolysée. Quand à HMA1, elle présente un signal de marquage moins fort que celui observé dans la condition contrôle (sans trypsine, ni ATP) mais contrairement à PAA1, le marquage ne disparaît pas totalement. Cette différence peut être expliquée par une accessibilité différente des sites de digestion trypsique entre les deux ATPases.

Lorsque l'expérience est réalisée en présence de trypsine et d'ATP 500 μM, nous pouvons voir que le profil de digestion de HMA1 et de PAA1 est différent de celui qui est obtenu lorsque seule la trypsine est présente dans le milieu réactionnel (apparition de signaux supplémentaires). Il en est de même lorsque la réaction a lieu en présence de trypsine et d'ATP 100 μM. Cependant, avec cette concentration d'ATP, il semble que les marquages sont moins intenses que ceux qui sont observés lorsque la réaction a lieu en présence d'ATP 500 μM. Cette différence suggère qu'une concentration en ATP de 100 μM est limitante pour une liaison optimale aux protéines HMA1 et PAA1.

D'après ces expériences, l'ajout d'ATP (à des concentrations qui n'inhibent pas la trypsine) modifie le profil de protéolyse de HMA1 et de PAA1. Ces résultats préliminaires indiquent que les protéines HMA1 et PAA1 partiellement purifiées sont encore capables de lier de l'ATP et de changer de conformation. Ces expériences vont être poursuivies en analysant une gamme plus importante de concentration en ATP. De cette manière, nous espérons pouvoir calculer une affinité apparente de HMA1 et de PAA1 pour l'ATP.

B. Incorporation de Pi radioactif

Le cycle catalytique des ATPases de type P présenté dans la figure 69 est composé principalement de quatre étapes. Les étapes 1 et 3 sont respectivement la liaison de l'ATPase

avec le nucléotide et le cation, puis la libération du métal de l'autre côté de la membrane. Les étapes 2 et 4 correspondent à la phosphorylation et la déphosphorylation de l'enzyme.

Comme le montre la figure 69, les étapes de ce cycle catalytique sont réversibles et il est possible de forcer le cycle à fonctionner dans le sens inverse du sens physiologique. La libération de Pi (étape 4) ne peut se faire que lorsque l'ATPase a libéré le métal qu'elle transporte. Cette étape 4 étant réversible, une ATPase peut donc être phosphorylée par du Pi seulement si elle n'est pas liée au métal qu'elle transporte. La compétition entre le métal et le Pi permet la formation d'un état E2 ou E2P.

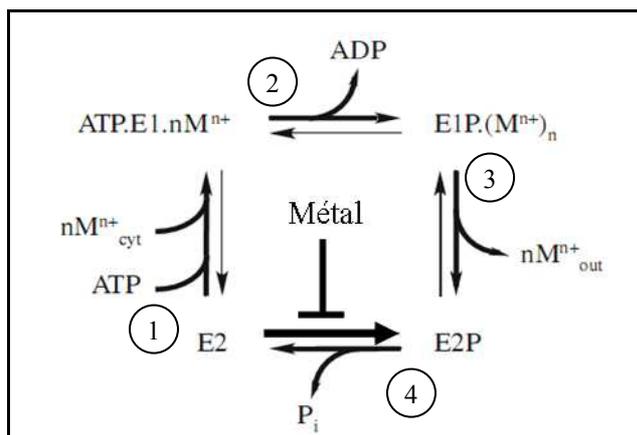


Figure 69 : Principe de la phosphorylation d'ATPases par le Pi.

Du Pi peut être incorporé dans une ATPase de type P, modifiant l'enzyme de l'état E2 à l'état E2P. Si la protéine interagit avec son substrat métallique, cette réaction ne peut avoir lieu.

Image tiré de Arguello *et al.*, 2006

Afin de déterminer si HMA1 et PAA1 produites chez *L. lactis* sont capables de lier les métaux, nous avons effectué des expériences de phosphorylation avec du Pi radioactif sur les membranes de *Lactococcus* contenant ces protéines recombinantes. Cette approche permet ainsi de déterminer la spécificité ionique des ATPases étudiées ainsi que l'affinité apparente pour le métal lié. Ces expériences ont été réalisées par Daphné Seigneurin-Berny en collaboration avec Patrice Catty (iRTSV/LBCM) sur des protéines recombinantes HMA1 et PAA1 produites chez *L. lactis*.

Le contrôle positif utilisé pour l'expérience présentée dans la figure 70 est un extrait membranaire de *E. coli* contenant CadA, une ATPase de type P_{1B} de 75 kDa transportant du cadmium (Bal *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2006). Nous pouvons observer un signal de phosphorylation (Figure 70, piste EGTA) lorsque la réaction est effectuée dans un milieu dépourvu de cations divalents (en présence d'EGTA). Ce signal de radiomarquage est faible car 10 µg de protéines membranaires issues d'*E. Coli* ont été utilisées. Ce signal disparaît lorsque du cadmium, substrat de CadA, est ajouté au mélange réactionnel (Figure 70, piste Cd²⁺).

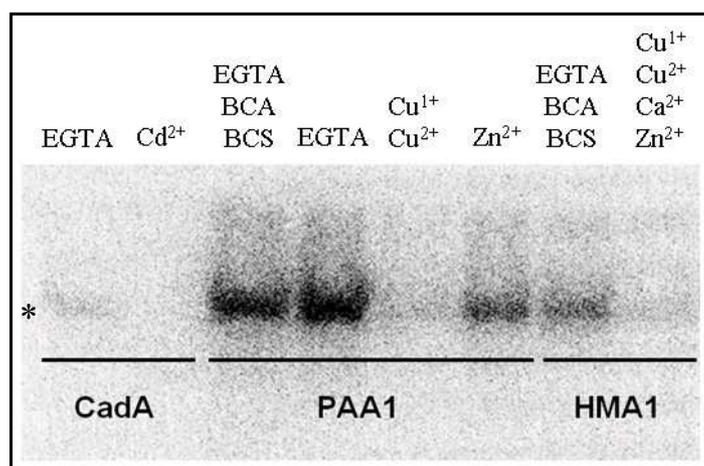


Figure 70 : Phosphorylation par du Pi des ATPases CadA, PAA1 et HMA1.

La formation d'intermédiaires phosphorylés à partir de Pi est effectuée à 30°C en incubant 10 µg d'extrait membranaire brut issu d'*E. coli* contenant CadA ou 100 µg d'extrait membranaire brut issu de *L. lactis* contenant PAA1 ou HMA1 dans 90 µL d'Hepes 20 mM pH 6 ; MgCl₂ 10 mM, 20 % [v/v] DMSO. Selon les conditions testées, nous avons ajouté à ce mélange du cadmium 50 µM ; du cuivre 1+ et 2+ 50 µM ; un mélange de cuivre 1+ et 2+ 50 µM, zinc 50 µM, calcium 50 µM ; de l'EGTA 1mM ; ou un mélange d'EGTA 1 mM, BCA 1mM et BCS 100µM. La réaction de phosphorylation est initiée par l'ajout de 100 µM ³²Pi et arrêtée 10 sec plus tard par précipitation au TCA. Après lavage, les protéines sont séparées par SDS-PAGE en condition acide. Le gel est analysé à l'aide d'un Phosphorimager. L'étoile indique le signal de radiomarquage correspondant à CadA.

La figure 70 montre l'apparition d'un signal de phosphorylation dans les membranes exprimant PAA1 lorsque le milieu réactionnel est dépourvu de métaux divalents et monovalents (le BCA et le BCS sont des chélateurs d'ion monovalent). Ce signal de phosphorylation disparaît lorsqu'un mélange de cuivre monovalent et divalent est ajouté (Figure 70, piste Cu¹⁺ et Cu²⁺), indiquant que PAA1 peut lier du cuivre 1+ et/ou du cuivre 2+. La spécificité de la liaison de PAA1 au cuivre est validée par le fait que l'ajout de zinc n'inhibe pas la phosphorylation de PAA1 (Figure 70, piste Zn²⁺).

D'après la figure 70, HMA1 peut aussi être phosphorylée dans un milieu dépourvu de métaux monovalents et divalents (Figure 70, piste EGTA, BCA, et BCS). On peut noter que le signal de phosphorylation est plus faible que celui observé pour PAA1. Cette phosphorylation disparaît lorsqu'un mélange de métaux (Figure 70, piste Cu⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺) est ajouté au milieu réactionnel, suggérant que HMA1 pourrait lier au moins l'un de ces métaux. Nous avons utilisé un mélange de métaux car les données récentes publiées sur la protéine HMA1 suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans le transport du cuivre, du zinc, et du calcium (Seigneurin Berny *et al.*, 2006 ; Moreno *et al.*, 2008). Les expériences ultérieures consisteront à déterminer avec exactitude quels sont les ions transportés par HMA1.

Cette technique semble donc adaptée pour poursuivre la caractérisation de HMA1 et PAA1 et identifier leurs substrats.

1. Etude de la phosphorylation de HMA1

Afin de valider que le signal de phosphorylation observé précédemment correspond bien une phosphorylation de la protéine HMA1, nous avons réalisé de nouvelles expériences en utilisant des différents contrôles qui sont des protéines membranaires provenant

- 1) de bactéries transformées avec un vecteur non recombinant (VV pour vecteur vide),
- 2) de bactéries exprimant la forme de HMA1 dépourvue de sa séquence riche en histidine (HMA1 Δ His), et
- 3) de bactéries exprimant la forme mutée de HMA1 au niveau de son site catalytique (HMA1-AKT).

Le domaine *N*-terminal riche en histidines de HMA1 serait impliqué dans la régulation de l'enzyme et sa délétion pourrait avoir un impact sur la phosphorylation de HMA1. De plus, HMA1 Δ His ayant une masse moléculaire apparente plus petite que celle de HMA1 mature, cela nous permettrait de valider que le signal observé est lié à la phosphorylation de HMA1 et non pas à une protéine endogène de *L. lactis*.

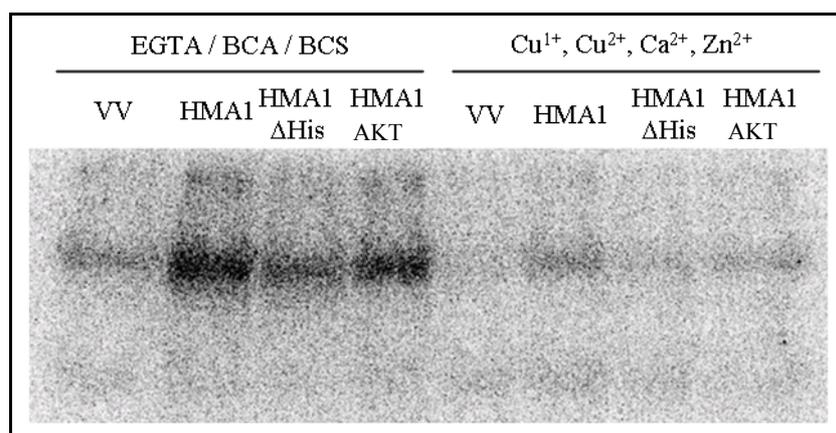


Figure 71 : Phosphorylation par du Pi de différentes formes de HMA1.

La formation d'intermédiaires phosphorylés à partir de Pi est effectuée à 30°C en incubant 100 μ g d'extrait membranaire brut de *L. lactis* après expression de l'ATPase d'intérêt (aucune [VV], HMA1, HMA1 Δ His et HMA1 muté) dans 90 μ L d'Hepes 20 mM pH 6 ; MgCl₂ 10 mM, 20 % [v/v] DMSO contenant soit un métal (50 μ M CuSO₄, ZnSO₄, CaCl₂) soit d'EGTA 1mM, BCA 1mM et BCS 100 μ M en présence de TCEP 100 μ M. La réaction de phosphorylation est initiée par l'ajout de 100 μ M ³²Pi et arrêtée 10 secondes plus tard par précipitation au TCA. Après lavage, les protéines sont séparées par SDS-PAGE en condition acide. Le gel est analysé à l'aide d'un Phosphorimager.

La figure 71 montre que la présence d'un faible signal de phosphorylation dans les membranes n'exprimant pas HMA1 (Figure 71 gauche, piste VV) en absence de métaux, signal qui disparaît après ajout du mélange de métaux (Figure 71 droite, piste VV). Ceci indique la présence d'une ATPase de type P1B endogène, qui migre à une taille similaire à celle de HMA1. Cette ATPase endogène pourrait lier au moins un des métaux présents dans le mélange utilisé.

Un signal de phosphorylation plus fort est observé dans les extraits exprimant HMA1 et HMA1 Δ His en absence de métaux (Figure 71 gauche, pistes HMA1 et HMA1 Δ His) et est

inhibé en présence du mélange de métaux (Figure 71 droite, pistes HMA1 et HMA1 Δ His), suggérant que HMA1 peut potentiellement lier à de ces métaux. Le marquage obtenu pour HMA1 Δ His est légèrement plus faible.

