



Année Universitaire : 2012-2013

**Master Sciences et Techniques : CMBA  
Chimie des Molécules Bio Actives**



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Expression hétérologue de la protéine CopG de  
*Cupriavidus metallidurans* en vue de son étude  
fonctionnelle dans la résistance au cuivre**

**Présenté par:**

**Drissi Kaïtouni Leïla Batsoule**

**Encadré par:**

- Pr. F. Ouazzani Chahdi et Pr. Y. Kandri Rodi (Faculté des Sciences et Techniques-Fès)
- Dr. F. Van Vliet et Dr. C. Vander Wauven (Institut de Recherches Microbiologiques Jean-Marie Wiame-Bruxelles)

**Soutenu Le 17/06/2013 devant le jury composé de:**

- **Mr. F. OUZZANI CHAHDI**
- **Mr. Y. KANDRI RODI**
- **Mr. ELM. ELHADRAMI**
- **Mr. Kh. MISBAHI**



**Stage effectué à : Institut de Recherches Microbiologiques Jean-Marie Wiame (IRMW).**

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



**Nom et prénom : Drissi Kaïtouni Leïla Batsoule**

**Année Universitaire : 2012/2013**

**Titre : Expression hétérologue de la protéine CopG de *Cupriavidus metallidurans* en vue de son étude fonctionnelle dans la résistance au cuivre**

### Résumé

*Cupriavidus metallidurans* CH34, est une bactérie Gram négative considérée comme organisme modèle pour l'étude de la résistance aux métaux lourds.

Cette recherche s'inscrit dans la l'étude de sa résistance au cuivre qui est codé sur les gènes *cop* du plasmide pMOL30. Dans ce système *cop*, plusieurs protéines ont un rôle inconnu ou non vérifié expérimentalement. Ce travail se focalise sur CopG.

Les analyses bioinformatique permettent de repérer un motif CXXC et un peptide signal à l'extrémité N-terminal de CopG caractéristique des protéines exportés vers l'espace périplasmique. Sur base de d'homologie de séquence, CopG devrait faire partie de la famille des thiorédoxines.

Le but de mon mémoire étant l'expression hétérologue de la protéine CopG, différents systèmes et différents souche d'expression et de production on été testé : essai de production de la protéine native avec ou sans étiquette 6His en C-terminal, en fusion avec un tag Halo ou en fusion avec des protéines (Tm1752 et BDI\_3087).

Les résultats de ces essais ont révélés que la protéine CopG est instable quand elle est produite dans le cytoplasme d'*E. coli*. De ce résultat de nouvelles approche sont a envisagées, comme la production de la protéine CopG dans le périplasma, mais aussi envisager la production de la protéine CopG dans une nouvelle souche.

**Mots clés: *Cupriavidus metallidurans*, métaux lourds, CopG, thiorédoxine, expression hétérologue, fusion, essai de production.**



---

## Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps, toute l'équipe de l'institut de Recherches Microbiologiques Jean-Marie Wiame, pour leur soutien et conseils.

**J'exprime ma reconnaissance à mes encadrant au sein de** l'institut de Recherches Microbiologiques Jean-Marie Wiame, **Corinne Vander Wauven et** Françoise Van Vliet. Merci de m'avoir acceptée dans votre équipe, de m'avoir donné cette opportunité de faire un stage dans un domaine que j'affectionne particulièrement, mais aussi de faire parti d'une équipe, dans laquelle il m'a était donnée de rencontrer des personnes possédant de grandes qualités aussi bien scientifiques qu'humaines. Vous m'avez accompagnée lors de ces 6 mois m'accordant, je l'espère, votre confiance et votre amitié. Ma reconnaissance va aussi à Monsieur Ouazzani Chahdi et Monsieur Kandri Rodi, mes encadrants au sein de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, pour avoir encadré ce travail avec patience et rigueur.

Je tiens à remercier les membres de **l'institut** qui ont participé de différentes façons à la réussite de mon stage et plus particulièrement merci à

- Bertrand Cornu, ses logiciels et astuces informatiques m'ont été d'un grand secours.
- Cédric Bauvois, pour m'avoir initié au monde de la cristallographie.
- Catherine Tricot pour son aide et enthousiasme lors des purifications sur l'AKTA.
- Jonathan Somme, pour m'avoir initié à technique de l'IMAC avec assiduité.
- Ma famille, pour son soutien permanent pendant ces mois de travail.

Tous ceux qui m'ont aidée ou soutenue de quelque manière que ce soit.

## Merci à tous !!!



## Liste des abréviations

### Unités de mesures :

Kb	: kilobase = $10^3$ paires de base d'ADN = $10^3$ Dalton (u.m.a)
kDa	: kiloDalton = $10^3$ Dalton
mM	: $10^{-3}$ molaire = $10^{-3}$ mole/litre
ppm	: partie par million
UA	: unités d'absorbance
DO <sub>x</sub>	: densité optique à la longueur d'onde x, aussi sous l'abréviation A <sub>x</sub>
rpm	: rotation par minute
UFC	: unité formant colonie
ml	: millilitre = $10^{-3}$ litre
μl	: microlitre = $10^{-6}$ litre
mV	: millivolt = $10^{-3}$ volt
nm	: nanomètre = $10^{-9}$ mètre
°C	: degré Celsius
pb	: paire de base

### Abréviations :

ADN	: acide désoxyribonucléique
<i>cop</i>	: gènes de résistance au cuivre "copper"
<i>cnr</i>	: gènes de résistance au cobalt et au nickel
<i>czc</i>	: gènes de résistance au cadmium, au zinc et au cobalt
TEV	: Tobacco Etch Virus
PVDF	: fluorure de polyvinylidène
dNTP	: désoxy-ribonucléotide triphosphate
PCR	: Polymerisation Chain Reaction
IMAC	: Immobilized Metal Affinity Chromatography
UV	: Ultra-Violet
HEPES	: Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique
MES	: Acide 4-morpholineéthanesulfonique
TBS	: Tris-Buffered-Saline
SDS-PAGE	: Sodium dodecylsulfate Polyacrilamide gel electrophoresis
Tris	: 2-amino-2-(hydroxyméthyle)-1,3-propanediol
orf	: « open reading frame » = phase de lecture ouverte
Bicine	: N,N-bis(2-hydroxyéthyl)glycine
PEG	: <u>Polyéthylène glycol</u>
DTT	: Dithiothreitol



---

CMC : Carboxyméthyl cellulase  
DNS : acide 3,5 dinitrosalicylique  
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

**Milieus de culture :**

LB : Luria-Bertani  
Amp : ampicilline  
Km : kanamycine  
IPTG : iso-propyl-thio-galactoside

## Table des matières



---

Remerciements	1
Table des abréviations	2
Table des matières	4
Avant-propos	6
Chapitre I : Introduction	7
1.	C
<i>upriavidus metallidurans</i>	7
2.	M
étaux lourds	8
2.1.	G
énéralités	8
2.2.	H
oméostasie des métaux lourds	9
3.	L
e cuivre	13
3.1.	C
aractéristiques	13
3.2.	L
'importance du cuivre pour les êtres vivants	13
3.3.	L
'homéostasie du cuivre	13
4.	L
a protéine CopG	15
Chapitre II : But du travail	19
Chapitre III : Matériel et méthodes	20
1.	M
atériel biologique et milieux de culture	20
1.1.	M
ilieux de cultures	20
1.2.	S
olutions tampon	20
1.3.	S
ouches bactériennes	21
1.4.	V
ecteurs plasmidiques	22



---

2.		M
	éthodes	26
2.1.		T
	ransformation des souches d' <i>E.coli</i>	26
2.2.		C
	onstruction des fusions de gène <i>copG</i> avec Tm1752 ou BDI_3087 par PCR de chevauchement ("O.PCR")	27
2.3.		P
	roduction de la protéine CopG dans diverses souches d' <i>E. coli</i>	30
3.		A
	nalyse des protéines	30
3.1.		E
	lectrophorèse sur gel de polyacrylamide	30
3.2.		A
	nalyse des fragments d'ADN générés par PCR	31
3.3.		A
	nalyse des protéines par immunoprécipitation (Western blot)	32
3.4.		M
	esure de la concentration en protéines	33
3.5.		C
	hromatographie d'affinité	34
3.6.		C
	oncentration des protéines purifiées par ultrafiltration	36
3.7.		D
	osage colorimétrique de l'activité endoglucanase	36
3.8.		C
	ristallogenèse et cristallographie	38
Chapitre IV : Résultats		40
1.		E
	ssais de production de la protéine CopG native	40
1.1.		V
	ecteur d'expression	40
1.2.		S
	tratégie	40
1.3.		A
	nalyse de la production	40



---

2.		P
	roduction de la protéine CopG en fusion	44
2.1.		E
	n fusion avec un Tag Halo en N-terminal	44
2.2.		E
	n fusion avec un Tag Halo en C-terminal	46
2.3.		E
	n fusion avec la protéine Tm1752	46
2.4.		E
	n fusion avec la protéine BDI_3087	52
3.		E
	ssais de Cristallographie	54
3.1.		C
	ristallogénèse de la protéine Tm1752	54
3.2.		C
	ristallogénèse de la protéine BDI_3087	57
Chapitre V : Discussion, conclusions et perspectives		58
1.		D
	iscussion et conclusions	58
1.1.		P
	roduction de la protéine CopG	58
1.2.		C
	ristallogénèse	58
2.		P
	erspectives	59
2.1.		P
	roduction de la protéine CopG	59
2.2.		C
	ristallogénèse	59
Références bibliographiques		60



## Avant-propos

Le premier chapitre de ce rapport, intitulé Introduction, présente le contexte de l'étude de la protéine CopG de la résistance au cuivre chez *Cupriavidus metallidurans*. Je présente successivement, *C. metallidurans* CH34, les métaux lourds, le cuivre et l'homéostasie du cuivre chez les bactéries. Une dernière partie décrit plus précisément mon sujet de thèse, en insistant sur la protéine ayant fait l'objet de mon travail : la protéine CopG chez *C. metallidurans* CH34.

Les explications du troisième chapitre « matériels et méthodes » se veulent assez détaillées afin de pouvoir d'une part étudier et reproduire les expériences effectuées et d'autre part comprendre au mieux les différentes techniques de production et de purification utilisées, et leur intérêt.

Les résultats sont présentés dans le quatrième chapitre. L'accent est porté sur les différentes stratégies utilisées pour la production de la protéine CopG.

Enfin, les conclusions et perspectives de l'ensemble de ce travail trouvent leur place dans le dernier chapitre.



# Chapitre I : Introduction

## 1. Cupriavidus metallidurans :

*Cupriavidus metallidurans* CH34, (anciennement appelée *Alcaligenes eutrophus*, puis *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans*, et *Waustersia metallidurans*) est une bactérie principalement présente dans les environnements industriels pollués par les métaux. Elle a été isolée en 1976 par Christian Houba dans un bassin de décantation de l'usine « Métallurgie de Prayon », près de Liège, en Belgique (Mergey *et al.*, 1978).

*C. metallidurans* est l'archétype des bactéries résistantes aux métaux lourds. De fait, cette bactérie peut croître en présence de concentrations très élevées en divers métaux lourds. C'est une bactérie à Gram négatif appartenant au phylum des  $\beta$ -Protéobactéries. Elle est considérée comme représentant les *Cupriavidi* métallo-résistants, adaptés aux biotopes industriels.