De façon surprenante, le même signal de phosphorylation est observé (en absence de métaux) sur les membranes exprimant HMA1-AKT alors que cette forme mutée de HMA1 est mutée dans son site de phosphorylation et n'est donc théoriquement plus phosphorylable (Figure 71 gauche, pistes HMA1-AKT). Cette phosphorylation n'a plus lieu lorsque la réaction est réalisée en présence de métaux (Figure 71 droite, pistes HMA1-AKT).

Ce dernier résultat suggère que nous ne visualisons pas la phosphorylation d'HMA1, mais celle d'une ATPase endogène de *L. lactis*. Cette hypothèse a ensuite été renforcée par le fait que le signal de phosphorylation observé dans les extraits membranaires contenant HMA1 est beaucoup plus faible que celui observé dans les extraits membranaires contenant PAA1 (voir figure 70). De plus, des expériences réalisées avec différentes préparations de protéines membranaires contenant HMA1 montrent que l'intensité du signal de phosphorylation est très similaire à celui observé dans les membranes n'exprimant pas HMA1 (non montré).

2. Etude de la phosphorylation de PAA1

Contrairement à HMA1, PAA1 présente un signal de phosphorylation très fort sur l'autoradiogramme présenté dans la figure 70. Nous avons donc poursuivi ces expériences afin de valider la spécificité ionique de PAA1 déduite des analyses indirectes réalisées *in planta* (Shikanai *et al.*, 2003).

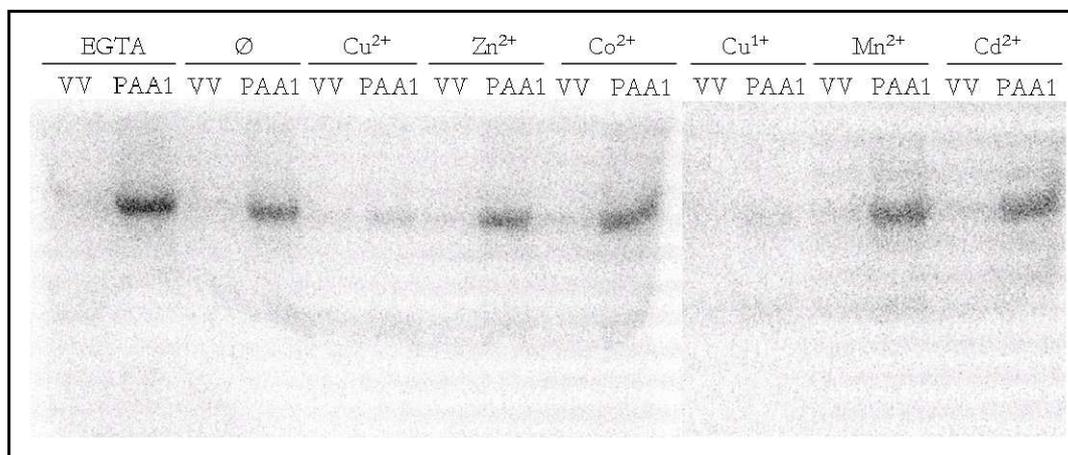


Figure 72 : Détermination de la spécificité ionique de PAA1 par mesure d'incorporation de Pi radioactif.

Un extrait membranaire brut (100 μ g de protéines) issu de bactéries transformées par un plasmide non recombinant (VV) ou de bactéries transformées par un plasmide contenant l'ADNc codant pour PAA1 est placé dans un milieu constitué d'Hepes 20 mM pH 6, de DMSO 20 % [v/v], de MgCl₂ 10 mM contenant soit de l'EGTA 1 mM, soit 50 μ M de CuCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, MnCl₂, ou CdCl₂. Le cuivre 1+ est obtenu grâce à l'addition de TCEP 400 μ M dans le milieu réactionnel. La réaction est initiée par ajout de ³²Pi 100 μ M et est arrêtée après 10 min d'incubation à 30°C par précipitation des protéines au TCA. Les extraits membranaires sont ensuite rincés, séparés par SDS-PAGE en condition acide. Les signaux de phosphorylation sont révélés par autoradiographie.

Dans ces expériences, le contrôle négatif utilisé correspond aux protéines membranaires extraites de bactéries transformées par un plasmide non recombinant (Figure 72, VV). Un très faible signal de phosphorylation est observé dans ces membranes en absence de métaux et semble disparaître en présence de cuivre 1+ ou 2+. Ce signal est probablement dû à une ATPase endogène de *Lactococcus* (Figure 72, pistes VV). Dans un milieu réactionnel dépourvu de métaux (Figure 72, EGTA), les membranes contenant PAA1 présentent un signal confirmant la phosphorylation de PAA1. Cette phosphorylation est aussi observée lorsque les membranes sont incubées dans un milieu sans ajout de chélateurs de métaux et sans ajout de métaux (Figure 72, Ø). Dans cette condition, l'intensité du signal est inférieure à celle observée en présence d'EDTA. Ceci peut être expliqué par la présence de traces résiduelles de métaux dans le milieu réactionnel qui inhibent faiblement la réaction. Ce signal de phosphorylation est toujours présent lorsque du zinc, du cobalt, du manganèse et du cadmium sont ajoutés dans le milieu réactionnel (Figure 72), démontrant que cette ATPase n'interagit pas avec ces métaux. En revanche, le radiomarquage disparaît lorsque les membranes contenant PAA1 sont incubées avec du cuivre 2+ et du cuivre 1+ (Figure 72), démontrant que cette protéine est capable de lier ces métaux. Cependant, cette expérience ne nous permet pas d'identifier la forme de cuivre transporté par PAA1. En effet, les deux formes ioniques de ce métal semblent induire une inhibition équivalente de la phosphorylation de PAA1. Ces expériences ayant été réalisées avec de fortes concentrations de métaux (50 μM), des gammes de concentration plus faibles de cuivre 1+ et 2+ pourraient permettre de déterminer l'affinité apparente de PAA1 pour chacune de ces formes.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'impact de trois concentrations en cuivre : 1, 10 et 100 μM de cuivre 1+ ou de cuivre 2+. Le cuivre sous forme 1+ est obtenu en ajoutant du TCEP dans la réaction. Un signal de phosphorylation est observé (Figure 73) lorsque les membranes contenant PAA1 sont incubées dans un mélange de BCA / BCS (chélateurs d'ions monovalents). L'intensité de ce signal est plus forte lorsque la réaction se déroule en présence d'EDTA indiquant que la forme de cuivre transporté par PAA1 pourrait être plutôt du cuivre 2+. Comme observé précédemment, un marquage de plus faible intensité est observé lorsque ni métal, ni chélateurs de métaux sont ajoutés (figure 73, Ø). Il est possible que des traces résiduelles de cuivre soient présentes dans les différents milieux, entraînant une légère inhibition de la phosphorylation. L'ajout de cuivre 1 μM sous forme 2+ inhibe légèrement plus la réaction de phosphorylation que lorsqu'il est sous forme 1+ (Figure 73). De même, en présence de 10 μM cuivre, la réaction est totalement inhibée avec le cuivre 2+ alors que l'on peut encore détecter un très faible signal avec le cuivre 1+. Ces résultats suggèrent que PAA1 aurait une meilleure affinité pour le cuivre 2+. Ces expériences seront poursuivies avec une gamme de concentration en cuivre plus fine (entre 0 et 10 μM). Avant de conclure sur ces

expériences, il sera aussi nécessaire de valider la valence du cuivre réellement présent dans les conditions "cuivre1+".

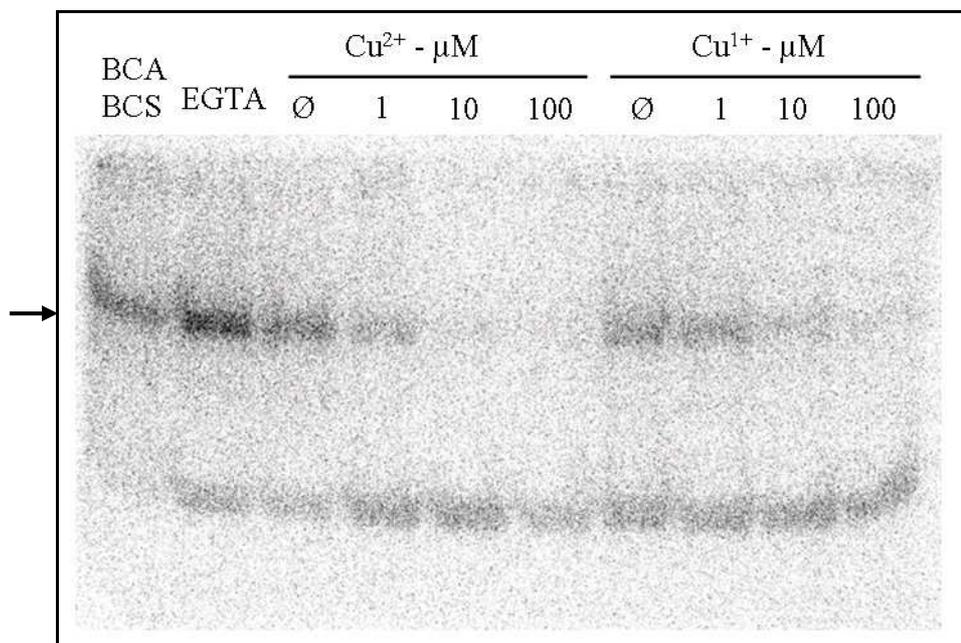


Figure 73 : Détermination de l'affinité apparente de PAA1 pour le cuivre par mesure d'incorporation de Pi radioactif.

Des protéines membranaires (100 μg) provenant de bactéries transformées par un plasmide contenant l'ADNc codant pour PAA1 sont placées dans un milieu constitué d'Hepes 20 mM pH 6, de DMSO 20 % [v/v], de MgCl₂ 10 mM contenant 1) soit un mélange de BCA 1 mM / BCS 100 μM ou 2) de l'EGTA 1 mM, ou 3) différentes concentration de CuCl₂ (0, 1, 10 et 100 μM ajoutés). Le cuivre 1+ est produit grâce à l'addition de TCEP 400 μM dans le milieu réactionnel. La réaction est initiée par ajout de ³²Pi 100 μM et est arrêtée après 10 min d'incubation à 30°C par précipitation des protéines au TCA. Les extraits membranaires sont ensuite rincés, séparés par SDS-PAGE en condition acide. Les signaux de phosphorylation sont révélés par autoradiographie. La flèche indique le signal de phosphorylation correspondant à PAA1.

C. Conclusion

Les expériences décrites ci-dessus avaient pour objectif de déterminer si les protéines HMA1 et PAA1 recombinantes avaient la capacité de lier leurs substrats, qui sont l'ATP et un métal spécifique. Les données obtenues suggèrent que ces deux ATPases peuvent lier l'ATP, et que PAA1 lie spécifiquement le cuivre. En revanche, nous n'avons pas pu identifier le métal lié par HMA1.

Les essais de protéolyse limitée par la trypsine ont été réalisés dans un premier temps en présence d'ATP 5 mM sur la base des conditions expérimentales décrites dans la littérature. Or nous avons montré que cette concentration d'ATP inhibe l'activité protéolytique de la trypsine et ne permet donc pas de conclure sur un éventuel changement de conformation des protéines HMA1 et PAA1 suite à la liaison de l'ATP. Sachant que ce test est classiquement utilisé pour analyser les changements de conformation des ATPases de type P (par exemple pour CadA et SERCA (Wu *et al.*, 2006 ; Danko *et al.*, 2001), il est possible que nous ayons utilisé une forme différente de trypsine ou que la solution d'ATP utilisée contenait des

impureté ayant un effet sur la trypsine. Les expériences de protéolyse effectuées avec des concentrations plus faibles d'ATP, suggèrent que les protéines HMA1 et PAA1 ont encore la capacité de lier l'ATP lorsqu'elles sont produites chez *Lactococcus*. Cependant, ces analyses doivent être complétées en modifiant les quantités de trypsine pour éviter par exemple une protéolyse totale de PAA1. L'utilisation d'une gamme différente de concentration en ATP permettrait aussi de définir l'affinité apparente de HMA1 et PAA1 pour ce nucléotide.