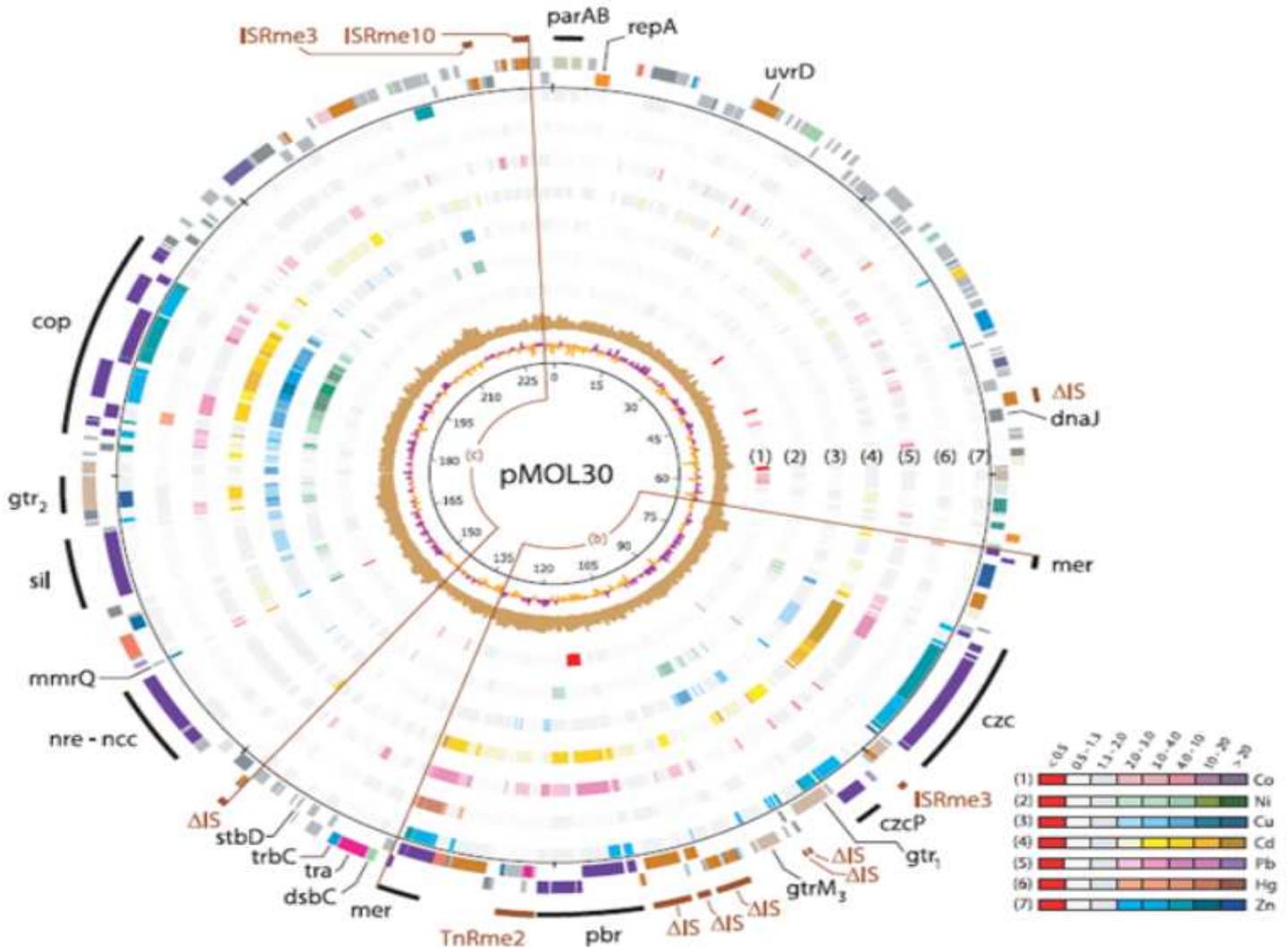
*C. metallidurans* est résistante aux ions métalliques suivants: Zn(II), Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Hg(II), et Pb(II). Elle est capable de se développer aussi bien en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies en présence de H<sub>2</sub> (utilisé comme source d'énergie) et CO<sub>2</sub> (utilisé comme source de carbone).

Elle a une forme en bâtonnet, de 0,4  $\mu$ m de diamètre et 1 à 2  $\mu$ m de longueur. Sur milieu solide, ses colonies ont une forme circulaire opaque et rosée. Sa température optimale de croissance est de 30°C.

Le génome de *C. metallidurans* CH34, entièrement séquencé et analysé en 2006 par le « Joint Genome Institute » en Californie (Janssen *et al.*, 2010), se compose de deux chromosomes (3,9 et 2,6 Mb) et de deux plasmides, pMOL28 (177kb) et pMOL30 (233kb). La résistance aux ions Zn(II), Cd(II), Co(II), Cu(II) est liée au plasmide pMOL30, tandis que les gènes de résistance aux ions Co(II), Ni(II) et chromate sont portés par le plasmide pMOL28. (Monchy, 2007).

Le plasmide pMOL30 (figure 1.1) porte 247 orf identifiées (Monchy *et al.*, 2007) dont des gènes de répllication, de maintenance et de transfert de plasmide et six groupes de gènes impliqués dans la résistance aux métaux lourds : *czc* (résistance au cadmium-zinc-cobalt), *pbr* (résistance au plomb),

*mer* (résistance au mercure), *nre-ncc* (résistance au nickel-cobalt-cadmium), *sil* (résistance à l'argent) et *cop* (résistance au cuivre). Deux ensembles de gènes *gtr*ABM, codant pour des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des membranes, sont situés entre les gènes de résistance *sil* et *cop* d'une part et à côté du gène *czcP* d'autre part.



**Figure 1.1 : Carte du plasmide pMOL30 chez *Cupriavidus metallidurans*.**

Le niveau d'induction de l'expression des gènes par les différents métaux lourds est représenté sur chaque cercle par l'intensité de la couleur (Monchy et al., 2007).

## 2. Métaux lourds :



## **2.1. Généralités**

Les métaux lourds sont des éléments chimiques ayant une masse atomique élevée et un poids spécifique supérieur à 5 (densité supérieure à 5000 kg/m<sup>3</sup>).

Les ions métalliques sont des éléments essentiels à la vie en participant à de nombreuses réactions métaboliques dans toutes les cellules vivantes, chez les organismes procaryotes ou eucaryotes (William and Frausto da Silva, 1996). Cependant des niveaux excessifs de ces métaux sont dommageables pour l'organisme.

Il existe différentes catégories de métaux. Les métaux électrolytes comme le sodium, le potassium et le calcium, contribuent à maintenir une force ionique adaptée et interviennent dans les phénomènes de transmission du signal. Le fer et le cuivre sont des éléments essentiels du site catalytique de nombreuses enzymes ; ils interviennent dans le transport de l'oxygène. Le zinc participe à la stabilité structurale des protéines ainsi qu'à la régulation de la pression osmotique. Le calcium, le magnésium et le zinc aident à stabiliser l'ADN en participant à des interactions électrostatiques.

D'autres métaux lourds comme le mercure, le cadmium, le plutonium, le plomb, le palladium et l'or n'ont pas de fonctions physiologiques connues et sont non essentiels pour les êtres vivants. Ils sont toxiques et leur accumulation dans le corps des animaux cause des maladies graves.

Les ions métalliques essentiels peuvent également provoquer des dommages au sein de la cellule. La régulation de la concentration de ces ions, l'homéostasie, est donc vitale.

## **2.2. Homéostasie des métaux lourds**

Les toutes premières formes de vie sont vraisemblablement apparues dans un environnement contenant des concentrations élevées en métaux, ce qui a mené à l'apparition des mécanismes de résistance. Les cellules possèdent des systèmes de contrôle de la concentration en métaux lourds leur permettant de réguler l'influx et l'efflux de ces derniers.

Cette régulation mène à un subtil équilibre imposé par la dualité des métaux à la fois essentiels au niveau de traces et toxiques lorsqu'ils sont présents en quantités excessives.

### **2.2.1 Mécanisme d'influx et efflux des métaux dans les bactéries**

En ce qui concerne l'influx, il y a deux types de systèmes permettant l'entrée des métaux lourds. La plupart des organismes utilisent une combinaison des deux systèmes.

- ❖ Le système passif : il est de faible affinité et rapide. Il utilise généralement l'énergie du gradient osmotique à travers la membrane plasmique des bactéries. Ce système n'est pas spécifique, n'importe quel ion peut ainsi entrer dans la cellule.



- ❖ Le système actif : il est lent et de très haute affinité pour le substrat. Il utilise souvent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie.

Les ions métalliques libres ne sont pas dégradés comme les composés organiques. Pour leur stabilisation à l'intérieur de la cellule deux mécanismes coexistent :

- ❖ La formation de complexes : avec les composés soufrés, comme les groupements thiols de certaines enzymes. La complexation des ions métalliques permet le stockage temporaire de ceux-ci. Chez les bactéries à Gram-négatif, la complexation met en jeu le glutathion et les thiorédoxines.
- ❖ La réduction : est la réduction du métal à un état d'oxydation moins toxique.

Pour la sortie, ce sont des systèmes d'efflux qui permettent de rejeter les cations dans l'espace intercellulaire et donc de réduire l'accumulation intracellulaire de métaux lourds.

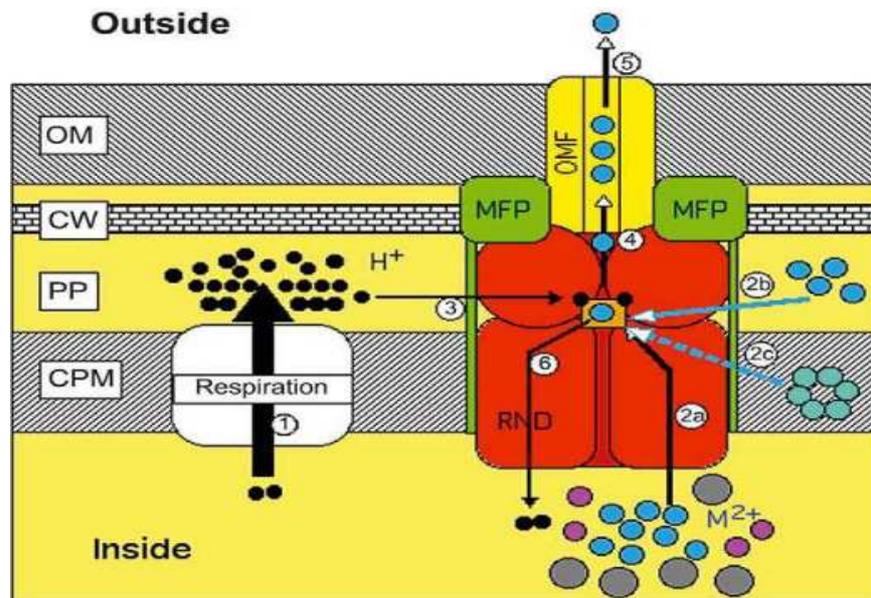
L'efflux fait intervenir divers complexes protéiques membranaires :

**a. Les systèmes « Cation Diffusion Facilitator » (CDF) :**

Les protéines CDF forment une famille de transporteurs métalliques dont le substrat principal est le Zn(II) mais qui transportent aussi le Co(II), le Ni(II), le Cd(II) et le Fe(II). Ces protéines ont des caractéristiques structurales communes, à savoir six hélices transmembranaires et des régions C et N-terminales riches en histidines (Paulsen and Saier, 1997).

**b. Les systèmes « Heavy Metal Efflux-Resistance Nodulation and cell Division » (HME-RND) :**

Les protéines RND forment un groupe de protéines impliquées dans la résistance aux métaux lourds (*C. metallidurans*), la nodulation (*Mesorhizobium meliloti*) et la division cellulaire (*E. coli*). Les protéines RND sont couplées à deux autres protéines : une protéine de fusion membranaire (MPF) et un facteur de la membrane externe (OMF - Outer Membrane Factor) (Nies, 2003). Ce type de mécanisme est appelé HME (Heavy Metal Efflux) (figure 1.2) lorsque le substrat est un ion ou un groupe d'ions de métaux lourds.



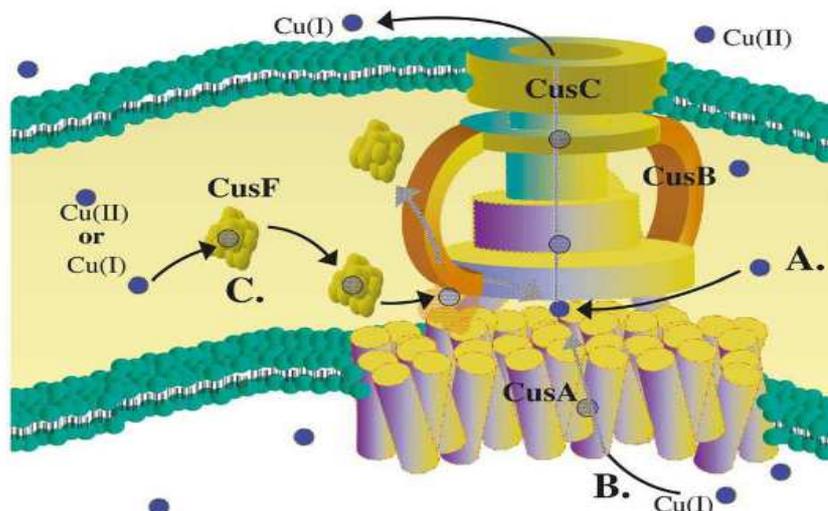
**Figure 1.2 :**  
**mécanisme**

**Modèle du**  
**cellulaire**

**des protéines RND (Nies, 2003).**

*OM : (outer membrane) membrane externe, CW : (cell wall) muréine, PP : (periplasmic space) espace prériplasmique, CPM : (cytoplasmic membrane) membrane cytoplasmique. Le complexe RND (rouge)-MPF (vert)-OMF(jaune) est présenté comme un complexe protéique multi-hétéromères. Les protons (points noirs), expulsés dans l'espace périplasmique (EP) par la chaîne respiratoire (1)- servent de co-transporteurs antiports aux ions métalliques (6). La force électrochimique générée par ce gradient permet d'accumuler le substrat dans le canal MPF-OMF (4). La concentration élevée en ions dans celui-ci permet d'expulser les cations par diffusion (5). Ce modèle montre qu'un site actif (orange) localisé dans la protéine RND est le site de la réaction d'échange et ce quelle que soit la localisation initiale du substrat (2 a,b,c).*

Le système Cus ABC d'*E.coli* correspond au modèle HME-RND établi par Nies pour le cas spécifique du cuivre (Rensing and Grass, 2003) (figure 1.3).