Les expériences de phosphorylation par le Pi indiquent que le signal observé dans des membranes exprimant HMA1 pourrait ne pas être spécifique. En effet, le signal de phosphorylation obtenu dans ces membranes est beaucoup plus faible que celui observé dans des membranes contenant PAA1. De plus, les membranes contenant la forme non phosphorylable de HMA1 (HMA1-AKT) présentent un signal de phosphorylation identique à celles qui contiennent la forme active de la protéine. Enfin, les expériences réalisées sur des protéines membranaires de bactéries transformées par un vecteur non recombinant ainsi que sur des protéines membranaires de *L. lactis* exprimant HMA4 (non montré) montrent la présence d'un faible signal de phosphorylation pour un poids moléculaire apparent identique. Ce signal correspondrait donc à une ATPase endogène de *Lactococcus*. On peut noter que dans certaines expériences, ce signal était plus important dans les membranes exprimant HMA1 par rapport aux membranes contrôle (vecteur vide). Ceci suggère que dans certaines conditions, l'expression de HMA1 (ou un autre paramètre non maîtrisé) induit une accumulation plus importante de cette protéine endogène. Les expériences de RT-PCR présentées dans la figure 55 indiquaient que ni CopA, ni CopB ne sont surexprimées en réponse à l'expression des différentes formes de HMA1, cependant cette analyse a été effectuée au niveau transcriptionnel et non protéique.

Afin d'éliminer des signaux pouvant être induits par des ATPases endogènes, ces expériences de phosphorylation ont aussi été réalisées sur des fractions purifiées de HMA1 et de PAA1 mais n'ont malheureusement pas permis d'obtenir de signal de phosphorylation (non montré). Il est possible que le sel et le détergent présents dans ces fractions purifiées inhibent la réaction ou alors que HMA1 et PAA1 soient inactives après purification.

Au bilan, les données obtenues suggèrent donc que HMA1 n'est pas active dans les conditions analysées. Quand à PAA1, nous avons validé que cette ATPase lie spécifiquement le cuivre sous ses deux formes ioniques. PAA1 semble avoir une affinité apparente meilleure pour le cuivre $2+$. Afin de valider que nous mesurons bien la phosphorylation de PAA1 et non pas celle d'une protéine endogène de *L. lactis*, il est aussi nécessaire de reproduire ces expériences avec la forme mutée de PAA1 au niveau de son site de phosphorylation (PAA1-AKT). Cette forme non phosphorylable de PAA1 vient d'être obtenue et sera caractérisée prochainement.

IV. DISCUSSION

Les approches développées dans ce chapitre avaient pour objectif de déterminer la spécificité ionique de HMA1 et PAA1, ainsi que d'obtenir des données cinétiques nous permettant de comparer ces deux ATPases afin de mieux comprendre leur fonctionnement. Au cours de ce travail, plusieurs études ont été publiées qui, sans remettre en cause la capacité de HMA1 à transporter du cuivre, suggèrent que le rôle physiologique de HMA1 pourrait concerner le transport d'autres cations. Une première étude parue 2008 décrit HMA1 comme une **ATPase à calcium et métaux lourds incluant zinc, cadmium, cobalt et cuivre** (Moreno *et al.*, 2008). Toutefois, il faut rappeler que les auteurs de ces travaux **ont exprimé la forme précurseur de HMA1** (avec sa séquence de transit chloroplastique) chez *Saccharomyces cerevisiae*. Leurs résultats indiquent que HMA1 est capable de compléter une souche mutante de levure dépourvue de l'ATPase à calcium endogène. Des expériences d'import de calcium réalisées avec des vésicules de membranes de *S. cerevisiae* exprimant HMA1 montrent que HMA1 a une activité d'import de calcium de 1,53 nmoles de Ca^{2+} transporté / min / mg de protéines membranaires. Des mesures d'activité ATPase réalisées sur les membranes de levure montrent aussi que l'activité ATPase de HMA1 est stimulée par l'ajout de cuivre, de zinc, de cobalt et de cadmium. Plus récemment, Kim et collaborateurs (2009) ont montré (comme nous l'avons fait précédemment) que HMA1 transporte du zinc lorsqu'elle est exprimée en levure (mais n'ont pas testé le cuivre). D'après leur étude *in planta* (en utilisant des mutants d'insertion), HMA1 serait impliquée dans **l'export du zinc chloroplastique** mais l'écotype d'*Arabidopsis* utilisé pour ces expériences (Col) est différent de celui que nous avons utilisé (Ws). Les résultats obtenus par Moreno et collaborateurs (2008) valident les travaux ayant montré que HMA1 transportait du cuivre et du zinc lorsqu'elle est exprimée en levure (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2009) et apportent de nouvelles données sur la fonction de cette protéine. Cependant, des différences de résultats, inexplicables pour l'instant, sont observées entre ces différents travaux : en accord avec les travaux de Kim et collaborateurs (2009), nous avons montré que **la forme précurseur de HMA1, exprimée chez *S. cerevisiae*, n'avait pas d'activité de transport de métaux** (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2009) alors que les résultats présentés par Moreno et collaborateurs (2008) ont été obtenus à partir de la forme précurseur de HMA1. De plus, Moreno et collaborateurs (2008) observent que l'expression de HMA1 dans la levure induit une résistance de ces cellules au cuivre et au zinc alors que nos travaux (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006) et ceux de Kim et collaborateurs (2009) indiquent que l'expression de HMA1 induit une sensibilité des levures à ces métaux.

L'ensemble de ces données renforce ainsi la nécessité de poursuivre la caractérisation biochimique de HMA1 afin de déterminer sans ambiguïté son substrat métallique et ainsi son rôle précis dans la régulation de l'homéostasie des métaux chloroplastiques.

A. Etude sur l'organisme *L. lactis* entier

Ces analyses avaient pour objectif de déterminer l'impact de l'expression des ATPases HMA1 et PAA1 sur la croissance de bactéries exprimant ces protéines, en présence de cuivre. Nous avons observé que **les bactéries qui expriment HMA1, PAA1 et HMA4 sont sensibles au cuivre présent dans le milieu de culture contrairement à des bactéries contenant un plasmide non recombinant**. Ce résultat est surprenant car les données de dans la littérature montrent que l'expression des ATPases dans des procaryotes confèrent généralement une résistance aux métaux et non pas une sensibilité (Lewinson *et al.*, 2009). Le résultat le plus étonnant est le fait que **les bactéries qui expriment la forme mutée de HMA1, au niveau de son site catalytique, sont aussi sensibles à la quantité de cuivre présente dans le milieu**. Cette sensibilité au cuivre est corrélée à une augmentation de la quantité de cuivre dans le cytoplasme des bactéries surexprimant ces ATPases, et n'est donc pas liée à une augmentation de la concentration locale de ce métal autour des membranes (pouvant induire un stress oxydant). Deux hypothèses peuvent être proposées actuellement pour expliquer ce résultat :

- Ces ATPases pourraient se comporter comme des porines après une longue exposition à de fortes concentrations de cuivre dans le milieu. Elles permettraient alors un transport indépendant de l'ATP (pour la forme mutée de HMA1) et indépendant de la spécificité ionique de ces ATPases (pour HMA4 qui ne transporte pas de zinc).
- La deuxième hypothèse, la plus probable, est que l'expression de ces ATPases recombinantes pourrait induire la surexpression de protéines endogènes de *L. lactis* pouvant catalyser l'import de cuivre dans la bactérie. Les candidats principaux sont CopA et CopB. En effet, ces deux ATPases à cuivre sont exprimées lorsque *L. lactis* est placée dans un milieu riche en cuivre (Magnani *et al.*, 2008). Cependant, nous n'avons pas observé d'accumulation plus importante des transcrits *CopA* et *CopB* dans les bactéries exprimant HMA1 et PAA1, et sauf si l'expression de *CopA* et *CopB* n'est pas corrélée à la quantité de protéines, ces résultats suggèrent qu'une autre ATPase est impliquée.

B. Mesure de l'activité ATPase sur membranes brutes de *Lactococcus* exprimant les ATPases recombinantes ou sur fractions purifiées de HMA1 et PAA1,

Les tests d'activité ATPase utilisant un système de régénération de l'ATP ou le dosage de Pi n'ont pas permis de mettre en évidence d'activité ATPase liée à HMA1 ou PAA1 que ces protéines soient présentes dans des membranes de *Lactococcus* ou partiellement purifiées. Moreno et collaborateurs (2008) mesurent une activité ATPase associée à HMA1 grâce au système de dosage de Pi dans des membranes brutes de levure exprimant HMA1. Cependant, en utilisant un protocole et des conditions expérimentales similaires, nous n'avons pu reproduire leur résultat sur les membranes de *Lactococcus* exprimant HMA1. Il est possible que l'activité ATPase endogène dans les membranes de levure soit beaucoup plus faible que celle mesurée dans les membranes de *Lactococcus*, permettant de détecter de faibles activités

ATPase spécifiques associées aux protéines HMA1 ou PAA1. Il est aussi possible que l'activité de HMA1 et PAA1 nécessite un partenaire présent seulement chez les eucaryotes ou que ces protéines subissent des modifications post-traductionnelles nécessaires pour leur fonctionnement. Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait que ATP7a, une ATPase de type P_{1B} humaine est glycosylée (Yamaguchi *et al.*, 1996).

A ce jour, il n'y a aucune donnée disponible dans la littérature montrant la caractérisation enzymatique d'ATPases de type P_{1B} de plante après expression et purification en système procaryote. La seule exception est la protéine HMA4 qui est capable de compléter un mutant d'*E. coli* déficient dans un transporteur de zinc (Mills *et al.*, 2003). Toutes les caractérisations biochimiques ont été réalisées dans le système eucaryote levure soit par complémentation de mutants soit par expression fonctionnelle (Eren & Arguello, 2004 ; Gravot *et al.*, 2004 ; Verret *et al.*, 2005 ; Seigneurin Berny *et al.*, 2006 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2009).

C. Capacité de HMA1 et de PAA1 à lier leurs substrats

Les tests effectués afin de déterminer si HMA1 et PAA1 exprimées en système hétérologue *Lactococcus* peuvent toujours interagir avec leurs substrats indiquent très clairement que **ces deux ATPases peuvent interagir avec l'ATP et changer de conformation**. D'après les résultats obtenus sur les protéines purifiées, il semble que l'ATP a un effet protecteur sur la protéolyse de PAA1 par la trypsine, mais que au contraire, l'ATP révèle des sites de digestion trypsique sur la protéine HMA1 (Figure 68). D'après la littérature, l'ATP protège les protéines de l'action de la trypsine car les ATPases liées à l'ATP ont une structure très compacte (Danko *et al.*, 2001 a, b). Ces expériences devront donc être confirmées en modifiant les conditions de protéolyse limitée (moins de trypsine par rapport à la quantité de protéine purifiée). Ces expériences permettront aussi de déterminer une affinité apparente de ces deux protéines pour l'ATP, paramètre qui peut être important pour revisiter éventuellement les conditions de mesure de l'activité de ces ATPases.

Les expériences d'**incorporation de Pi ne permettent pas de définir le substrat métallique de HMA1**. En revanche, nous avons montré que **PAA1 peut lier à la fois du cuivre 1⁺ et du cuivre 2⁺**. Il sera nécessaire de valider ces résultats en utilisant comme contrôle négatif la forme de PAA1 mutée au niveau de son site catalytique (plutôt que d'utiliser des membranes provenant de bactéries transformées par un vecteur non recombinant). Si cette forme mutée de PAA1 ne peut effectivement pas être phosphorylée, ces expériences seront poursuivies sur les membranes de *Lactococcus* exprimant PAA1 afin de déterminer ses caractéristiques enzymatiques (métaux transportés, affinité apparente...). D'après la classification publiée par Arguello (2003), PAA1 appartient au sous-groupe P_{1B-1}, dont les membres transporteraient de l'argent et du cuivre monovalent. Cependant, les travaux récents de Chintalapati et collaborateurs indiquent que CtrA2, une autre ATPase de type P_{1B-1}

serait aussi impliquée dans le transport des deux formes de cuivre (Chintalapati *et al*, 2008), suggérant que les ATPases de ce sous-groupe auraient en fait la capacité de transporter les deux formes de cuivre plutôt que des ions monovalents. Pour valider cette hypothèse, il sera nécessaire d'effectuer les tests de phosphorylation de PAA1 en présence d'argent dans le milieu, et de valider aussi la valence du cuivre présent dans les milieux réactionnels.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

HMA1 et PAA1 sont deux ATPases de l'enveloppe du chloroplaste permettant le transport du cuivre dans le chloroplaste. Afin de déterminer les raisons de cette apparente redondance fonctionnelle, nous avons développé en parallèle deux approches complémentaires :

La première approche avait pour objectif de mieux comprendre les rôles respectifs de HMA1 et de PAA1 *in planta*.

La seconde approche visait à caractériser *in vitro* HMA1 et PAA1 afin de déterminer leurs spécificités ioniques et leurs paramètres cinétiques. Pour cela, nous devions au préalable produire ces protéines en système hétérologue.

Apport de l'étude de HMA1 et PAA1 réalisée en système hétérologue

Lactococcus est un système d'expression procaryote qui semble adapté à la production de protéines membranaires eucaryotes. Nous avons donc développé ce système d'expression au laboratoire en collaboration avec Annie Frelet-Barrand (LPCV) dans le cadre du projet CEA-PM. L'optimisation des protocoles d'expression, de purification des protéines membranaires totales, de solubilisation et de purification des ATPases d'intérêt, nous a permis **d'atteindre des niveaux de production et de rendements compatibles avec une analyse biochimique de ces protéines**. De plus, nous avons aussi réussi à produire dans ce système **quatre ATPases de types P_{1B} de plantes** : HMA1, HMA3, HMA4 et PAA1. Toutes les protéines exprimées ont été retrouvées dans la fraction membranaire de *L. lactis* suggérant que leur repliement est correct et qu'elles sont donc potentiellement fonctionnelles.

Ce système d'expression donne accès à de **nombreuses perspectives pour l'étude des protéines membranaires** de plantes en général et des ATPases en particulier. En effet, la principale limite à la caractérisation *in vitro* des protéines membranaires est la difficulté à les produire en système hétérologue. *Lactococcus lactis* semble donc être un système adapté pour la production de ces protéines "difficiles". De plus, le fait que cet organisme soit un procaryote facilite la caractérisation de protéines membranaires lors d'expériences de complémentations fonctionnelles de mutants car contrairement à la levure, *L. lactis* n'est constituée que d'un seul compartiment cellulaire.

Même si nous n'avons pas encore pu mettre en évidence d'activité ATPase associée à HMA1 et PAA1, nous avons réussi à produire dans ce système **deux autres protéines membranaires qui sont fonctionnelles** (une quinone oxydoreductase associée à l'enveloppe des plastes, et AATP1, le transporteur ATP/ADP de l'enveloppe du chloroplaste ; Frelet-Barrand / Boutigny *et al.*, soumis). Ces résultats sont encourageants et suggèrent que HMA1 et PAA1 sont potentiellement fonctionnelles après expression dans ce système. Des

expériences préliminaires de protéolyse limitée par la trypsine indiquent que les protéines recombinantes HMA1 et PAA1 sont capables de lier l'ATP et de changer de conformation (Figure 68, p. 148).

Nous avons aussi montré par des expériences de phosphorylation par du phosphate inorganique que **la protéine recombinante PAA1 lie spécifiquement du cuivre sous forme 1+ ou 2+** (Figure 72, p. 152). Ces résultats seront validés à très court terme en effectuant les mêmes expériences de phosphorylation avec la forme de PAA1 qui est mutée au niveau de son site de phosphorylation. Nous venons d'obtenir les membranes de *Lactococcus* exprimant cette version mutée de PAA1. Si ces résultats sont validés, nous pourrions poursuivre ces expériences afin de déterminer l'affinité de PAA1 pour ses substrats. Nous pouvons aussi envisager une étude structure/fonction, qui permettrait de déterminer les acides aminés essentiels pour la liaison au cuivre. Quant à HMA1, dans les conditions expérimentales utilisées jusqu'à présent, nous n'avons pas pu mettre en évidence sa spécificité ionique. Nous envisageons d'effectuer des essais de phosphorylation avec de l'ATP. En parallèle, nous venons d'initier une collaboration avec Alain Vavasseur (CEA Cadarache) et Rémi Gibrat (LBPM, Montpellier) afin de mesurer l'import d'ions dans des vésicules contenant HMA1 et PAA1. Ces vésicules sont chargées avec des fluorophores qui réagissent avec les métaux. L'activité des protéines (et donc l'import des métaux dans les vésicules) est suivie par spectrofluorescence. Ces mesures, qui n'auraient pu avoir lieu sans la production de ces ATPases en système hétérologue, vont être initiées très prochainement.

Apport de l'étude de HMA1 et PAA1 réalisée in planta

L'approche *in planta* a regroupé des stratégies diverses afin de définir (a) les conditions dans lesquelles HMA1 est essentielle, (b) si HMA1 et PAA1 présentent des redondances fonctionnelles *in planta*, (c) si il existe des conditions dans lesquelles ces ATPases sont transcrites de façon différentielle et (d) enfin si il existe un troisième transporteur de cuivre associé à l'enveloppe des chloroplastes.

Nous avons ainsi montré que **la fonction de HMA1 est essentielle pendant la germination lorsque la plante cultivée subit un stress salin**. Ces résultats indiquent que HMA1 est donc probablement active aussi dans des plastes non photosynthétiques. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kim et collaborateurs montrant que HMA1 est présente dans les racines (Kim *et al.*, 2009). Le stress salin engendrant un stress oxydatif, ces observations sont compatibles avec un rôle de HMA1 dans la délivrance du cuivre à la SOD CSD2, protéine essentielle lors de stress oxydatif. Pour mieux comprendre le rôle de HMA1 lors de stress salin ou oxydatifs, il sera nécessaire d'analyser la croissance des mutants *hma1* et surexpresses HMA1 après transfert des plantules matures dans des milieux de culture riches en sels ou autres molécules induisant un stress oxydatif.

Les cultures en conditions autotrophes exacerbent la photosensibilité du mutant *hma1*. Dans ces conditions, et pour des intensités lumineuses inférieures à 200 μmoles de photons / sec / m^2 , **le phénotype du mutant *hma1* peut être supprimé par ajout de cuivre démontrant qu'il existe un lien *in planta* entre HMA1 et transport du cuivre.** Ces analyses valident aussi le rôle essentiel de HMA1 lors d'un stress lumineux, comme cela avait déjà été suggéré (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Une étude récente confirme aussi ces résultats en démontrant que HMA1 est impliquée dans le cycle water-water en fournissant du cuivre à la SOD Cu/Zn chloroplastique (Higuchi *et al.*, 2009).

D'autre part, les expériences que nous avons effectuées indiquent que **HMA1 et PAA1 ne présentent pas de redondance fonctionnelle.** En effet, la surexpression de HMA1 dans un mutant *paal* ne permet pas de supprimer son phénotype. Au contraire, cette surexpression induit une photosensibilité accrue en forte lumière, qui pourrait être provoquée par une accumulation de cuivre et de fer dans les chloroplastes de ces lignées. Ces résultats valident le rôle physiologique de HMA1 dans l'homéostasie du cuivre et indiquent que le cuivre transporté par HMA1 n'est pas disponible pour alimenter la plastocyanine. Ainsi, selon le transporteur impliqué (HMA1 ou PAA1), le cuivre pourrait ensuite être délivré aux protéines cibles par des voies différentes. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces observations :

- La **valence de cuivre transporté** par HMA1 et PAA1 n'est pas la même : PAA1 transporterait du cuivre monovalent (Arguello, 2003) et HMA1 pourrait transporter du cuivre divalent. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'il existe une chaperonne à cuivre divalent dans l'espace intermembranaire de l'enveloppe du chloroplaste (Burkhead *et al.*, 2003). Cependant, les résultats obtenus avec la protéine PAA1 recombinante (phosphorylation avec du Pi) suggèrent que PAA1, en système hétérologue, pourrait lier à la fois du cuivre 1^+ et du cuivre 2^+ .

- L'hypothèse la plus probable est que HMA1 et PAA1 interagissent avec des **métallochaperonnes différentes** qui auraient elles-mêmes des **cibles spécifiques.**

Afin de déterminer si HMA1 et PAA1 sont les deux seules voies d'entrée du cuivre, nous avons obtenu le double mutant *hma1/paal* et initié sa caractérisation phénotypique. Le double mutant est viable et capable d'effectuer un cycle complet (graine à graine), ce qui indique qu'**il existe une troisième voie d'import de cuivre dans le chloroplaste** encore non caractérisée. Nos résultats suggèrent que ce troisième transporteur a une faible affinité pour le cuivre et que, en conditions de forte demande en cuivre (fortes intensités lumineuses) dans le chloroplaste, son activité n'est pas suffisante pour compenser l'absence de HMA1 et PAA1. Cette troisième voie d'import du cuivre semble être partiellement redondante avec la fonction de PAA1 et pas avec celle de HMA1. Il est possible que le transporteur correspondant soit impliqué dans le transport d'un autre métal et qu'il n'intervienne dans l'homéostasie du cuivre que dans des conditions extrêmes (stress lumineux, perte d'activité des protéines HMA1 et

PAA1). Des candidats potentiels seraient les protéines PIC1 et ZIP4, deux protéines qui peuvent transporter du cuivre lorsqu'elles sont exprimées en système hétérologue levure (Duy *et al.*, 2007 ; Wintz *et al.*, 2003). Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si ces transporteurs peuvent être impliqués dans l'homéostasie du cuivre chloroplastique.

Etudes complémentaires en cours

Identifier les partenaires protéiques de HMA1 et de PAA1 *in planta* nous permettrait de mieux comprendre le rôle respectif de ces deux ATPases. Pour cela, en collaboration avec Annie Frelet-Barrand et Daphné Seigneurin-Berny, des plantes surexprimant HMA1 fusionnée à une étiquette *Strep*-tag II ont été obtenues. Grâce à la présence de cette étiquette, HMA1 a ensuite été purifiée à partir des protéines membranaires issues de ces plantes. Avec cette approche, nous souhaitons co-purifier HMA1 avec son ou ses partenaires. L'identification des protéines co-purifiées avec HMA1 a été réalisée par spectrométrie de masse (collaboration avec le Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, Grenoble). Les résultats obtenus à ce jour ne nous ont pas permis d'identifier de partenaire potentiel. Ces expériences vont être poursuivies en effectuant les purifications en présence de cuivre dont la présence peut avoir un impact sur l'interaction entre HMA1 et sa métallochaperonne. D'autre part, le partenaire pouvant être plus faiblement représenté que la protéine HMA1 (qui est surexprimée dans ces plantes), nous allons essayer de purifier ces partenaires en incubant des fractions subchloroplastiques purifiées (enveloppe et stroma) avec la protéine HMA1 recombinante préalablement purifiée sur matrice d'affinité *Strep-tactin*.

En parallèle, nous étudions aussi les modifications du protéome chloroplastique induites par la surexpression ou la carence en HMA1. Ces analyses sont aussi effectuées en collaboration avec le Laboratoire d'étude de la Dynamique des Protéomes (LEDyP, Grenoble). Cette approche permettra peut être d'identifier la métallochaperonne chloroplastique interagissant avec HMA1 et éventuellement d'autres protéines qui seraient indirectement affectées par la variation d'expression de HMA1 (comme CSD2 par exemple). Ces études comparatives sont basées sur l'utilisation de la spectrométrie nanoLC-MS. Elles sont actuellement possibles grâce à la génération récente d'une base de données AMT (Accurate Mass and Time tag strategy) appelée "AT-Chloro" (obtenue au laboratoire en collaboration avec le laboratoire LEDyP ; Ferro *et al.*, soumis). Cette base de données contient plus de 1300 protéines chloroplastiques qui sont toutes caractérisées par des informations spécifiques (séquence et masse des peptides, temps de rétention, spectre MS/MS...) permettant d'utiliser cette base "AT-Chloro" pour des études comparatives à l'échelle d'un organite entier.

Complémentarité des systèmes d'étude in vitro et in vivo

Enfin, l'utilisation de techniques de caractérisation fonctionnelle *in planta* et *in vitro* permet d'obtenir des données complémentaires sur le fonctionnement des protéines étudiées. Les

approches *in vitro* permettent aussi de "simplifier" le système d'étude. En effet, les observations obtenues *in planta* peuvent ne pas être directement liées à la déficience ou la surexpression d'une ATPase de type P_{1B} mais plutôt à une réponse complexe de l'organisme suite à une carence ou un stress. D'un autre côté, bien que complémentaires, ces approches peuvent aussi apporter des résultats contradictoires. En effet, les expériences *in vitro* ne permettent pas de se replacer dans un environnement cellulaire où les ions métalliques n'existent pas à l'état libre mais liés à des chaperonnes, ayant des partenaires spécifiques. Les différences de résultats obtenus pour la caractérisation fonctionnelle de HMA1 en levure ou *in planta* (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2009) illustrent bien la nécessité de compléter des approches *in vitro* par des approches fonctionnelles *in vivo*. Actuellement, une controverse existe aussi sur le rôle des domaines de liaison aux métaux de l'ATPase HMA2 d'*Arabidopsis*. En effet, les analyses *in vitro* indiquent que ces domaines ne sont pas essentiels pour la spécificité et l'activité de la protéine (Eren *et al.*, 2006) alors que des analyses *in planta* montrent que le domaine N-terminal de la protéine HMA2 est essentiel pour son activité *in planta* (Wong *et al.*, 2008).