**Figure 1.3 : modèle du complexe protéique CusABC d'*E.coli*.**

Les ronds bleus représentent indistinctement les ions Cu(II) et Cu(I). L'entrée du cuivre dans le complexe CusABC peut se faire de façon directe au départ du périplasma(A), du cytoplasme(B) ou encore grâce à une protéine chaperonne(C).

**c. ATP-ases de type P :**

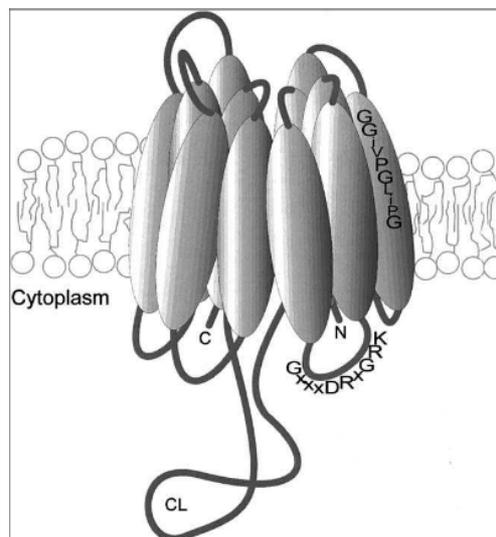
Les ATPases de type P sont une famille de protéines transporteuses de métaux activées par l'hydrolyse de l'ATP. Les substrats de celles-ci sont des cations comme les protons, Na(I), K(I), Mg(II), Ca(II), Cu(I), Ag(I), Zn(II) et Cd(II).

Chez *C. metallidurans* CH34 les Cu-ATPases CopF et CupA portent un motif CXXC alors que dans les ATPase CadA et PbrA de la même souche, une des cystéines est remplacée par deux glutamates. Alors que les Cu-ATPases ne reconnaissent que les ions Cu(I) (et parfois Ag(I)), il semble que les Zn-CPX-ATPases puissent utiliser plusieurs substrats.

Ces protéines portent généralement en N-terminal un motif répété CXXC caractéristique de la liaison au métal (Rensing *et al.*, 1999).

**d. Major Facilitator Superfamily (MFS) :**

Les protéines MFS (Major Facilitator Superfamily) (figure I.4), sont présentes dans tous les règnes du vivant. Ces protéines ont des substrats variés comme les hydrates de carbone, les intermédiaires du cycle de Krebs, les antibiotiques, les acides aminés, les nucléosides, les vitamines, ainsi que les cations et anions, mais pas les macromolécules (Saier *et al.*, 1999).





**Figure 1.4 : organisation structurale des protéines MFS (Bolhuis *et al.*, 1997)**

*Les segments en hélice- $\alpha$  sont représentés par des ellipses. Les régions N et C-terminales sont dans le cytoplasme, de même qu'une large boucle centrale (notée CL).*

La protéine NreB de *C. metallidurans* 31A, dont la synthèse est induite par le Ni(II) et qui confère une résistance à la bactérie, est une protéine de type MFS qui lie les métaux (Grass *et al.*, 2001).

### **3. Le cuivre**

#### **3.1. Caractéristiques**

Le cuivre est un des rares métaux qui existent à l'état natif, ce qui explique probablement son utilisation par l'homme dès la préhistoire.

Le cuivre est un métal de transition, de numéro atomique  $Z=29$ . Sa configuration électronique est :  $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$ . Il est caractérisé par une très bonne conductivité thermique (401 W) et électrique ( $59,6 \times 10^6$  S/m). Il existe sous trois états d'oxydation : Cu(0), Cu(I) et Cu(II) (Zacharias and Ramachandraiah, 1985). Il forme essentiellement deux types de composés, les composés cuivreux (I) et cuivriques (II).

Aujourd'hui, plus de trente types de protéines à cuivre sont répertoriés. Ces protéines possèdent principalement deux fonctions : le transfert d'électrons ainsi que le transport et l'activation du dioxygène pour le fonctionnement des processus vitaux comme la respiration, la protection contre le stress oxydant, la pigmentation ou la coagulation du sang (Puig and Thiele, 2002).

#### **3.2. L'importance du cuivre pour les être vivants**

Le cuivre n'existe pratiquement pas à l'état d'ion libre dans la cellule : il est complexé aux macromolécules, entre autres en tant que co-facteur de nombreuses enzymes (Rae, *et al.*, 1999).

Les protéines à cuivre les plus connues sont la tyrosinase, le cytochrome c oxydase, la lysyl oxydase, la céruloplasmine et la le nitrite oxydase.

Le cuivre est indispensable au phénomène d'angiogenèse et à la respiration (cytochrome c oxydase). Il participe au transport d' $O_2$  dans l'hémocyanine chez les arthropodes ([Daigneault](#), 2004). Le rôle le plus récurrent du cuivre est certainement son implication dans le transfert d'électrons.

Chez les mammifères, la concentration en cuivre, régulée par le foie, intervient dans la fonction immunitaire et contre le stress oxydant (Linder, *et al.*, 1998).

#### **3.3. L'homéostasie du cuivre**

Le cuivre cytoplasmique : le milieu cytoplasmique est réducteur. Les composés réducteurs transforment les ions cuivre(II) en ions Cu(I). Par conséquent, s'il existe du cuivre cytoplasmique libre, il se trouve sous la forme réduite  $\text{Cu}^+$ . Au contraire, dans l'espace périplasmique, il se trouve vraisemblablement sous la forme  $\text{Cu}^{2+}$ .

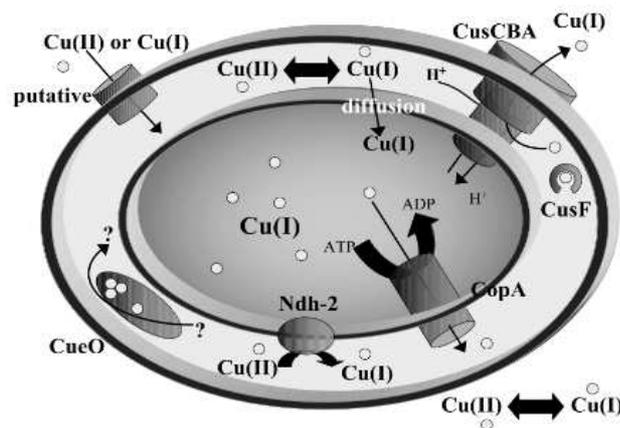
Comme mentionné précédemment le cuivre étant à la fois essentiel et toxique, un contrôle strict de la concentration en cuivre intracellulaire est impératif. Les bactéries utilisent pour cela diverses stratégies mettant en jeu différentes protéines.

### 3.3.1. L'homéostasie du cuivre chez *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est une bactérie commensale intestinale des mammifères. Au cours de son évolution, *E. coli* a mis en place différents systèmes de contrôle de la quantité de cuivre (Rensing and Grass, 2003).

Elle possède deux systèmes de contrôle de la concentration en cuivre. Le premier est régulé par un système à deux composants, c'est le locus Cu-senseur ou locus *cus* : les gènes *cusRS* forment la paire régulatrice activant les gènes *cusCFBA* (Munsin, *et al.*, 2000). Le second système, appelé *cue* (Cu efflux), est composé de deux gènes *copA* et *cueO*. Il est régulé par la protéine CueR.

L'élément central de l'homéostasie du cuivre est représenté par l'ATPase de type P, CopA, localisée dans la membrane interne et assurant l'export des ions  $\text{Cu}^+$  depuis le cytoplasme. Dans le périplasma, l'oxydase CueO et le système d'efflux CusCFBA contrôlent la concentration en cuivre. En outre, plusieurs souches d'*E. coli* possèdent des gènes plasmidiques permettant d'accroître considérablement leur tolérance au cuivre et leur survie dans les environnements riches en métaux (Rouch, *et al.*, 1985).



**Figure 1.5 :**  
**cuivre chez *E. coli*.**

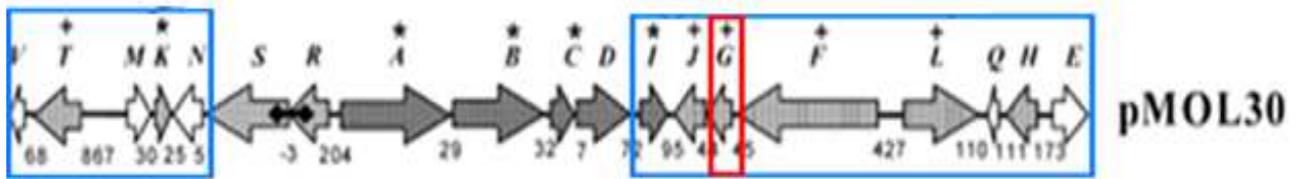
**Homéostasie du**

*CopA* est une ATPase de type P transférant le Cu(I), *NDH-2* une réductase à cuivre, *CueO* une oxydase à cuivre et *CusCFBA* une pompe à efflux composée de quatre domaines. Le cuivre traverse probablement la membrane externe grâce aux porines *OmpC* et *OmpF* (Rensing and Grass, 2003).

### 3.3.2. L'homéostasie du cuivre chez *C. metallidurans*

Chez *C. metallidurans*, le mécanisme d'homéostasie/résistance au cuivre est plus complexe que chez *E. coli*. Comme on peut le voir sur le schéma suivant (figure 1.6), il y a un grand nombre de gènes impliqués dans la résistance au cuivre, L'ensemble de ces gènes confèrent à *C. metallidurans* une résistance à une concentration en  $\text{Cu}^{2+}$  deux fois plus élevée que celle observée pour *E. coli*.

Le groupe central *copSRABCD* est présent en deux copies : une sur le chromosome 2 et l'autre sur le plasmide pMOL30. De part et d'autre de ce module sur le pMOL30 on trouve une quinzaine de gènes dont l'expression est induite par le cuivre mais dont la plupart reste de fonction inconnue (en bleu) (Monchy S. et al., 2006). En rouge le gène *copG*, objet de notre étude. Les protéines codées par les gènes marqués d'un '+', portent un motif riche en cystéine (CXCC ou CXXC), susceptible de lier des ions métalliques.



**Figure 1.6 : Organisation des clusters *cop* sur le plasmide *pMOL30* de *Cupriavidus metallidurans*.**

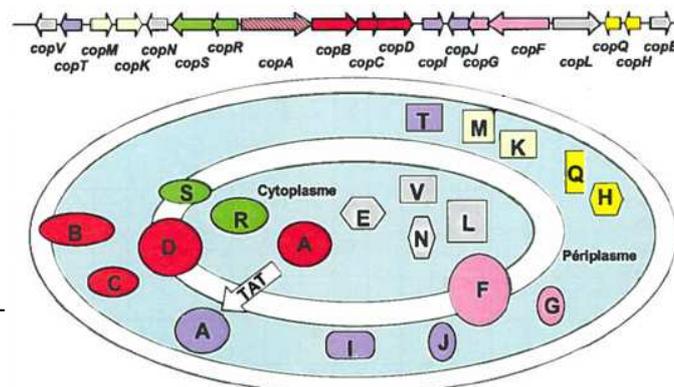
## 4. La protéine CopG

Le plasmide pMOL30 comporte une série de 21 gènes induits par la présence de cuivre, formant le système *cop*. On y trouve plusieurs gènes dont la fonction n'est pas claire, parmi lesquels le gène *copG*.