Rôles de HMA1 et PAA1 dans le chloroplaste

L'ensemble des données que nous avons obtenu *in planta* nous permet de compléter le modèle proposé par l'équipe (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006) sur le rôle de HMA1 et de PAA1 dans l'homéostasie du cuivre chloroplastique (Figure 74). D'après ce modèle, PAA1 est la voie principale d'import du cuivre dans le chloroplaste. Elle interagirait avec deux métallochaperonnes : CCS qui délivrerait le cuivre à la SOD CSD2, et une autre métallochaperonne Y (non identifiée) dont la cible serait PAA2. HMA1 est une autre voie d'import de cuivre, voie essentielle en condition de stress lumineux (et éventuellement de stress oxydatif non lié à la lumière, dans le cas des plastes de racines). HMA1 interagirait avec CCS ou avec une autre métallochaperonne X (non identifiée) dont la cible est uniquement CSD2. Enfin, un troisième transporteur de cuivre de faible affinité est présent dans l'enveloppe des chloroplastes, qui permettrait de fournir du cuivre aux mêmes métallochaperonnes que celles interagissant avec PAA1. Ce transporteur, inconnu pour l'instant, semble avoir une faible affinité pour le cuivre. Ce transporteur pourrait être impliqué dans le transport d'autres ions métalliques et importer du cuivre uniquement dans des conditions spécifiques (détoxification du cuivre cellulaire, forte demande en cuivre chloroplastique corrélée à une activité photosynthétique importante).

Le modèle présenté ci-dessous (Figure 74) décrit les rôles potentiels de HMA1 et PAA1 en fonction de l'intensité lumineuse et la quantité de cuivre présente dans le milieu de culture :

- Lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu carencé en cuivre et sous une faible intensité lumineuse (Figure 74, A.), la photosynthèse est peu active et la quantité de ROS produite est faible. PAA1 est essentielle dans ces conditions (Figure 74, et Figure 33 p. 85)

pour alimenter en cuivre la plastocyanine (via PAA2). La concentration en cuivre étant limitante, il est possible que le cuivre importé par PAA1 soit principalement utilisé pour alimenter la plastocyanine. HMA1 serait donc nécessaire pour fournir le cuivre à CSD2 (Figure 74, chapitre I). Dans ces conditions, le troisième transporteur de cuivre de l'enveloppe des chloroplastes de faible affinité ne serait pas actif.

- Lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu riche en cuivre et sous une faible intensité lumineuse (Figure 74, B.), la photosynthèse est toujours peu active et la production de ROS faible. Cependant l'expression de CSD2 (au niveau transcriptionnel et protéique) augmente ainsi que son activité (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Cette protéine pourrait agir comme un « puits » pour absorber l'excès de cuivre chloroplastique. Abdel-Ghany et collaborateurs (2005) montrent que la quantité de plastocyanine augmente aussi en réponse à l'augmentation de la concentration en cuivre, suggérant que cette protéine possède aussi un rôle de « puits » pour absorber l'excès de cuivre chloroplastique. Dans ces conditions, le troisième transporteur de cuivre est actif du fait de la forte concentration en cuivre et pourrait donc être impliqué dans la détoxification du cuivre. Le cuivre importé par ce transporteur pourrait être adressé à PAA2 et CSD2 par les mêmes chaperonnes que celles prenant en charge le cuivre provenant de PAA1. Dans ce cas, HMA1 ne serait pas essentielle.

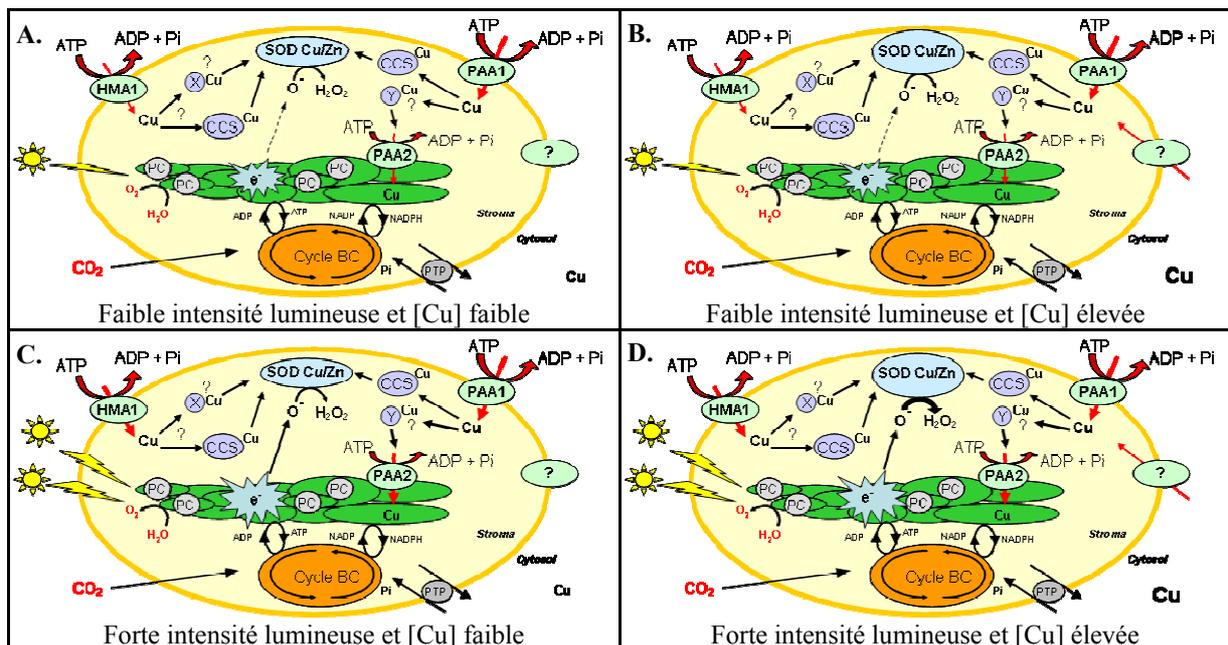


Figure 74 : Rôle des transporteurs de cuivre de l'enveloppe du chloroplaste.

Ce modèle a été établi à partir des données obtenues au cours de ce travail. Il représente les rôles potentiels de HMA1, PAA1 et un troisième transporteur de cuivre non caractérisé dans l'import du cuivre chloroplastique en fonction de la disponibilité du cuivre dans le milieu et en fonction de l'intensité lumineuse.

PC : plastocyanine, Cycle BC : cycle de Benson-Calvin. PTP : transporteur de phosphate/trioses-phosphate.

- En condition de forte intensité lumineuse et sur un milieu carencé en cuivre (Figure 74, C.), la photosynthèse est très active. Cet état implique probablement une augmentation du turnover (ou un besoin de synthèse plus fort) de la plastocyanine, qui doit être compensé par un

apport de cuivre plus important dans le lumen des thylacoïdes. Ainsi, les flux de cuivre provenant de PAA1 sont principalement dirigés vers PAA2 afin d'alimenter la plastocyanine. D'autre part, la production de ROS augmente fortement, nécessitant une forte activité SOD pour leur détoxification. Dans ces conditions, la SOD CSD2 serait principalement alimentée en cuivre par HMA1. Cependant, en condition limitante en cuivre, ce sont essentiellement les SOD à fer chloroplastiques qui interviennent dans la détoxification des ROS. Le troisième transporteur ne serait pas actif à cause de la concentration trop faible en cuivre.

- Enfin, lorsque le cuivre n'est pas limitant et en forte lumière, (Figure 74, D.), l'expression de HMA1 et de PAA2 augmenterait. La surexpression de PAA2 (si elle est validée au niveau protéique) entraînerait un adressage du cuivre importé par PAA1 principalement vers les thylacoïdes. Dans ces conditions, la surexpression de HMA1 permettrait de fournir le cuivre nécessaire à l'augmentation de l'expression et de l'activité de CSD2. Le cuivre provenant du troisième transporteur serait principalement dirigé vers PAA2.

Ainsi, PAA1 serait un transporteur constitutif qui alimente le chloroplaste en cuivre et fournit principalement le cuivre à la plastocyanine *via* PAA2. Au contraire, HMA1 aurait la possibilité d'adapter son niveau d'expression aux conditions environnementales et pourrait notamment alimenter CSD2 lorsque la majorité du cuivre importé par PAA1 est adressé à PAA2 pour alimenter la plastocyanine et donc la photosynthèse.

Les fonctions de HMA1 et de PAA1 dans l'import du cuivre ne sont donc pas redondantes. Nos observations confirment le fait que les plastes ont besoin de plusieurs systèmes de transport du cuivre afin de pouvoir s'adapter aux conditions environnementales. Les mécanismes de régulation de ces voies sont probablement très complexes mais indispensables pour permettre à la cellule de modifier l'adressage du cuivre en fonction des besoins dans les différents organites.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdel-Ghany SE** (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta* **229**: 767-779
- A. Abdel-Ghany SE, Burkhead JL, Gogolin KA, Andres-Colas N, Bodecker JR, Puig S, Penarrubia L, Pilon M** (2005) AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett* **579**: 2307-2312
- B. Abdel-Ghany SE, Muller-Moule P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T** (2005) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* **17**: 1233-1251
- Abdel-Ghany SE, Pilon M** (2008) MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **283**: 15932-15945
- Andres-Colas N, Sancenon V, Rodriguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Penarrubia L** (2006) The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* **45**: 225-236
- Arguello JM** (2003) Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol* **195**: 93-108
- Arguello JM, Eren E, Gonzalez-Guerrero M** (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals* **20**: 233-248
- Asada K** (1999) THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 601-639
- Axelsen KB, Palmgren MG** (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* **46**: 84-101
- Axelsen KB, Palmgren MG** (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 696-706

B

- Bal N, Wu CC, Catty P, Guillain F, Mintz E** (2003) Cd²⁺ and the N-terminal metal-binding domain protect the putative membranous CPC motif of the Cd²⁺-ATPase of *Listeria monocytogenes*. *Biochemical Journal* **369**: 681-685
- Balk J, Lobreaux S** (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 324-331
- Bartolommei G, Buoninsegni FT, Moncelli MR** (2004) Calcium transport by sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase can be investigated on a solid-supported membrane. *Bioelectrochemistry* **63**: 157-160
- Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R** (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem* **258**: 13281-13286
- Block MA, Douce R, Joyard J, Rolland N** (2007) Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynth Res* **92**: 225-244
- Blumwald E, Pool RJ** (1985) Nitrate storage and retrieval in *Beta Vulgaris*: Effects of nitrate and chloride on proton gradients in tonoplast vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 3683-3687
- Bork C, Schwenn JD, Hell R** (1998) Isolation and characterization of a gene for assimilatory sulfite reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **212**: 147-153
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Briat JF, Lebrun M** (1999) Plant response to metal Toxicity. *C R Acad Sci III* **322**: 43-54
- Briat JF, Lobreaux S** (1998) Iron storage and ferritin in plants. *Met Ions Biol Syst* **35**: 563-584
- Burkhead JL, Abdel-Ghany SE, Morrill JM, Pilon-Smits EA, Pilon M** (2003) The *Arabidopsis thaliana* CUTA gene encodes an evolutionarily conserved copper binding chloroplast protein. *Plant J* **34**: 856-867
- Burkhead JL, Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M** (2009) Copper homeostasis. *New Phytol*

C

- Carde JP, Joyard J, Douce R** (1982) Electron-Microscopic Studies of Envelope Membranes from Spinach Plastids. *Biology of the Cell* **44**: 315-&
- Chang T, Penefsky HS** (1973) Aurovertin, a fluorescent probe of conformational change in beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **248**: 2746-2754
- Changela A, Chen K, Xue Y, Holschen J, Outten CE, O'Halloran TV, Mondragon A** (2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* **301**: 1383-1387
- Cheigh CI, Pyun YR** (2005) Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol Lett* **27**: 1641-1648
- Chintalapati S, Al Kurdi R, van Scheltinga AC, Kuhlbrandt W** (2008) Membrane structure of CtrA3, a copper-transporting P-type-ATPase from Aquifex aeolicus. *J Mol Biol* **378**: 581-595
- Chu CC, Lee WC, Guo WY, Pan SM, Chen LJ, Li HM, Jinn TL** (2005) A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**: 425-436
- Chua NH** (1980) Electrophoresis analysis of chloroplast proteins. *Methods Enzymol* **69**: 434-436
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 735-743
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 159-182
- Cobine PA, Pierrel F, Winge DR** (2006) Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 759-772
- Cohu CM, Pilon M** (2007) Regulation of superoxyde dismutase expression by copper availability. *Physiol Plant* **129**: 747-745
- Colangelo EP, Guerinot ML** (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**: 3400-3412
- Colangelo EP, Guerinot ML** (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 322-330
- Courville P, Chaloupka R, Cellier MF** (2006) Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. *Biochem Cell Biol* **84**: 960-978

Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat JF (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J* **347 Pt 3**: 749-755

D

Dainty SJ, Patterson CJ, Waldron KJ, Robinson NJ (2009) Interaction between cyanobacterial copper chaperone Atx1 and zinc homeostasis. *J Biol Inorg Chem*

Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J, Klausner RD (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**: 393-402

Danko S, Daiho T, Yamasaki K, Kamidochi M, Suzuki H, Toyoshima C (2001) ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin. *FEBS Lett* **489**: 277-282

Danko S, Yamasaki K, Daiho T, Suzuki H, Toyoshima C (2001) Organization of cytoplasmic domains of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in E(1)P and E(1)ATP states: a limited proteolysis study. *FEBS Lett* **505**: 129-135

de Meis L, Vianna AL (1979) Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **48**: 275-292

de Vos WM, Vaughan EE (1994) Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 217-237

Drummond RSM, Tutone A, Li YC, Gardner RC (2006) A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system. *Plant Science* **170**: 78-89

Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P, Lilley KS (2006) Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6518-6523

Durrant I, Benge LC, Sturrock C, Devenish AT, Howe R, Roe S, Moore M, Scozzafava G, Proudfoot LM, Richardson TC, et al. (1990) The application of enhanced chemiluminescence to membrane-based nucleic acid detection. *Biotechniques* **8**: 564-570

Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol* **144**: 197-205

Duy D, Wanner G, Meda AR, von Wiren N, Soll J, Philippar K (2007) PIC1, an ancient permease in Arabidopsis chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell* **19**: 986-1006

E

Eastmond PJ, Graham IA (2001) Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci* **6**: 72-78

Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5624-5628

Eisses JF, Kaplan JH (2002) Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein. *J Biol Chem* **277**: 29162-29171

Eren E, Arguello JM (2004) Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(IB)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiol* **136**: 3712-3723

Eren E, Kennedy DC, Maroney MJ, Arguello JM (2006) A novel regulatory metal binding domain is present in the C terminus of Arabidopsis Zn²⁺-ATPase HMA2. *J Biol Chem* **281**: 33881-33891

F

Falson P, Menguy T, Corre F, Bouneau L, De Gracia AG, Soulié S, Centeno. F, Moller JV, Le Maire M (1997) The cytoplasmic loop between transmembrane segments 6 and 7 in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase binds Ca²⁺ and is functionally important. *J Biol Chem* **272**: 17258-17262

Ferro M, Salvi D, Brugiére S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Proteomics* **2**: 325-345

Ferro M, Salvi D, Riviere-Rolland H, Vermaat T, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11487-11492

- Finney LA, O'Halloran TV** (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**: 931-936
- Folmer DE, Elferink RP, Paulusma CC** (2009) P4 ATPases - lipid flippases and their role in disease. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 628-635
- Fraga CG, Oteiza PI, Keen CL** (2005) Trace elements and human health. *Mol Aspects Med* **26**: 233-234
- Froehlich JE, Wilkerson CG, Ray WK, McAndrew RS, Osteryoung KW, Gage DA, Phinney BS** (2003) Proteomic study of the Arabidopsis thaliana chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res* **2**: 413-425

G

- Gasson MJ, De Vos WM** (1994) Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria, London
- Gendre D, Czernic P, Conéjéro G, Pianelli K, Briat JF, Lebrun M, Mari S** (2007) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens* encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *Plant J* **49**: 1-15
- Gonzalez-Guerrero M, Arguello JM** (2008) Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: Soluble Cu⁺ chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 5992-5997
- Gonzalez-Guerrero M, Hong D, Arguello JM** (2009) Chaperone-mediated Cu⁺ Delivery to Cu⁺ Transport ATPases: REQUIREMENT OF NUCLEOTIDE BINDING. *J Biol Chem* **284**: 20804-20811
- Gravot A, Lieutaud A, Verret F, Auroy P, Vavasseur A, Richaud P** (2004) AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett* **561**: 22-28
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7220-7224
- Grotz N, Guerinot ML** (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 595-608
- Guerinot ML** (2000) To improve nutrition for the world's population. *Science* **288**: 1966-1967

Guerinot ML, Eide D (1999) Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 244-249

H

Hansch R, Mendel RR (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol* **12**: 259-266

Hatori Y, Hirata A, Toyoshima C, Lewis D, Pilankatta R, Inesi G (2008) Intermediate phosphorylation reactions in the mechanism of ATP utilization by the copper ATPase (CopA) of *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* **283**: 22541-22549

A. Haydon MJ, Cobbett CS (2007) A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**: 1705-1719

B. Haydon MJ, Cobbett CS (2007) Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol* **174**: 499-506

Higuchi M, Ozaki H, Matsui M, Sonoike K (2009) A T-DNA insertion mutant of *AtHMA1* gene encoding a Cu transporting ATPase in *Arabidopsis thaliana* has a defect in the water-water cycle of photosynthesis. *J Photochem Photobiol B* **94**: 205-213

Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L, Amasino RM (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**: 1227-1234

Huang L, Berkelman T, Franklin AE, Hoffman NE (1993) Characterization of a gene encoding a Ca(2+)-ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10066-10070

Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1327-1339

I

Ide Y, Nagasaki N, Tomioka R, Suito M, Kamiya T, Maeshima M (2007) Molecular properties of a novel, hydrophilic cation-binding protein associated with the plasma membrane. *J Exp Bot* **58**: 1173-1183

J

- Jarvis P** (2007) Intracellular signalling: chloroplast backchat. *Curr Biol* **17**: R552-555
- Jarvis P** (2008) Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol* **179**: 257-285
- Jensen LT, Culotta VC** (2005) Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. *J Biol Chem* **280**: 41373-41379
- Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML** (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10619-10624
- Jeong J, Guerinot ML** (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci* **14**: 280-285
- Jidenko M, Nielsen RC, Sorensen TL, Moller JV, le Maire M, Nissen P, Jaxel C** (2005) Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11687-11691
- Joyard J, Douce R** (1976) [Separation and role of diacylglycerols in the envelope of spinach chloroplasts (author's transl)]. *Biochim Biophys Acta* **424**: 125-131
- Joyard J, Teyssier E, Miege C, Berny-Seigneurin D, Marechal E, Block MA, Dorne AJ, Rolland N, Ajlani G, Douce R** (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol* **118**: 715-723
- Junge F, Schneider B, Reckel S, Schwarz D, Dotsch V, Bernhard F** (2008) Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1729-1755

K

- Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML** (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* **314**: 1295-1298
- Kim YY, Choi H, Segami S, Cho HT, Martinoia E, Maeshima M, Lee Y** (2009) AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. *Plant J* **58**: 737-753

- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL** (1998) Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol* **118**: 637-650
- Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T, Nakagawa T, Maeshima M** (2004) Zinc transporter of Arabidopsis thaliana AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol* **45**: 1749-1758
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from Arabidopsis thaliana is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37-44
- Kubala M** (2006) ATP-binding to P-type ATPases as revealed by biochemical, spectroscopic, and crystallographic experiments. *Proteins* **64**: 1-12
- Kuhlbrandt W** (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 282-295
- Kunji ER, Chan KW, Slotboom DJ, Floyd S, O'Connor R, Monne M** (2005) Eukaryotic membrane protein overproduction in Lactococcus lactis. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 546-551
- Kunji ER, Slotboom DJ, Poolman B** (2003) Lactococcus lactis as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1610**: 97-108

L

- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J* **24**: 4041-4051
- Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA** (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* **100**: 95-97
- Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermudez-Humaran LG, Nouaille S, Ribeiro LA, Leclercq S, Gabriel JE, Guimaraes VD, Oliveira MN, Charlier C, Gautier M, Langella P** (2005) Protein secretion in Lactococcus lactis : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact* **4**: 2

- Lee J, Pena MM, Nose Y, Thiele DJ** (2002) Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem* **277**: 4380-4387
- Lescure AM, Proudhon D, Pesey H, Ragland M, Theil EC, Briat JF** (1991) Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8222-8226
- Lewinson O, Lee AT, Rees DC** (2009) A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4677-4682
- Liang F, Cunningham KW, Harper JF, Sze H** (1997) ECA1 complements yeast mutants defective in Ca²⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca²⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8579-8584
- Ling HQ, Bauer P, Berczky Z, Keller B, Ganai M** (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13938-13943
- Liu J, Stemmler AL, Fatima J, Mitra B** (2005) Metal Binding Characteristics of the Amino-Terminal Domain of ZntA: Binding of Lead is Different Compared to Cadmium and Zinc. *Biochemistry* **44**: 5159-5167
- Lowe J, Vieyra A, Catty P, Guillain F, Mintz E, Cuillel M** (2004) A mutational study in the transmembrane domain of Ccc2p, the yeast Cu(I)-ATPase, shows different roles for each Cys-Pro-Cys cysteine. *J Biol Chem* **279**: 25986-25994
- Lubelski J, Mazurkiewicz P, van Merkerk R, Konings WN, Driessen AJ** (2004) ydaG and ydbA of *Lactococcus lactis* encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter. *J Biol Chem* **279**: 34449-34455
- Luo Y, Liu YB, Dong YX, Gao XQ, Zhang XS** (2009) Expression of a putative alfalfa helicase increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis* by enhancing the capacities for ROS scavenging and osmotic adjustment. *J Plant Physiol* **166**: 385-394

M

- Maathuis FJ** (2006) The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J Exp Bot* **57**: 1137-1147
- Magnani D, Barre O, Gerber SD, Solioz M** (2008) Characterization of the CopR regulon of *Lactococcus lactis* IL1403. *J Bacteriol* **190**: 536-545

- Mana-Capelli S, Mandal AK, Arguello JM** (2003) Archaeoglobus fulgidus CopB is a thermophilic Cu²⁺-ATPase: functional role of its histidine-rich-N-terminal metal binding domain. *J Biol Chem* **278**: 40534-40541
- Mandal AK, Cheung WD, Arguello JM** (2002) Characterization of a thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺-ATPase from the extremophile Archaeoglobus fulgidus. *J Biol Chem* **277**: 7201-7208
- Mandal AK, Yang Y, Kertesz TM, Arguello JM** (2004) Identification of the transmembrane metal binding site in Cu⁺-transporting PIB-type ATPases. *J Biol Chem* **279**: 54802-54807
- Maniatis T, Fritsh EF, Sambrook J** (1982) Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Marchand A, Winther AM, Holm PJ, Olesen C, Montigny C, Arnou B, Champeil P, Clausen JD, Vilsen B, Andersen JP, Nissen P, Jaxel C, Moller JV, le Maire M** (2008) Crystal structure of D351A and P312A mutant forms of the mammalian sarcoplasmic reticulum Ca(2+) -ATPase reveals key events in phosphorylation and Ca(2+) release. *J Biol Chem* **283**: 14867-14882
- Margolles A, Putman M, van Veen HW, Konings WN** (1999) The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of Lactococcus lactis mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids. *Biochemistry* **38**: 16298-16306
- Marschner H** (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, Ed 2nd. Academic Press LTD, London
- Mierau I, Kleerebezem M** (2005) 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 705-717
- Mills RF, Francini A, Ferreira da Rocha PS, Baccarini PJ, Aylett M, Krijger GC, Williams LE** (2005) The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Lett* **579**: 783-791
- Mills RF, Krijger GC, Baccarini PJ, Hall JL, Williams LE** (2003) Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J* **35**: 164-176
- Miras S, Salvi D, Ferro M, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N** (2002) Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J Biol Chem* **277**: 47770-47778
- Miras S, Salvi D, Piette L, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Reinbothe C, Joyard J, Reinbothe S, Rolland N** (2007) Toc159- and Toc75-independent import of a transit

- sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J Biol Chem* **282**: 29482-29492
- Monne M, Chan KW, Slotboom DJ, Kunji ER** (2005) Functional expression of eukaryotic membrane proteins in *Lactococcus lactis*. *Protein Sci* **14**: 3048-3056
- Moomaw AS, Maguire ME** (2008) The unique nature of mg²⁺ channels. *Physiology (Bethesda)* **23**: 275-285
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C** (1998) Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res* **37**: 371-391
- Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P** (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**: 894-904
- Morello E, Bermudez-Humaran LG, Llull D, Sole V, Miraglio N, Langella P, Poquet I** (2008) *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* **14**: 48-58
- Moreno I, Norambuena L, Maturana D, Toro M, Vergara C, Orellana A, Zurita-Silva A, Ordenes VR** (2008) AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca²⁺/heavy metal pump. *J Biol Chem* **283**: 9633-9641
- Mourrain P, Beclin C, Elmayer T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H** (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-542
- Muller P, Li XP, Niyogi KK** (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* **125**: 1558-1566