La protéine codée par ce gène a une masse attendue de 12.5 kDa. Elle porte un motif CXXC caractérisé par deux résidus cystéine, séparés par deux acides aminés généralement hydrophobes, qui peuvent former théoriquement un résidu cystine par oxydation des deux groupes fonctionnels thiol en pont disulfure. Le motif CXXC se trouve dans beaucoup d'autres protéines, entre autres dans les « copper chaperone proteins » (Harrison *et al.*, 2000).

On trouve à l'extrémité N-terminale de CopG un peptide signal caractéristique des protéines exportées vers l'espace périplasmique (Figure 1.7).

Des homologues de CopG se trouvent dans d'autres bactéries. Ces gènes *copG* se trouvent associés à des gènes codant pour des protéines d'efflux des métaux lourds. Elles possèdent toute un peptide signal de localisation périplasmique.





**Figure 1.7 : Organisation de la région cop de pMOL30 et prédiction de localisation des protéines correspondantes dans les différents compartiments cellulaires.**

La figure suivante montre la séquence nucléotidique du gène *CopG* (figure 1.8), ainsi que la séquence en acides aminés de la protéine correspondante CopG.

```
1 ATGAAATACCTGTTTGCCTGATCCTGGCAGGAAGTGCCCGCTCGTATGCCGCGCG 60
  M K Y L F A A A I L A G S A A S Y A A A
61 CCTGCCATGACGGTCTATAAGGATCCTAAGTGGCGTTGTTGCGAAGAGTGGGTGAAGCAC 120
  P A M T V Y K D P N C G C C E E W V K H
121 ATCAATCAAGCCGGCTTCCCCCCCCAAGGTGATCAACTCGACGGATGTGACCTCGGTAAG 180
  I N Q A G F P P K V I N S T D V T S V K
181 ACGCGGCTTGGGGTGCCGGCCTCATTEAGTTCCTGCCACACCGCCGCTGCTGGAAACTAGC 240
  T R L G V P A S F S S C H T A V L E T S
241 GGCCAGGTCATTGAGGGGCATGTGCCGGCCTCCGCTATCCAGAAAAGTGGTGGCCAATCGC 300
  G Q V I E G H V P A S A I Q K L V A N R
301 GCAGTCAAGGGCGTCGCAAGTGCCTGGCATGCCGACCAACGCACCGGGCATGGCAAGCTG 360
  A V K G V A V P G H P T N A P G M G K L
361 AACGGCGGCTGGTACGGTGGATTCCAGGGCAAGCCCTTCTCCCAAGATTAA 414
  N G G L V T V D F Q G K P F S Q D *
```

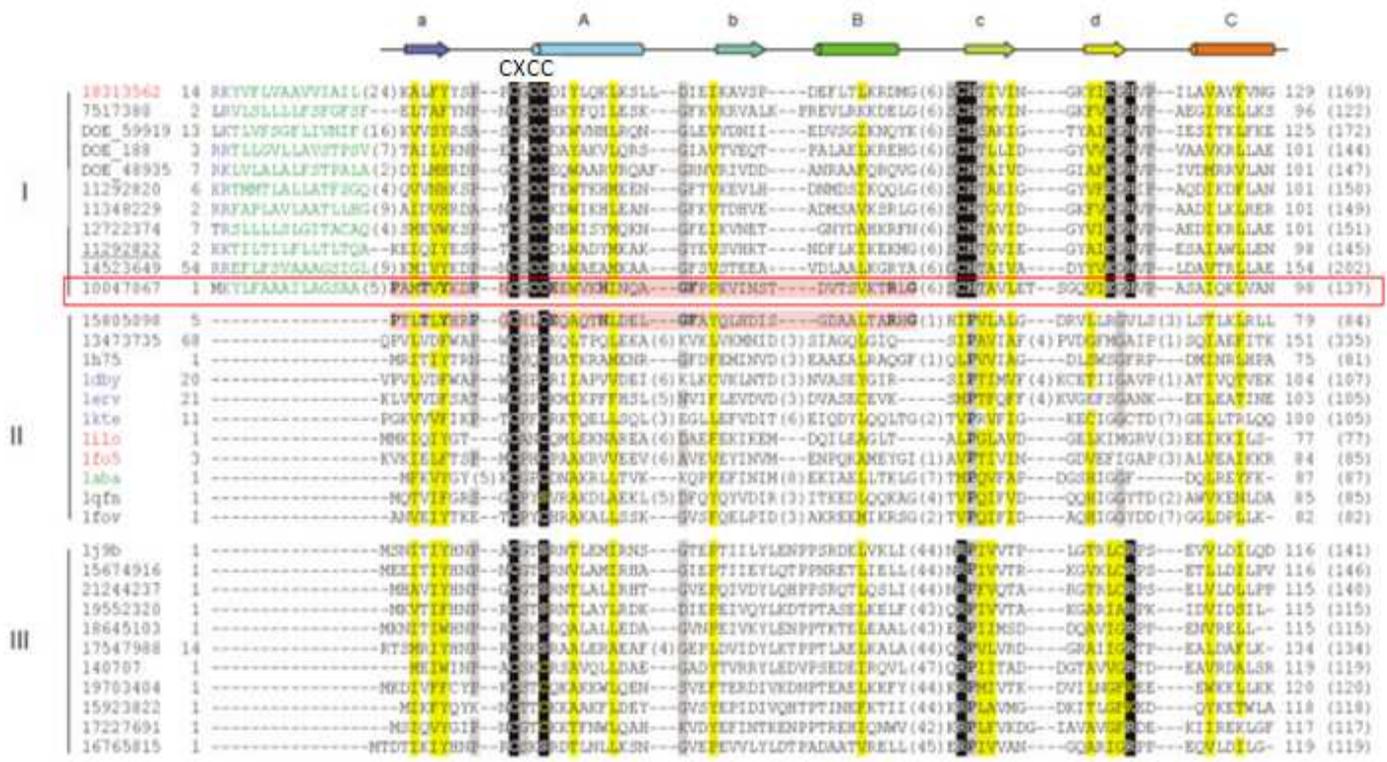
**Figure 1.8 : Séquence nucléotidique du gène *copG* et sa traduction en acides aminés. Le peptide signal est encadré en rouge, en bleu le motif CXXC.**

Sur base d'homologie de séquence et de structure (prédite), il a été proposé que CopG fait partie de la super-famille des thiorédoxines (Kinch *et al.*, 2003).

Les thiorédoxines (TRX) sont de petites protéines d'environ 12kDa qui sont capables de réduire, par une réaction séquentielle, les ponts disulfures d'une protéine spécifique (la cible). La première thiorédoxine a été identifiée chez la bactérie *Escherichia coli* où elle est l'enzyme responsable de la réduction de la ribonucléide réductase (Laurent *et al.*, 1964). Depuis, la présence de cette famille de protéines a été mise en évidence chez tous les organismes vivants (Holmgren, 1989). L'activité d'oxydoréductase des thiorédoxines est liée aux deux résidus cystéine du motif CXXC, présent dans le site actif. La première cystéine du motif est responsable de l'attaque nucléophile primaire du pont disulfure de la cible. Un pont disulfure intermoléculaire transitoire est formé entre la TRX et sa

cible. Le complexe est ensuite dissocié grâce à l'attaque du disulfure mixte par la deuxième cystéine du site actif.

Le système ferrédoxine/thioredoxine assure la régulation de l'activité de différentes enzymes. Des gènes codant pour la ferrédoxine, la ferrédoxine-NADP réductase, la phosphoribulokinase, la thioredoxine m (TRX m) et la thioredoxine h (TRX h) ont été isolés chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Ces études ont mis en évidence l'induction de l'expression des TRX m et h par les métaux lourds. De plus, les TRX peuvent fixer des métaux lourds et cette fixation inhibe leur activité. Ces résultats suggèrent que les TRX pourraient constituer un nouveau type de molécules impliquées dans les mécanismes de tolérance aux métaux lourds (Lemaire S. and Jacquot J. P. 1999).



**Figure 1.9 : Alignement de séquences d'homologues de CopG.**

**La séquence de CopG est encadrée en rouge, (I) Groupe COG3019 (putative metal-binding proteins) ; (II) Groupe COG0695 (Thiol transférases) ; (III) Groupe COG139 (arsenate reductases, ArsC). (COG = Cluster Of Orthologs) (Kinch et al., 2003).**

Le motif CXXC est présent dans toutes les séquences de la famille des COG3019 (I) regroupent les protéines homologues de CopG, sous la forme Cys-Gly-Cys-Cys. Pour les thiol-transférases, qui fonctionnent généralement comme réducteurs cytoplasmiques des thiol-disulfure, les résidus appartenant à ce motif jouent un rôle fonctionnel important dans la réaction thiol redox (Carvalho *et al.*, 2006).



Par conséquent, la présence du dipeptide Gly-Cys entre la paire de cystéines des séquences COG3019 peut influencer le potentiel d'oxydo-réduction de ces enzymes qui va déterminer leur fonction générale comme oxydants ou réducteurs.

De plus, dans les protéines, des liaisons disulfures peuvent se faire entre des résidus Cys adjacents, et leur réduction peut contrôler la fonction et influencer la stabilité conformationnelle.

Un motif CXCC, introduit par mutagenèse *in vitro* dans la séquence de la ribonucléase A, fonctionne comme un interrupteur rédox : sous forme oxydée, la protéine perd 70% de son activité et sa stabilité est diminuée. Après réduction, elle retrouve toute son activité (Park and Raines, 2001).

Plusieurs autres résidus conservés dans la famille COG3019 (H, C, E) sont positionnés dans le site actif modélisé et pourraient coordonner des ions métalliques. Le regroupement de plusieurs membres de la famille COG3019 dans la banque de données ERGO (<http://ergo.Integratedgenomics.com> / ERGO /) avec des oxydase multicuivre, des ATPases transportant le cuivre et les protéines de résistance au Co/Zn/Cd CzcA et CzcB suggère leur association avec les métaux (Kinch *et al.*, 2003).



## Chapitre II : But du travail

Comme décrit dans l'introduction, chez la bactérie *C. metallidurans* la résistance au cuivre est déterminée par les gènes *cop*, portés en grande majorité par le plasmide pMOL30.

Plusieurs des protéines codées par ces gènes restent de fonction inconnue ou non étudiée expérimentalement. Notre mémoire se focalise sur la protéine CopG.

Grâce à des recherches bioinformatiques, on sait que CopG fait partie de la famille des thiorédoxines.

Le gène *copG* a été cloné au laboratoire dans plusieurs vecteurs d'expression d'*E.coli* mais la protéine correspondante n'a pu être produite qu'en très petite quantité.

Ce travail s'inscrit dans les projets en cours au laboratoire qui sont :

1. Mettre en évidence l'activité des protéines Cop et comprendre leurs rôles dans la résistance au  $\text{Cu}^{2+}$ .
2. Mettre au point des systèmes d'expression favorisant la production et la cristallisation de protéines difficiles à produire afin d'en déterminer la structure.

Dans ce cadre, les principaux objectifs de ce travail sont :

- ✓ Tester l'efficacité de différents systèmes d'expression pour produire CopG
- ✓ Purifier la protéine
- ✓ Etudier son activité, vérifier son activité supposée de thiorédoxine
- ✓ Cristalliser la protéine afin de pouvoir à plus long terme déterminer sa structure par diffraction des rayons X



## Chapitre III : Matériel et Méthodes

### 1. Matériel biologique et milieux de culture

#### 1.1. Milieux de culture

- Milieu 853 :

Le milieu riche 853 a été utilisé pour la croissance d'*E.coli*. Par litre d'eau distillée :

- 0.7 g de  $K_2HPO_4$
- 0.3 g de  $KH_2PO_4$
- 1 g de glucose
- 5 g de NaCl
- 5 g d'extrait de levure
- 10 g de tryptone

Les boîtes de Pétri sont préparées à partir d'un milieu 856, c'est-à-dire, du milieu 853 auquel on ajoute 1.5% de bacto-agar, pour l'obtention d'un milieu solide.

Ces milieux sont additionnés d'ampicilline 50  $\mu\text{g/ml}$  ou kanamycine 30  $\mu\text{g/ml}$ , selon le vecteur d'expression utilisé, pour s'assurer de son maintien.

- Milieu LB :

Le milieu LB est un milieu 853 sans glucose, utilisé pour l'induction par le rhamnose de la souche KRX.

Deux milieux d'induction ont été utilisés :

Pour les conditions « early » : LB + 0,05% de glucose et 0,1% de rhamnose.

Pour les conditions « late » : LB + 0,15% de glucose et 0,1% de rhamnose.

#### 1.2. Solutions tampon

- TAE :



Le tampon TAE 1x (tris 20 mM, acétate 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3) est utilisé pour réaliser des électrophorèses d'ADN sur gel d'agarose. Un stock cinquante fois concentré est préparé. Par litre, pour l'obtention de TAE 50x :

- 242 g de Tris base
- 57.1 ml d'acide acétique glacial
- 18.8 g d'EDTA

Ajuster à pH 8.5 avant de compléter à 1 litre à l'eau distillée. De l'agarose purifié (ROCHE) est utilisé à 1% ou 2% (p/v) dans du TAE (1x) pour réaliser les gels d'électrophorèse d'ADN.

- **MES :**

Le tampon MES est utilisé pour réaliser les électrophorèses de protéines sur gel de polyacrylamide (NuPage, Invitrogen). Il est composé de MES (50 mM), Tris Base (50 mM), SDS (0.1%) et EDTA (1 mM), à un pH de 7.3.

- **TBS :**

Le TBS est utilisé comme tampon pour réaliser les « Western blot ». La composition du tampon TBS est 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5 :

- 76 g de NaCl
- 6.05g de Tris base
- Amener à 1000 ml avec de l'H<sub>2</sub>O, après ajustement à pH 7.5.

### 1.3. Souches bactériennes

Les trois souches d'*E.coli* qui ont été utilisées pour l'expression hétérologue de *copG* sont la souche KRX, la souche XL1 Blue et la souche HMS174.

- **KRX :**

*E.coli* K12 [F<sup>+</sup>, *traD* 36,  $\Delta ompP, proAB+$ , *lacI*<sup>q</sup>,  $\Delta(lacZ)M15$ ]  $\Delta ompT$ , *endAI*, *recAI*, *gyrA96* (*Nal*<sup>r</sup>), *thi-1*, *hsdR17* (*rk-*, *mk+*), *el4-* (*mcrA*), *relA I*, *supE44*,  $\Delta(lac -proAB)$ ,  $\Delta(rhaBAD) ::T7$  RNA polymerase.

- **HMS174 (DE3):**

*E.coli* [F<sup>-</sup> *recAI hsdR(rK12- mK12+)* (DE3) (*Rif R*)]

HMS174 est une souche qui porte la mutation *recA* empêchant la recombinaison homologue. Cette souche peut donc stabiliser certains plasmides contenant des séquences répétitives.

- **XL1 Blue :**

*recAI endAI gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relAI lac* [F<sup>+</sup> *proAB lacI*<sup>q</sup>  $\Delta M15$  Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]



Les cellules XL1-Blue ne possèdent pas d'endonuclease mutation (*endA*), ce qui améliore considérablement la qualité des préparations d'ADN, et une mutation *hsdR* qui empêche la dégradation de l'ADN cloné par le système de restriction K.

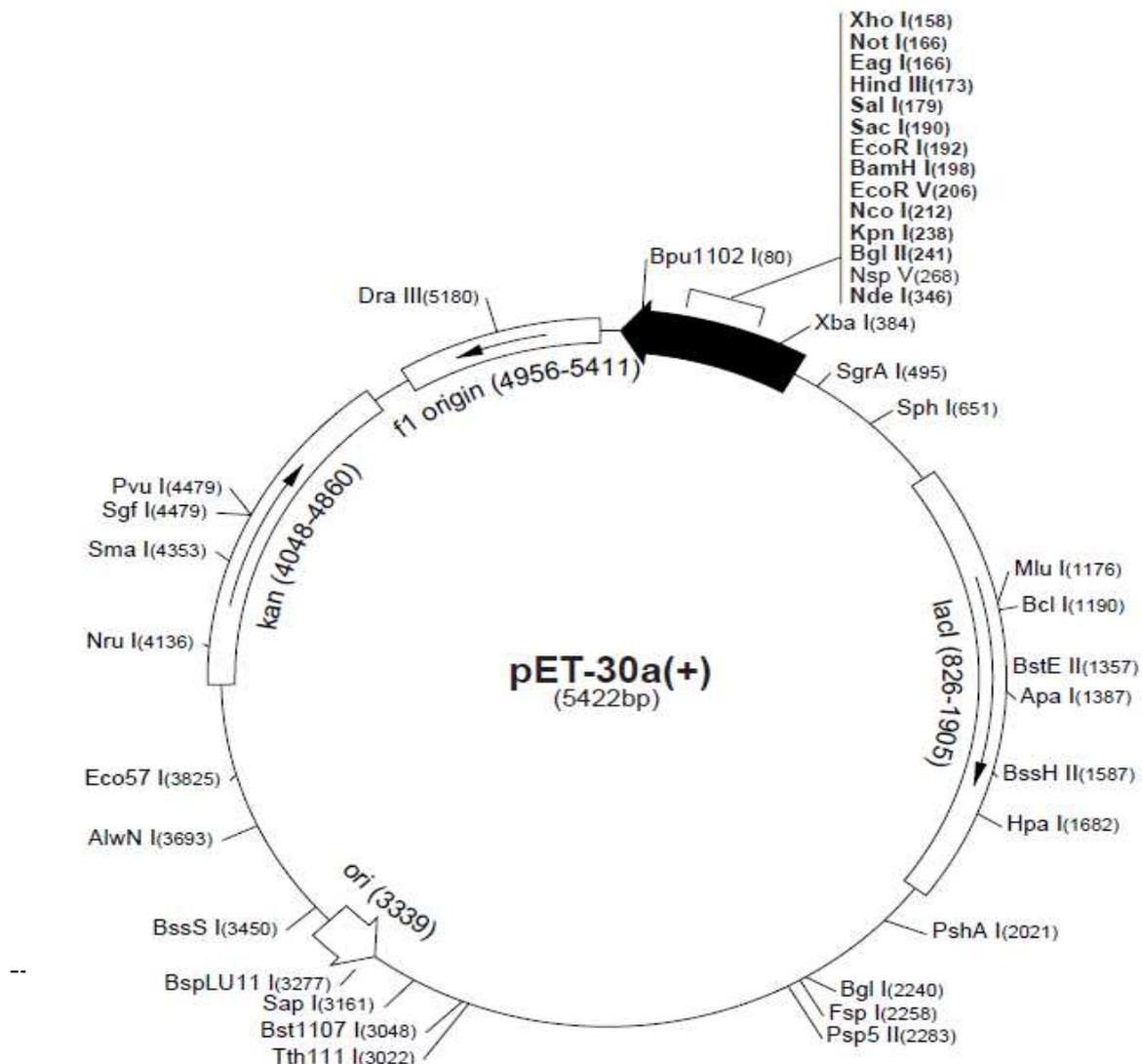
Elle représente une souche de choix dans la préparation d'ADN plasmidique de haute qualité. Elle possède une très bonne efficacité de transformation.

## 1.4. Les vecteurs plasmidiques

- Le pET30:

Le système pET (Novagen) est un des systèmes les plus puissants développés pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli*. Les gènes cibles sont clonés dans les plasmides pET sous le contrôle du promoteur fort du bactériophage T7 et donc dépendant de l'expression d'une source de T7 ARN polymérase dans la cellule hôte.

Dans le meilleur des cas, lorsque le gène de l'ARN polymérase T7 est totalement induit, la quasi-totalité des ressources de la cellule sont consacrées à l'expression du gène cible ; le produit désiré peut représenter plus de 50% des protéines cellulaires totales après quelques heures d'induction.



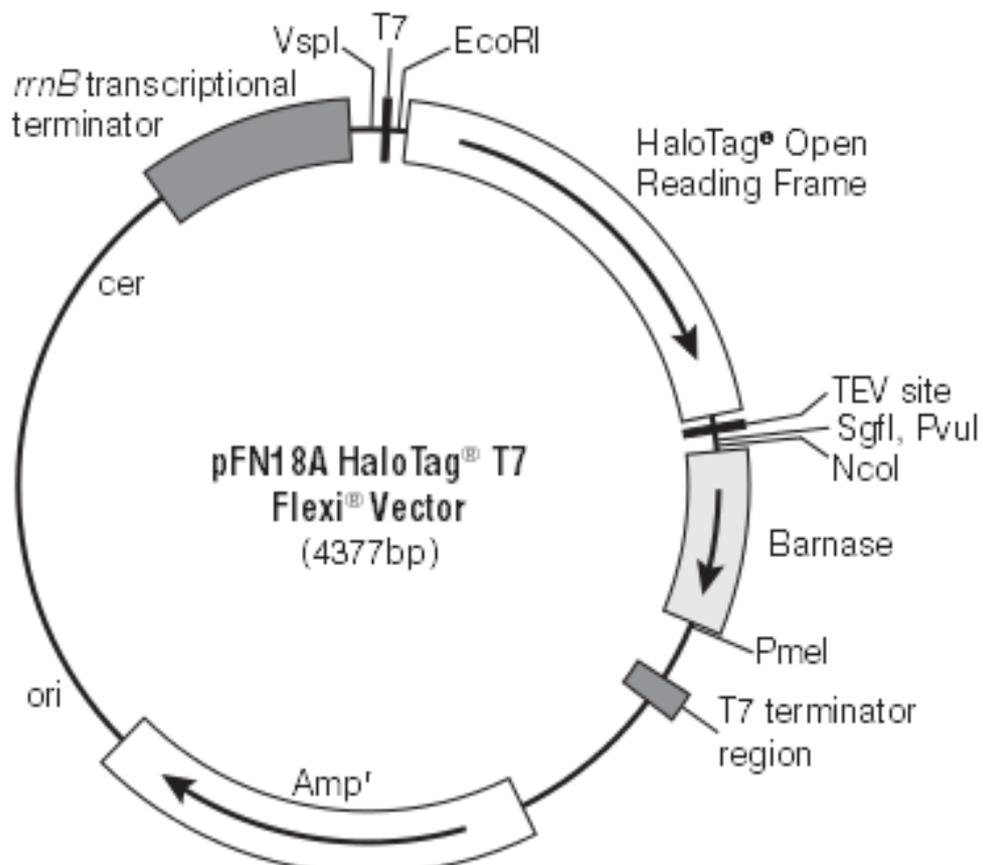
**Figure 3.1 : Carte de pET30.**

• **pFN 18A :**

Le vecteur HaloTag pFN18A® (Promega) est configuré pour ajouter l'étiquette HaloTag® à l'extrémité amino terminale de la protéine d'intérêt et permet l'expression de cette protéine fusion sous la dépendance de l'ARN polymérase de T7.

Le pFN18K contient les éléments suivants :

- Un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection du plasmide.
- Des sites de PmeI et SgfI uniques, qui permettent une insertion facile de la séquence d'intérêt, fusionnée à la séquence de l'étiquette HaloTag.
- Un site de reconnaissance pour le clivage par la protéase TEV de la protéine fusionnée à l'étiquette Halo.
- La séquence d'une étiquette HaloTag.