N

- Nagasaki-Takeuchi N, Miyano M, Maeshima M** (2008) A plasma membrane-associated protein of *Arabidopsis thaliana* AtPCaP1 binds copper ions and changes its higher order structure. *J Biochem* **144**: 487-497
- Nakayama M, Masuda T, Bando T, Yamagata H, Ohta H, Takamiya K** (1998) Cloning and expression of the soybean chlH gene encoding a subunit of Mg-chelatase and localization

of the Mg²⁺ concentration-dependent ChlH protein within the chloroplast. *Plant Cell Physiol* **39**: 275-284

Neuhaus HE, Wagner R (2000) Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 307-323

O

Odermatt A, Krapf R, Solioz M (1994) Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺, and Ag⁺ extrusion by CopB. *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 44-48

Odermatt A, Suter H, Krapf R, Solioz M (1993) Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **268**: 12775-12779

O'Halloran TV, Culotta VC (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* **275**: 25057-25060

Okkeri J, Bencomo E, Pietila M, Haltia T (2002) Introducing Wilson disease mutations into the zinc-transporting P-type ATPase of *Escherichia coli*. The mutation P634L in the 'hinge' motif (GDGXNDXP) perturbs the formation of the E2P state. *Eur J Biochem* **269**: 1579-1586

Oliveira AP, Nielsen J, Forster J (2005) Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol* **5**: 39

Outten CE, O'Halloran TV (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**: 2488-2492

P

Palmer CM, Guerinot ML (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* **5**: 333-340

Palmgren MG, Axelsen KB (1998) Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1365**: 37-45

Parameswaran A, Leitenmaier B, Yang M, Kroneck PM, Welte W, Lutz G, Papoyan A, Kochian LV, Kupper H (2007) A native Zn/Cd pumping P(1B) ATPase from natural overexpression in a hyperaccumulator plant. *Biochem Biophys Res Commun* **363**: 51-56

- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H** (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 256-263
- Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F** (2009) Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 347-357
- Pittman JK** (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol* **167**: 733-742
- Portis AR, Jr., Heldt HW** (1976) Light-dependent changes of the Mg²⁺ concentration in the stroma in relation to the Mg²⁺ dependency of CO₂ fixation in intact chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **449**: 434-436
- Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta VC, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV** (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**: 853-856
- A. Puig S, Andres-Colas N, Garcia-Molina A, Penarrubia L** (2007) Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* **30**: 271-290
- B. Puig S, Mira H, Dorcey E, Sancenon V, Andres-Colas N, Garcia-Molina A, Burkhead JL, Gogolin KA, Abdel-Ghany SE, Thiele DJ, Ecker JR, Pilon M, Penarrubia L** (2007) Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem Biophys Res Commun* **354**: 385-390
- Puig S, Penarrubia L** (2009) Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 299-306
- Putman M, van Veen HW, Poolman B, Konings WN** (1999) Restrictive use of detergents in the functional reconstitution of the secondary multidrug transporter LmrP. *Biochemistry* **38**: 1002-1008

R

- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F** (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant J* **57**: 400-412

- Reuter G, Janvilisri T, Venter H, Shahi S, Balakrishnan L, van Veen HW** (2003) The ATP binding cassette multidrug transporter LmrA and lipid transporter MsbA have overlapping substrate specificities. *J Biol Chem* **278**: 35193-35198
- Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker AB** (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* **283**: 996-998
- Roh MH, Shingles R, Cleveland MJ, McCarty RE** (1998) Direct measurement of calcium transport across chloroplast inner-envelope vesicles. *Plant Physiol* **118**: 1447-1454
- Rutherford JC, Cavet JS, Robinson NJ** (1999) Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *J Biol Chem* **274**: 25827-25832

S

- Sagardoy R, Morales F, Lopez-Millan AF, Abadia A, Abadia J** (2009) Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biol (Stuttg)* **11**: 339-350
- Saleki R, Young PG, Lefebvre DD** (1993) Mutants of Arabidopsis thaliana Capable of Germination under Saline Conditions. *Plant Physiol* **101**: 839-845
- Sancenon V, Puig S, Mateu-Andres I, Dorcey E, Thiele DJ, Penarrubia L** (2004) The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem* **279**: 15348-15355
- Sancenon V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Penarrubia L** (2003) Identification of a copper transporter family in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **51**: 577-587
- Schiavon M, Zhang LH, Abdel-Ghany SE, Pilon M, Malagoli M, Pilon-Smits EA** (2007) Variation in copper tolerance in Arabidopsis thaliana accessions Columbia, Landsberg erecta and Wassilewskija. *Physiol Plant* **129**: 342-350
- Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD** (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* **6**: 183-195
- Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, Mazard C, Kraut A, Finazzi G, Grunwald D, Rappaport F, Vavasseur A, Joyard J, Richaud P, Rolland N** (2006) HMA1, a new

Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J Biol Chem* **281**: 2882-2892

Shaul O (2002) Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* **15**: 309-323

Shikanai T, Muller-Moule P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M (2003) PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* **15**: 1333-1346

Solioz M, Odermatt A (1995) Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **270**: 9217-9221

T

Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S (2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nat Biotechnol* **19**: 466-469

Takahashi M, Sasaki Y, Ida S, Morikawa H (2001) Nitrite reductase gene enrichment improves assimilation of NO(2) in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 731-741

Talke IN, Hanikenne M, Kramer U (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator Arabidopsis halleri. *Plant Physiol* **142**: 148-167

Teng YS, Su YS, Chen LJ, Lee YJ, Hwang I, Li HM (2006) Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Cell* **18**: 2247-2257

Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **34**: 685-695

Tong L, Nakashima S, Shibasaka M, Katsuhara M, Kasamo K (2002) A novel histidine-rich CPx-ATPase from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis* related to multiple-heavy-metal cotolerance. *J Bacteriol* **184**: 5027-5035

Truernit E (2001) Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Curr Biol* **11**: R169-171

Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H (1999) A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* **11**: 1195-1206

V

van de Mortel JE, Almar Villanueva L, Schat H, Kwekkeboom J, Coughlan S, Moerland PD, Ver Loren van Themaat E, Koornneef M, Aarts MG (2006) Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of Arabidopsis thaliana and the related metal hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. *Plant Physiol* **142**: 1127-1147

van den Berg van Saparoea HB, Lubelski J, van Merkerk R, Mazurkiewicz PS, Driessen AJ (2005) Proton motive force-dependent Hoechst 33342 transport by the ABC transporter LmrA of Lactococcus lactis. *Biochemistry* **44**: 16931-16938

van Veen HW, Putman M, Margolles A, K. S, Konings WN (1999) Structure-function analysis of multidrug transporters in Lactococcus lactis. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 201-206

Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* **576**: 306-312

Verret F, Gravot A, Auroy P, Preveral S, Forestier C, Vavasseur A, Richaud P (2005) Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch. *FEBS Lett* **579**: 1515-1522

W

Ward JM, Hirschi KD, Sze H (2003) Plants pass the salt. *Trends Plant Sci* **8**: 200-201

Waters BM, Grusak MA (2008) Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in Arabidopsis thaliana ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line ysl1ysl3. *New Phytol* **177**: 389-405

Weber AP, Schwacke R, Flugge UI (2005) Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 133-164

- Weber K, Osborn M** (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**: 4406-4412
- Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson MJ, Kuipers OP, van Sinderen D, Kok J** (2007) Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* **189**: 3256-3270
- Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, Leister D** (2003) Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**: 31286-31289
- Weinl S, Held K, Schlucking K, Steinhorst L, Kuhlert S, Hippler M, Kudla J** (2008) A plastid protein crucial for Ca²⁺-regulated stomatal responses. *New Phytol* **179**: 675-686
- Wells JM, Mercenier A** (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**: 349-362
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C** (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J Biol Chem* **278**: 47644-47653
- Woeste KE, Kieber JJ** (2000) A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* **12**: 443-455
- Wong CK, Cobbett CS** (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **181**: 71-78
- Wood BJB, Warner PJ** (2003) Genetics of lactic acid bacteria. Kluwer Academics/Plenum, New York
- Wu CC, Gardarin A, Martel A, Mintz E, Guillain F, Catty P** (2006) The cadmium transport sites of CadA, the Cd²⁺-ATPase from *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem* **281**: 29533-29541

Y

- Yamaguchi Y, Heiny ME, Suzuki M, Gitlin JD** (1996) Biochemical characterization and intracellular localization of the Menkes disease protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 14030-14035

Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009) SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 347-361

Yang Y, Mandal AK, Bredeston LM, Gonzalez-Flecha FL, Arguello JM (2007) Activation of *Archaeoglobus fulgidus* Cu(+)-ATPase CopA by cysteine. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 495-501

Yao J, Feng Y, Zhao Y, Huang J, Fu H (2007) Vesicle aggregation in aqueous mixtures of negatively charged electrolyte and conventional cationic surfactant. *J Colloid Interface Sci* **314**: 523-530

Ye H, Pilon M, Pilon-Smits EA (2006) CpNifS-dependent iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. *New Phytol* **171**: 285-292

Z

Zhang H, Xia Y, Wang G, Shen Z (2008) Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper-zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta* **227**: 465-475

Zhou XX, Li WF, Ma GX, Pan YJ (2006) The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnol Adv* **24**: 285-295

Annexes

MEPATLTRSSSLTRFPYRRGLSTLRLARVNSFSILPPKTLRQKPLRISASLNLP**PPRSIR**
 LRAVEDHHHDHHHDDEQDHHNHHHHHHQHGCCSVELKAESKPQKMLFGFAKAIGWVRLAN
 YLREHLHLCCSAAAMFLAAAVCPYLAPPEPYIKSLQNAFMIVGFPLVGVSASLDALMDIAG
 GKVNIHVLMAAFAFASVFMGNALEGGLLAMFNLAHIAEEFFTSRSMVDVKELKESNPDS
 ALLIEVHNGNVPNISDLSYKSVPVHSVEVGSYVLVGTGEIVPVDCEVYQGSATITIEHL**T**
GEVKPLEAKAGDRVPGGARNLDGRMIVKATKAWNDSTLNKIVQLTEEAHSNKPKLQRWLD
 EFGENYSKVVVLSLAI AFLGPFLFKWPFLSTAACRGSVYRALGLMVAA**SPC**ALAVAPLA
 YATAISSCARKGILLKGAQVLDALASCHTIAF**DKTGT**LTGTGGLTCKAIEPIYGHQGGTNS
 SVITCCIPNCEKEALAVAAAMEKGTTHPIGRAVVDHVSVDLPSIFVESFEYFPGRGLTA
 TVNGVKTVAEESRLRKASLGSIEFITSLFKSEDESKQIKDAVNASSYGKDFVHAALSVDQ
 KVTLIHLEDQPRPGVSGVIAELKSWARLRVMMLTGDHDSSAWRVANAVGITEVYCNLKPE
 DKLNVKNIAREAGGLI**MVGE**GINDAPALAAATVGIVLAQRASATAIAVADILLRDNI
 TGVVFCVAKSRQTTSLVKQVALALTSIFLAALPSVLGFVPLWLTVLL**HEGG**TLLVCLNS
 VRGLNDPSWSWKQDIVHLINKLRSQEPTSSSSNSLSSAH

Annexe 1 : Séquence peptidique déduite de l'ADNc codant la protéine HMA1.

La séquence de transit chloroplastique prédite est représentée en gras, et les domaines transmembranaires prédits sont soulignés. Les résidus conservés entre les ATPases de type P sont en gras et surlignés en gris foncé (site de phosphorylation : DKTGT; domaine de liaison à l'ATP : MVGE GINDAPAL). Le domaine de liaison aux métaux (N-MBD) est surligné en gris clair.

```

MESTLSAFSTVKATAMARSSGGPSLPLLTISKALNRHFTGARHLHPLLLARCSPSVRRLG
GFHGSRFSSNSALRSLGAAVLPVIRHRLECLSSSSPSFRSISSSGGGSGFGGYNGGSGGG
GGGSESGDSKSKLGANASDGVSVPSDDIIILDVGGMTCGGCSSASVKKILESQPQVASAS
VNLTTETAIVWPVPEAKSVPDWQKSLGETLANHLTNCGFQSTPRDLVTENFFKVFETKTK
DKQARLKESGRELAVSWALCAVCLVGHLLTHFLGVNAPWIHAIHSTGFHVSLCLITLLGPG
RKLVLVDGIKSLKGS PNMNTLVGLGALSSFSVSSLAAMI PKLGWKTFFEEPVMLIAFVLL
GRNLEQRAKIKATS DMTGLLSVLPSKARLLLDGDLQNSTVEVPCNSLSVGDLLVILPGDR
VPADGVVKSGRSTIDESSFTTGEPLPVTKESGSQ*VAAGSINLNGTLTVEVHRSGETAVGD
IIRLVEEAQSREAPVQQLVDKVAGRFTYGVMALSAATFTFWNLFGAHVLPSALHNGSPMS
LALQLSCSVLVVACPCALGLATPTAMLVGTSLGARRGLLLRGGDILEKFSLVDTVVFDKT
GTLTKGHPVVTEV IIPENPRHNLNDTWSEVEVLMLAAAVESNTTHPVGKAIVKAARARNC
QTMKAEDGTFTEEPGSGAVAI VNNKRVTVGTLEWVKRHGATGNSLLALEEHEINNQSVVY
IGVDNTLAAVIRFEDKVREDAAQVVENLTRQGI DVYMLSGDKRNAANYVASVVGINHERV
IAGVKPAEKKNF INELQKNKKIVAMVGDGINDAAALASSNMGVAMGGGAGAASEVSPVVL
MGNRLTQLLDAMELSRQTMKTVKQNLWWAFGYNIVGIPIAAGVLLPLTGTMLTPSMAGAL
MGVSSLGVMTNSLLLR YRFFSNRNDKNVKPEPKEGTKQPHENTRWKQSS

```

Annexe 2 : Séquence peptidique déduite de l'ADNc codant la protéine PAAl.

La séquence de transit chloroplastique prédite est représentée en gras, et les domaines transmembranaires prédits sont soulignés. Les résidus conservés entre les ATPases de type P sont en gras et surlignés en gris foncé (site de phosphorylation : DKTGT; domaine de liaison à l'ATP : KIVAMVGDGINDAAAL). Le domaine de liaison aux métaux (N-MBD) est surligné en gris clair

L'acide aminé muté dans le mutant *paal* Q453→ STOP est indiqué par l'astérisque.

	Vecteur vide	CeQORH	HMA4	HMA1-AKT	HMA1	HMA1 expression 1h30		N° d'accension	Masse (Da)
Topoisomerase IV subunit A - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)	2	2	4	3	3	5		A2RLE3_LACLM	92850
DNA translocase ftsK - Lactococcus lactis subsp. lactis (Streptococcus lactis)	2	2	4	4	5	0		FTSK_LACLA	82910
Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain - Lactococcus lactis subsp. lactis (Streptococcus lactis)	2	2	2	2	2	6		A2RN74_LACLM	87142
DNA mismatch repair protein mutS - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)	2	1	1	2	0	1		A2RP10_LACLM	94241
Similar to cation -transporting ATPase - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)	2	5	7	12	8	10	similaire à une ATPase à Calcium	A2RK70_LACLM	95895
Putative uncharacterized protein - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)	1	1	2	1	1	0		A2RL12_LACLM	85768
Translation initiation factor IF-2	0	4	1	1	2	0		A2RM37_LACLM	104518
Formate acetyltransferase - Lactococcus lactis subsp. lactis (Streptococcus lactis)	0	5	1	1	1	1		PFL_LACLA	89065
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)	0	1	0	0	0	0		A2RIW9_LACLM	90307
DNA gyrase subunit A - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)	0	1	1	1	2	4		A2RL64_LACLM	93435
Cation-transporting ATPase, E1-E2 family - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)	0	1	6	2	4	8	ATPase transportant des cations	A2RIZ7_LACLM	101224
DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - Lactococcus lactis subsp. lactis (Streptococcus lactis)	0	0	1	1	0	0		RPOC_LACLA	134646
Cation-transporting P-ATPase - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)	0	0	0	1	0	0	ATPase à Magnésium	A2RKK2_LACLM	100484

Annexe 3 : Protéines identifiées dans le SDS-PAGE contenant les extraits de protéines membranaires (15 µg de protéines) issues de bactéries transformées par un vecteur non recombinant (vecteur vide) ou les vecteurs codant pour CeQORH, HMA4, HMA1 AKT et HMA1 (exprimée pendant 4 h ou 1h30). Les chiffres indiquent le nombre de peptides trouvés pour la protéine identifiée dans chacun des fragments de gel.

Publications

PUBLICATIONS

Frelet-Barrand* A., Boutigny* S., Moyet L., Deniaud A., Seigneurin-Berny D., Salvi D., Bernaudat F, Richaud P., Pebay-Peyroula E., Joyard J. and Rolland N. (2009). *Lactococcus lactis*, an alternative system for functional expression of peripheral and intrinsic *Arabidopsis* membrane proteins. *Soumis*. *contribution équivalente au travail.

Bernaudat* F., Frelet-Barrand* A., Gousset A., Démentin S., Rioux J.B., Seigneurin-Berny D., Salvi D., Boutigny S., Richaud P., Desnos T., Sabaty M., Darrouzet E., Vernet T., Joyard J. and Rolland N. Screening of alternative expression systems for the heterologous expression of membrane proteins. *En preparation*. *contribution équivalente au travail.

CHAPITRES D'OUVRAGE

Frelet-Barrand A., Boutigny S., Kunji E. and Rolland N. (2009) Membrane protein expression in *Lactococcus lactis*. *Methods Mol. Biol. Sous presse*

COMMUNICATIONS ORALES

Séminaire jeune chercheur, Grenoble, janvier 2009

Etude de HMA1, une ATPase de type P_{1B} associée à l'enveloppe des plastes

Boutigny S., Seigneurin-Berny D., Rolland N., Frelet-Barrand A., Salvi D., Joyard J.

CNRS/GDR2478, les Houches, février 2009

Etude de HMA1, une ATPase de type P_{1B} associée à l'enveloppe des plastes

Boutigny S., Seigneurin-Berny D., Rolland N., Frelet-Barrand A., Salvi D., Joyard J.

Séminaire de département, Cadarache, mars 2009

Lactococcus lactis, un système adapté à l'expression des protéines membranaires

Boutigny S.*, Frelet-Barrand A.*, Moyet L., Deniaud. A., Seigneurin-Berny D., Salvi D., Bernaudat F., Richaud P., Pebay-Peyroula E., Joyard J., Rolland N.. *Conférenciers invités

POSTERS

Colloque annuel de l'Institut des Métaux en Biologie de Grenoble (IMBG), Autrans, décembre 2007.

Characterization of AtHMA1, a P_{1B}-type ATPase, involved in Cu uptake into the chloroplast. Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, Mazard C, Kraut A, Finazzi G, Boutigny S., Frelet A, Rappaport F, Vavasseur A, Joyard J, Richaud P et Rolland N.

A few observations about the role of copper ATPases HMA1 and PAA1 in the control of chloroplastic copper's homeostasis

The chloroplast is an organelle specific of the plant cell. It is surrounded by a double membrane or envelope which carries numerous transport systems for ions and metabolites, essential for the function of the chloroplast and the plant cell. At this point, only a few transporters associated with chloroplastic envelope had been identified: An iron transporter, a magnesium transporter and two copper P_{1B} ATPases: HMA1 and PAA1. PAA1 is known to be the main pathway of copper import in the chloroplast, metal mainly used for photosynthesis. HMA1 is thought to be an additional pathway for copper import, essential to cope with an oxidative stress which appears when the plant is grown under high light condition. In order to better understand the respective roles of these two ATPases in chloroplastic copper's homeostasis, two complementary approaches had been developed:

- An *in planta* approach had been initiated to obtain some new lines affected in the expression of one (*paa1* mutant overexpressing HMA1) or both ATPases (*hma1/paa1* double knock out), then to identify conditions (light stress, saline stress, metal excess) revealing the essential role of these ATPases or inducing a different transcriptional response for genes encoding for these ATPases or other actors of copper's homeostasis... Results obtained show that the function of HMA1, known to be essential during a light stress, is also required when plants have to cope with a salt stress. These results are new evidences that HMA1 has a role in copper's delivery to the chloroplastic copper/zinc superoxyde dismutase. Moreover, we have shown that in photoautotrophic culture condition, copper can partially restore the photosensitivity of a *hma1* mutant thus validating that HMA1 is linked with copper homeostasis. We also have demonstrated that HMA1 and PAA1 function are not redundant. The copper imported by these two ATPases is very likely delivered to target proteins by distinct pathways. At last, we have shown that a third copper import pathway in the chloroplast exists, pathway still not characterized.

- An *in vitro* approach meant to produce HMA1 and PAA1 ATPases in the *Lactococcus lactis* heterologous expression system had been developed to determine their ionic specificities and biochemical characteristics. The prokaryotic expression system had been developed in the laboratory is perfectly suited for membrane protein production including HMA1 and PAA1. Yields obtained are appropriate for further biochemical analyses. We have determined the conditions of solubilisation and purification of these two proteins. So far, we had not been able to measure ATPase activity associated with these proteins but our data indicates that both of the proteins can bind one of their substrate: ATP. We also demonstrated that PAA1 can bind copper under its 1+ and 2+ form.

Finally, these data suggests that the control of chloroplastic copper homeostasis requires several independent transport systems and a tight regulation of these copper import pathways in order to fill up the needs linked to photosynthesis and resistance mechanism to oxidative stress.

Keywords: chloroplast, envelope, membrane protein, P-type ATPase, copper, *Arabidopsis thaliana*, *Lactococcus lactis*.

Quelques observations sur le rôle des ATPases à cuivre HMA1 et PAA1 dans le contrôle de l'homéostasie du cuivre chloroplastique

Le chloroplaste est un organite spécifique de la cellule végétale. Il est délimité par une double membrane ou enveloppe qui renferme de nombreux systèmes de transports d'ions et de métabolites essentiels au fonctionnement du chloroplaste et de la cellule végétale. A ce jour, seuls quelques transporteurs de métaux associés à l'enveloppe des plastes ont été identifiés : un transporteur de fer, un transporteur de magnésium ainsi que deux ATPases à cuivre de type P_{1B} : HMA1 et PAA1. PAA1 représenterait la voie principale d'import du cuivre dans le chloroplaste, notamment pour alimenter la photosynthèse. HMA1 constituerait une voie additionnelle d'import du cuivre, voie essentielle pour répondre à un stress oxydatif qui apparaît en particulier lorsque la plante est cultivée en lumière forte. Afin de mieux comprendre les rôles respectifs de ces deux ATPases dans la régulation de l'homéostasie du cuivre chloroplastique, deux approches complémentaires ont été développées :

- une approche *in planta* visant à produire de nouvelles lignées affectées dans l'expression de l'une (mutant *paa1* surexprimant HMA1) ou de ces deux ATPases (double mutant *hmal/paa1*), puis à identifier des conditions (stress lumineux, stress salin, excès de métaux) révélant le rôle essentiel de ces ATPases ou induisant une réponse transcriptionnelle différente des gènes codant ces ATPases ou d'autres acteurs liés à l'homéostasie du cuivre... Les résultats obtenus montrent que la fonction de HMA1, connue pour être essentielle lors d'un stress lumineux, est aussi requise lorsque la plante subit un stress salin. Ces résultats confortent le rôle de HMA1 dans la délivrance du cuivre à la superoxyde dismutase (cuivre/zinc) du chloroplaste. D'autre part, nous avons montré qu'en condition de culture photoautotrophe, le cuivre permet de supprimer partiellement la photosensibilité du mutant *hmal*, validant ainsi l'implication de HMA1 dans l'homéostasie du cuivre. Nous avons aussi démontré que les fonctions de HMA1 et PAA1 ne sont pas redondantes. Le cuivre importé par ces deux ATPases est probablement délivré à des protéines cibles par des voies différentes. Enfin, nous avons montré qu'il existe une troisième voie d'import de cuivre dans le chloroplaste, voie encore non caractérisée.

- une approche *in vitro* visant à produire ces deux ATPases HMA1 et PAA1 dans le système hétérologue *Lactococcus lactis* afin de déterminer leurs spécificités ioniques et leurs caractéristiques biochimiques. Le système d'expression procaryote *L. lactis* a été mis en place au laboratoire et s'avère parfaitement adapté à la production de protéines membranaires de plantes. Ce système a permis de produire plusieurs protéines membranaires d'*Arabidopsis*, dont HMA1 et PAA1, en quantités compatibles avec des analyses biochimiques. Nous avons déterminé les conditions de solubilisation et de purification de ces deux protéines. Nous n'avons pas pu mesurer d'activité ATPase associée à ces protéines. En revanche, nos données indiquent que ces deux protéines recombinantes peuvent lier l'un de leur substrat ; l'ATP. Nous avons aussi pu démontrer que PAA1 peut lier du cuivre sous forme 1+ et sous forme 2+.

Au bilan, ces données suggèrent que le contrôle de l'homéostasie du cuivre chloroplastique requiert plusieurs systèmes de transport indépendants et une régulation fine de ces voies d'import de cuivre afin d'alimenter les besoins liés à la photosynthèse et les besoins liés aux mécanismes de résistance aux stress oxydatifs.

Mots-Clés : chloroplaste, enveloppe, protéine membranaire, ATPase de type P, cuivre, *Arabidopsis thaliana*, *Lactococcus lactis*

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale
iRTSV-LPCV / CEA-Grenoble
17, rue des martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9