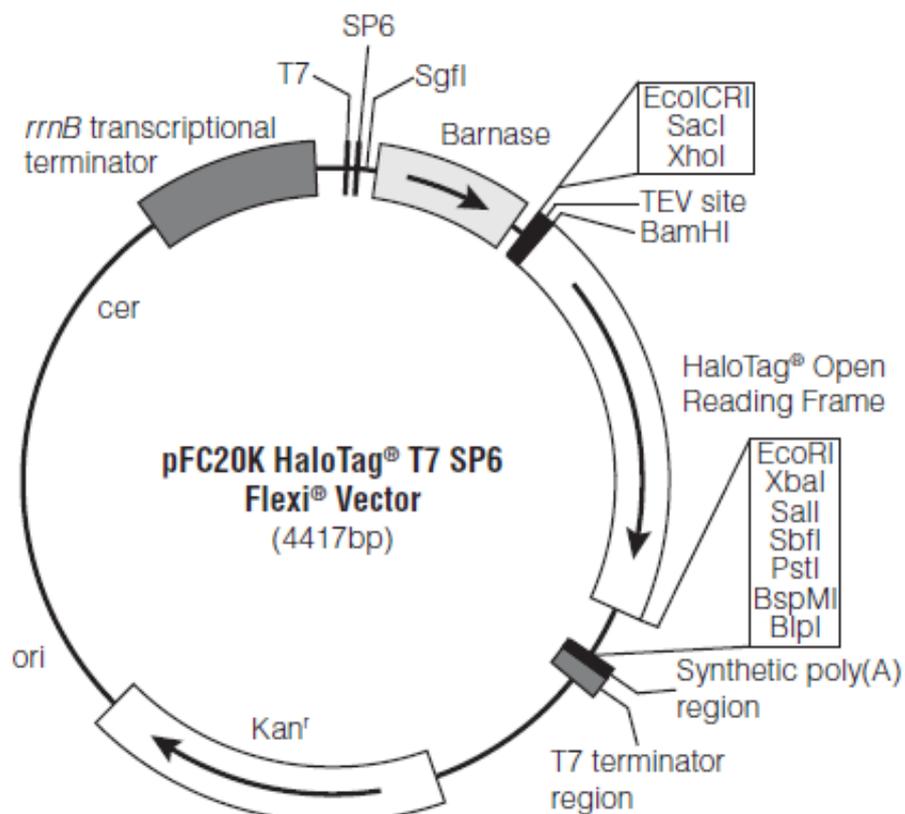
**Figure 3.2 : Carte de pFN 18A.**

• **pFC 20K :**

Le vecteur HaloTag pFC20K<sup>®</sup> (Promega) est configuré pour ajouter l'étiquette Halo<sup>®</sup> à l'extrémité carboxy terminale de la protéine partenaire de fusion et permet l'expression de la protéine sous la dépendance de l'ARN polymérase du phage T7.

Le vecteur pFC20K HaloTag<sup>®</sup> contient les éléments suivants:

- Un promoteur pour la de l'ARN polymérase T7 en amont du gène de la protéine de fusion.
- La séquence d'une étiquette Halo C-terminale<sup>®</sup>.
- Un site de reconnaissance par la protéase TEV pour le clivage de la protéine fusionnée à l'étiquette Halo.
- Un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection du plasmide.
- Des sites EcoICRI et SgfI uniques qui permettent une insertion facile de la séquence d'intérêt.

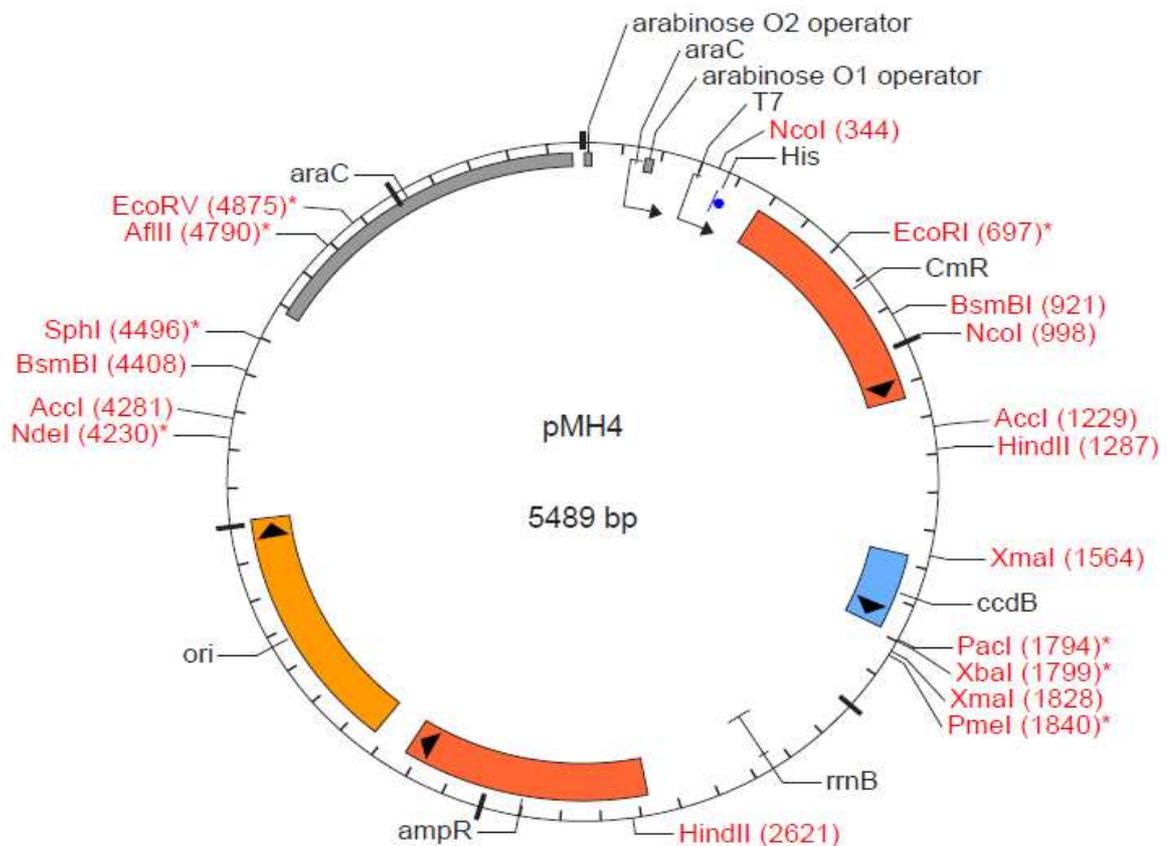


**Figure 3.3 : Carte du plasmide pFC20K.**

- **pMH4 :**

Le pMH4 est un vecteur d'expression bactérien, où l'expression du gène cloné dépend soit d'un promoteur arabinose soit d'un promoteur T7. Il est résistant à l'ampicilline.

Dans ce travail, on a utilisé le plasmide dérivé pMH4 contenant le gène de l'endoglucanase Tm1752 = pMH4 : Tm1752 (origine : DNASU Plasmid Repertory. The Biodesign Institute. Arizona State University 1001 S. Mc Allister Ave, TEMPE, Az 85287-6401).

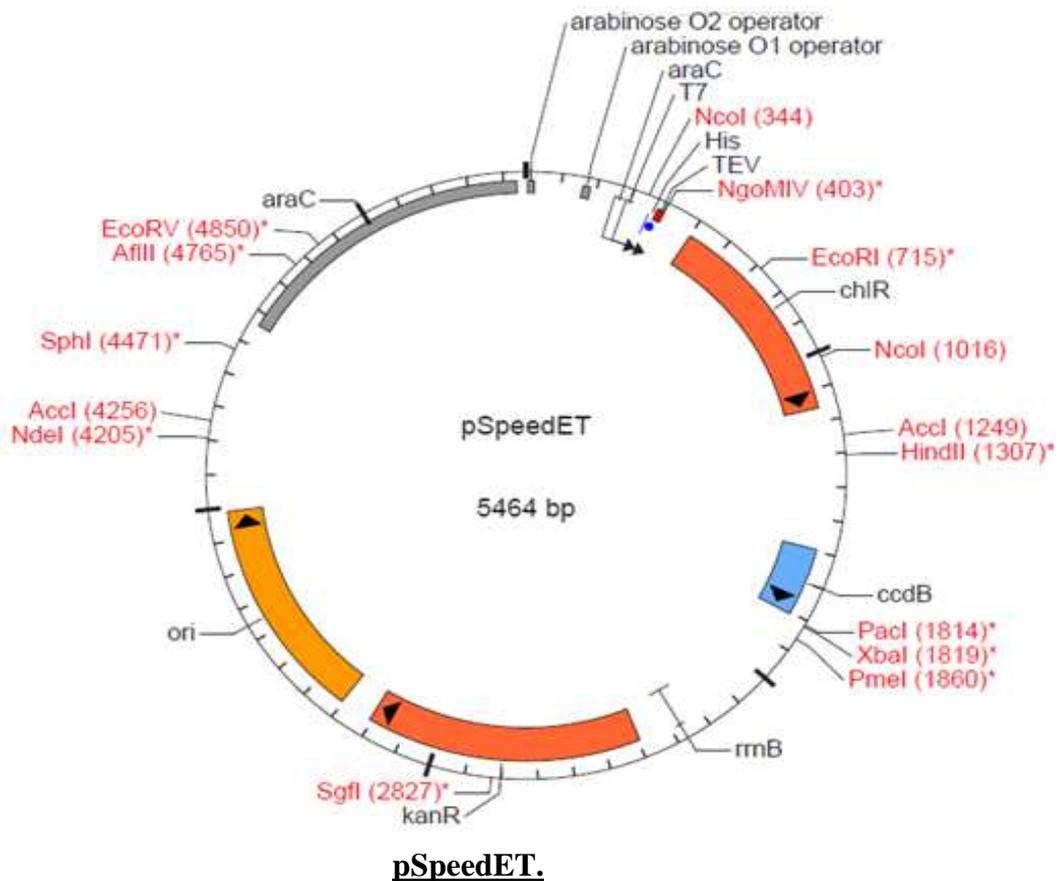


**Figure 3.4 : Carte de pMH4.**

- **pSpeedET :**

Le pSpeedET est un vecteur d'expression bactérien, où l'expression du gène cloné dépend soit d'un promoteur arabinose soit d'un promoteur T7. Il est résistant à la kanamycine.

Au cours de ce travail, on a utilisé le plasmide pSeedEt contenant le gène de la protéine BDI\_3087 = pSeedET:BDI\_3087 (origine : DNASU Plasmid Repertory. The Biodesign institute. Arizona State University 1001 S. Mc Allister Ave, TEMPE, Az 85287-6401).



**Figure**  
**3.5 : la**  
**carte de**

## 2. **Méthodes**

### 2.1. **Transformation des souches d'*E.coli***



### **2.1.1. Préparation des cellules compétentes**

Dans 10 ml de milieu 853, on inocule une colonie de la souche à transformer. Cette préculture est incubée sous agitation pendant la nuit à 37°C. Une culture de 10 ml de 853 estensemencée avec 0,2 ml de préculture. Les bactéries sont cultivées à 37°C, sous agitation, jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $A_{600} \approx 0.5$ ). Les cellules sont alors centrifugées pendant 10 minutes à 7000 rpm.

Le culot bactérien est resuspendu dans 5 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM froid et mis dans la glace pendant 20 minutes. Une nouvelle centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions, le culot de cellules est resuspendu dans 0.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  froid.

### **2.1.2. Transformation des cellules compétentes**

Dans un tube eppendorf stérile à 4°C, mettre 150  $\mu\text{l}$  de cellules compétentes plus une quantité variable d'ADN. Laisser 15 minutes dans la glace. Après un choc thermique de 5 minutes à 37°C, qui permet d'accentuer la déstabilisation de la bicouche lipidique et de stimuler la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules, les bactéries sont diluées dans 1 ml de milieu 853. Les cellules sont incubées sous agitation à 37°C pendant 1h, puis centrifugées 5 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans le liquide résiduel (environ 100  $\mu\text{l}$ ) et étalé sur boîte de Pétri du milieu 856 additionné de antibiotique adéquat pour la sélection des transformants. Les boîtes sont ensuite incubées toute la nuit à 37°C.

### **2.1.3. Préparation d'ADN plasmidique**

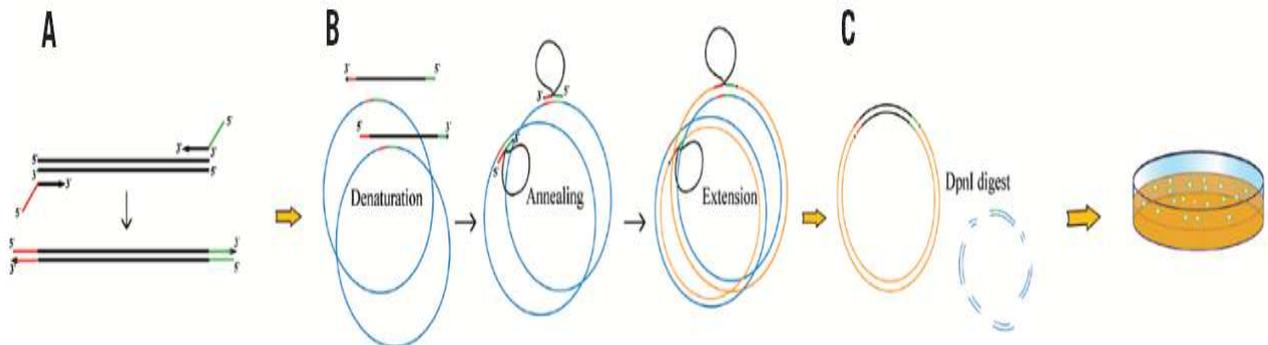
Cette étape est réalisée à l'aide du kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich) qui permet d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir d'une culture de cellules portant le plasmide désiré. Après collecte des cellules par centrifugation, celles-ci subissent une lyse alcaline (par SDS + NaOH), le SDS est un détergent qui dissout et dégrade les composants lipidiques de la membrane bactérienne, libérant ADN et protéines dans la solution. On procède ensuite à une précipitation de l'ADN génomique par l'acétate de sodium. L'ADN génomique est alors éliminé par centrifugation. Le lavage à l'éthanol va faire en sorte de dissoudre et libérer la majorité des molécules adsorbées sur la résine dans la mini-colonne à l'exception de l'ADN plasmidique qui est insoluble dans l'éthanol. Il est éliminé par centrifugation. Enfin, l'ADN plasmidique est élué. Le protocole suivi est celui recommandé par le fabricant.

## **2.2. Construction des fusions du gène *copG* avec Tm1752 ou BDI 3087 par PCR de chevauchement (« O. PCR »)**

- **Principe de l'Overlap PCR (Bryksin and Matsumura, 2010):**

Tout d'abord (A), le gène d'intérêt est amplifié avec des amorces chimériques afin que l'amplicon ait des extrémités 5' homologues au vecteur. Ensuite (B), chaque brin de l'amplicon

obtenu est utilisé comme amorce pour une PCR de fusion avec le plasmide cible comme matrice. (C) Le produit de la réaction est traité par l'enzyme *DpnI* qui détruit le plasmide parent (méthylé, au contraire de l'ADN provenant de l'amplification PCR) et introduit dans une souche d'*E.coli* par



transformation (figure 3.6).

**Figure 3.6 : Un aperçu du clonage par Overlap PCR (ou PCR de chevauchement, Bryksin and Matsumura, 2010).**

• **Etape (A) l'amplification du gène à introduire par PCR**

L'amplification du gène *copG* de la souche de *C. metallidurans* CH34, pour le clonage dans le vecteur d'expression choisi (pSpeedET ou pMH4) a été faite sur de l'ADN génomique de *C. metallidurans* CH34, comme matrice et avec les amorces adéquates.

- Amorces pour la fusion avec Tm1752 :

La partie en bleu correspond à la partie de *copG*, la partie en noir correspond aux séquences plasmidiques adjacentes au site d'insertion.

CopGfor :  
TAGGAAAATGTTGGAACACTATTGAGAAAATATGCGGCGCCTGCCATGACG

copGrev :  
ACCGGGTATGTATATCTCCTTCTCAGTTAATCTTGGGAGAAGGG

- Amorces pour la fusion avec BDI\_3087 :

La partie en bleu correspond à la partie de *copG*, la partie en noir correspond aux séquences plasmidiques adjacentes au site d'insertion.

copGphus3-fd :  
TCTATCATGGGTCCGGCTCGATCAACAAAGTCAAAGCGGCGCCTGCCATG  
ACG

copGphus3-rv :  
GAGTTAATTAAGTCGCGTTAATAATCTTGGGAGAAGGG

- Mélange de PCR :

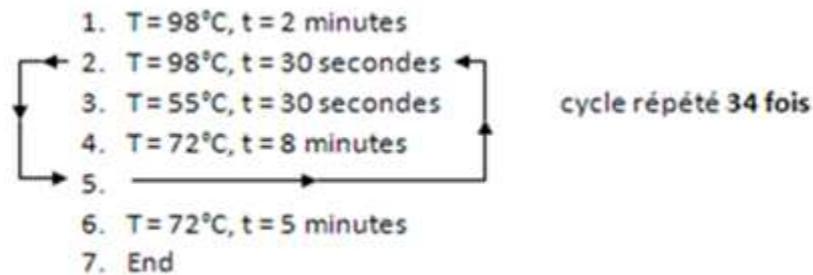
Le volume total est de 100 µl. CH34 à 50ng/ml



ADN CH34	dNTP 25 mM	5X Phusion HF Buffer	CopGfor 5 $\mu$ M	CopGrev 5 $\mu$ M	Pfu DNA polymerase	H <sub>2</sub> O
4 $\mu$ l	0.8 $\mu$ l	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1 $\mu$ l	54.2 $\mu$ l

**Tableau 3.1 : Mélange réactionnel effectué pour l'amplification du gène *copG*.**

- Programme de la PCR pour l'amplification du gène *copG* :



Une aliquote du produit PCR est d'abord portée sur gel d'agarose. Lorsque la présence d'une bande correspondant à la taille de *copG* est confirmée, les amplicons sont purifiés pour servir d'amorces 'forward' et 'reverse' dans la PCR de fusion.

Cette purification sert à éliminer ce qui pourrait gêner les réactions suivantes (les amorces). Elle s'effectue au moyen du kit «High Pure PCR Product Purification Kit» (Roche).

- ADN polymérase Pfu est une enzyme thermostable qui fonctionne à haute température. Elle catalyse la polymérisation des nucléotides dans l'ADN duplex dans le sens 5'  $\rightarrow$  3'.
- Le 5X Phusion HF Buffer (Thermo Scientific) est une solution tampon optimisée pour l'amplification d'ADN utilisant le DNA polymerase Pfu. Le tampon fournit 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> dans les conditions de réaction final.

• **Etape (B) Overlap PCR**

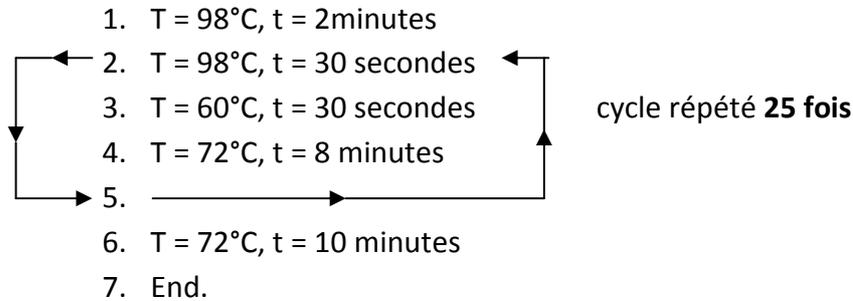
5x Phusion HF buffer	H <sub>2</sub> O	dNTP 10 mM	Pfu DNA polymerase	Plasmide vecteur A 15 mg/ml	Amplicon <i>copG</i>
4 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	13 $\mu$ l

**Tableau 3.2 : Mélange réactionnel pour la fusion du gène *copG* où le rapport molaire entre l'amplicon CopG et le plasmide est de 15. Le volume total par tube est de 20  $\mu$ l.**



On a fait plusieurs essais où l'on a fait varier le rapport molaire entre l'amplicon CopG (=amorces) et le plasmide de 7 à 15. Ainsi que la température de l'étape d'hybridation, soit à 60°C ou 65°C.

Le programme de la PCR de chevauchement est le suivant :



#### • **Etape (C) Elimination du plasmide parental**

Après amplification, 1 µl de *DnpI* est ajouté au mélange réactionnel. Le mélange est ensuite incubé 1 heure à 37°C. Ce mélange est ensuite transformé dans la souche d'expression d'*E.coli* KRX par la méthode au CaCl<sub>2</sub>. (Voir Chapitre III, 2.1.2. Transformation par de l'ADN plasmidique ou par des produits de fusion).

Les colonies apparues sur milieu sélectif sont purifiées. Plusieurs petites cultures de 853 (5 ml) sontensemencées avec des transformants purifiés. Une mini préparation d'ADN plasmidique de ces cultures est envoyée à la firme « Beckman Coulter Genomics » pour séquençage. Lorsque la séquence est correcte, il contient le gène *copG* fusionné à l'extrémité C-terminale du gène de Tm1752 ou de BDI\_3087.

## **2.3. Production de la protéine CopG dans diverses souches d'*E. coli***

### **2.3.1. Induction de l'expression par l'IPTG**

Une colonie isolée d'*E. coli* contenant le plasmide pET30 :: *copG* est mise en culture dans 5 ml de milieu 853 additionné de kanamycine. Cette pré-culture est laissée à 37°C pendant la nuit, puis diluée 100 fois dans 25 ml ou 100 ml du même milieu et la croissance est suivie par mesure de l'absorbance à 660 nm. A A<sub>660</sub> ≈ 0.5 on ajoute 1 mM d'IPTG. La culture est alors transférée à 30°C et laissée à cette température et sous agitation pendant la nuit. Ensuite on centrifuge les cellules à 7000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.

### **2.3.2. Préparation des extraits cellulaires**

Le culot issu de la culture est resuspendu dans 2,5 ml ou 10 ml de tampon HEPES 25 mM contenant du NaCl 150 mM, à pH7.4, la suspension bactérienne est lysée par sonication, pendant 5



minutes à une puissance 30%, en mode pulse (1 seconde OFF, 1 seconde ON sur le sonicateur "Branson Sonifier 250"). Le produit de sonication est centrifugé à 10000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant constitue la fraction soluble, le culot membranaire est resuspendu dans le même volume de tampon et constitue la fraction soluble.

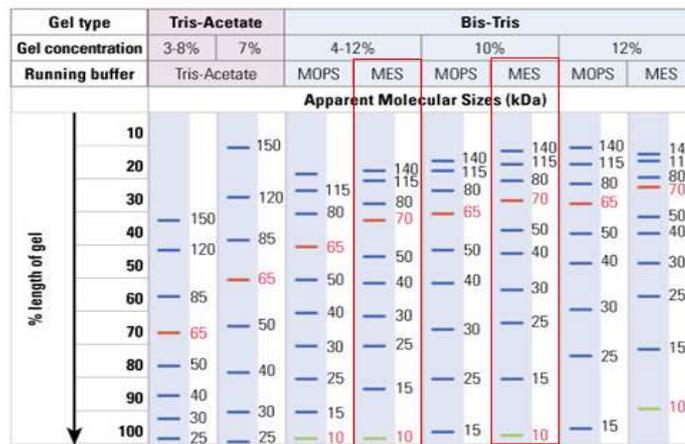
### 3. Analyse des protéines

#### 3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'analyse par électrophorèse est basée sur la migration différentielle de particules chargées dans un champ électrique.

Cette analyse se fait sur gel de polyacrylamide 4-12% Bis-Tris Nu-Page (InVitrogen) ou 10% Bis-Tris Nu-Page (inVitrogen). Les échantillons à analyser sont préparés à partir de 10 µl d'extrait protéique et 5 µl de bleu de charge Nu-Page (InVitrogen) additionné de 10 mM de DTT.

Les échantillons sont centrifugés 1 minute, puis dénaturés par chauffage à 100°C au bain-marie pendant 5 minutes et enfin déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide dénaturant (contenant du SDS). Le SDS est un détergent qui rompt les interactions inter et intra-protéiques et qui se fixe à la surface des protéines en les chargeant négativement. La charge propre à chaque protéine devient négligeable et les protéines migrent selon leur taille. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le PageRuler (Fermentas). La migration se fait dans du tampon MES. Après la migration, le gel est rincé à l'eau stérile et coloré au Page-Blue™ Protein Staining Solution (Fermentas) pendant 30 minutes. La décoloration se fait dans l'eau.



**Note:** The apparent molecular size of each protein (kDa) has been determined by calibration against an unstained protein ladder in each electrophoresis condition.

**Figure 3.7 :**  
**apparents des**

**Poids moléculaire**  
**marqueurs**

**PageRuler Plus dans les différents tampons.**

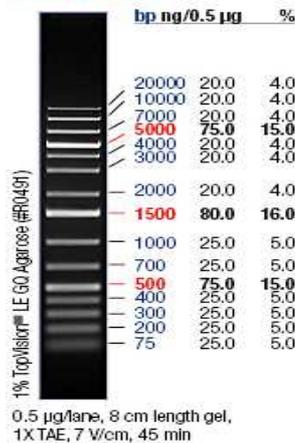
#### 3.2. Analyse des fragments d'ADN générés par PCR



L'ADN obtenu après l'amplification par PCR pour un clonage ou une fusion est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, dans le tampon TAE 1x.

A un volume de solution d'ADN, on ajoute 1/4 de volume de tampon de charge (0.2% de bleu de bromophénol, 0.2 M d'EDTA pH 8.3, 50% glycérol). Le mélange est déposé sur le gel d'agarose, en parallèle avec des marqueurs de taille allant de 75 à 20000 pb (Gene Ruler Fermentas). Après migration dans du tampon TAE pendant 25 minutes environ, le gel est plongé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) afin de révéler l'ADN. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et la fluorescence du complexe formé est révélée sous lumière UV. La comparaison avec les marqueurs de taille permet d'estimer la taille du fragment d'ADN.

**GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder**  
**O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use**



**Figure 3.8: Marqueurs ADN**

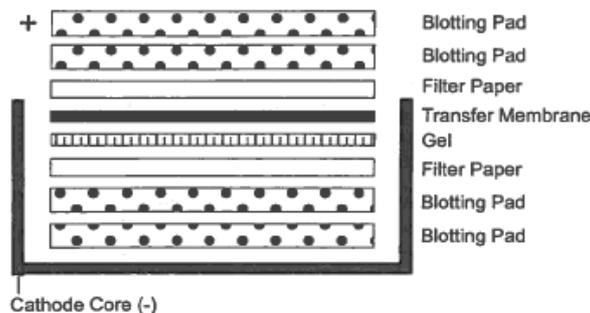
**pour les gels d'agarose**

### 3.3. Analyse

**des**

### protéines par immunoblotting (Western blot)

Pour l'analyse par Western blot, les protéines sont transférées sur une membrane après séparation sur un gel SDS-Page. La calibration de la membrane se fait par l'utilisation du marqueur de masse moléculaire MagicMaker (InVitrogen). Le transfert des protéines du gel vers la membrane PVDF se fait par électroblot à 30 V constants dans un tampon de transfert pendant 45 minutes, comme le montre la figure 3.9 :



**Figure 3.9 :**  
**gel et de la membrane**

**Disposition du**  
**de transfert**



---

### lors d'une Western blot

Après le transfert, la membrane est mise dans 25 ml de solution de blocage 4% en lait en poudre dans TBST (du TBS additionné de Tween), sous agitation pendant 1 heure à 4°C. On plonge ensuite la membrane dans 10 ml de solution de blocage à 2% de lait en poudre dans du TBST et 5 µl d'anticorps primaire anti-6His, sous agitation à 4°C toute la nuit.

Après 3 lavages de 5 minutes dans la solution de blocage 2% sans anticorps, la membrane est mise dans une solution contenant des anticorps secondaires (anticorps de chèvres dressés contre les anticorps de souris) pendant 2 heures sous agitation (15 ml de solution 2% et 2 µl d'anticorps secondaire). La membrane est lavée trois fois au TBST, et les complexes protéine-anticorps fixés sur la membrane sont révélés au transilluminateur UV, dans une chambre noire, grâce à la solution de révélation du kit Lumi-Light Western Blotting Substrate de Roche. L'image est traitée par le logiciel CHEMCAPT.

Il y a une méthode alternative pour détecter les histidines, cette méthode est plus directe, c'est l'emploi d'un colorant, le "Pierce® 6xHis Protein Tag (Thermo Scientific), c'est un colorant fluorescent utilisé pour la détection sur gels de polyacrylamide des protéines de fusion avec des histidines (His-taggé). Avec ce colorant, l'expression de la fusion peut être évaluée directement sur le gel, par exposition du gel aux UV.

### 3.4. Mesure de la concentration en protéines

- Par la méthode de Folin :

Par échantillon à analyser, préparer 4 tubes à essai avec 0,5 ml d'eau distillée et des volumes croissants de l'échantillon de protéine (10, 20, 30 et 40 µl) ainsi que 3 tubes ne contenant que 0,5 ml d'eau ("blancs").

Ajouter dans chaque tube 5 ml du mélange de réaction ABC (100 ml de la solution A + 1 ml de la solution B + 1 ml de la solution C). Vortexer et laisser à température ambiante pendant 10 minutes. Ajouter ensuite dans chaque tube 0,5 ml de solution D. Vortexer et laisser à température ambiante pendant 20 minutes.

Lire la DO à 660 nm et convertir cette  $DO_{660}$  en concentration de protéine grâce à une courbe étalon établie avec de la serum albumine bovine (BSA).

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- Folin A : 30 g de  $Na_2CO_3$ , 4 g de NaOH pour 1 litre.
- Folin B : 40 g de Na-K Tartrate pour 1 litre.
- Folin C : 20 g de  $CuSO_4$  pour 1 litre.
- Folin D : Réactif de Folin-Ciocalteu (BDH) dilué 3x dans de l'eau.

- Par la mesure de l'absorbance à 280 nm :

La mesure de la concentration en protéine d'échantillons purifiés se fait par mesure de l'absorbance à 280 nm lue sur un spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (Isogen Life Science).



**Figure 3.10 : Mettre**

**support de mesure avec une pipette**

**l'échantillon sur le**

Connaissant le coefficient d'extinction molaire de la protéine contenue dans l'échantillon, on peut alors calculer la concentration selon la loi de Beer Lambert, qui s'exprime ainsi :

$$A_{280} = \epsilon_{\text{prot}} \times l \times C$$

C : la concentration molaire de la solution (en mol.L<sup>-1</sup>).

L : la longueur du trajet optique dans la solution traversée, elle correspond à l'épaisseur de la cuvette utilisée (= 1cm).

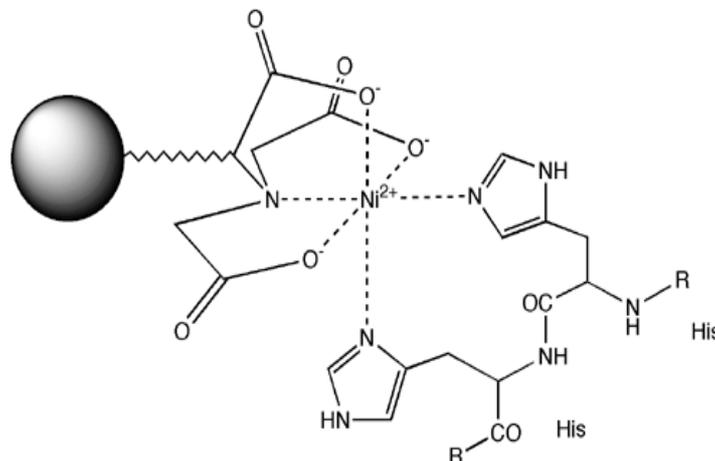
$\epsilon_{\text{prot}}$  : l'absorptivité molaire (coefficient d'extinction molaire), exprimée par mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

- Tm1752 = 100630 mole<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>
- BDI\_3087 = 15150 mole<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

### 3.5. Chromatographies d'affinité

#### 3.5.1. Sur colonne chélatée au Ni<sup>2+</sup>

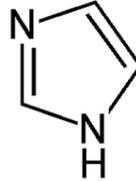
Les protéines avec étiquette 6-His sont purifiées par chromatographie IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Ce type de chromatographie d'affinité fait appel à l'immobilisation, sur une résine, d'un atome métallique comme le nickel ou le cobalt. Cet atome immobilisé peut établir des liens de coordination avec certains acides aminés, en particulier les histidines. L'étiquette hexahistidine (6-His) est ajoutée aux protéines pour que ces dernières puissent être purifiées par chromatographie d'affinité pour le métal.





### **Figure 3.11 : coordination du Ni<sup>2+</sup> avec NTA et l'histidine.**

La technique d'élution la plus usuelle est d'utiliser un composé qui entre en compétition avec les histidines de l'étiquette : l'imidazole (Figure 3.12).



**Figure 3.12 : Molécule d'imidazole**

La colonne de sépharose CL6B chélatante conditionnée au Ni<sup>2+</sup> est d'abord rincée à l'H<sub>2</sub>O milliQ stérile puis conditionnée avec le tampon d'extraction des protéines à séparer. L'extrait protéique est chargé, la colonne est lavée avec du tampon additionné de 20 mM d'imidazole pour éviter les interactions aspécifiques.

Ensuite, les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un gradient de concentration en imidazole de 20 à 250 mM.

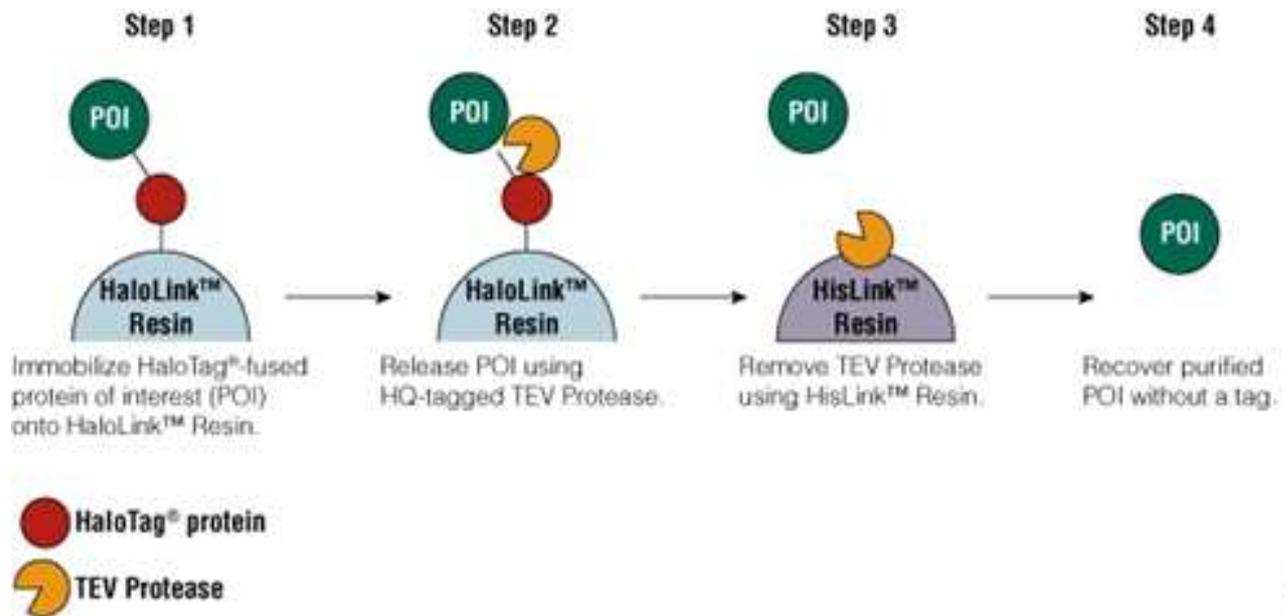
La concentration protéique des fractions collectées est mesurée par spectrophotométrie (absorbance à 280 nm). Elles sont ensuite analysées par électrophorèse (analyse SDS-PAGE). Les fractions contenant la protéine pure sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur des cellules Vivaspin (Sartorius Stedim Biotech).

### **3.5.2. Sur résine HaloLink™ (Promega)**

Cette résine permet la fixation covalente et l'orientation de protéine HaloTag de fusion sur une surface solide. La résine est constituée d'un ligand l'halogénase lié à des billes de Sépharose. Ce ligand se lie spécifiquement et rapidement de façon covalente à la partie Halo des protéines de fusion Halo. La résine HaloLink™ dispose d'une capacité de liaison élevée. En raison de la liaison covalente, la protéine de fusion HaloTag ne peut être éluée de la résine, ce qui permet un lavage pour éliminer les protéines non spécifiquement liées, sans risque de "décrocher" les protéines de fusion Halo.

La protéine HaloTag est une halogénase modifiée qui se fixe de manière covalente à la résine HaloLink™ via un chloroalcane ligand de l'halogénase immobilisé. Grâce au site de reconnaissance de la protéase TEV entre la protéine cible de la protéine Halo, la protéine d'intérêt peut être clivée de l'Halo qui reste liée à la résine™ HaloLink. Ensuite, la protéase TEV, utilisée qui a une étiquette 6His N-terminal, est éliminée par accrochage sur une résine IMAC.

Les étapes de la purification sont les suivantes :



**Figure 3.13 : Purification des protéines fusionnées à l'HaloTag sur résine HaloLink**

Solution de clivage :  
- 1,1 ml de tampon HEPES  
- 60 µl de ProTEV plus (Promega).

Pour effectuer cette purification, il faut premièrement conditionner la résine, c'est-à-dire l'équilibrer dans le tampon (Hepes 25 mM NaCl 150 mM pH 7.4) de l'extrait cellulaire. Pour cela on centrifuge 2 ml de résine HaloLink<sup>™</sup> à 7000 rpm pendant 5 minutes. Ensuite on ajoute au culot 5 ml de tampon HEPES et on centrifuge à 7000 rpm pendant 5 minutes. Cette opération est répétée 2 fois, pour conditionner la résine.

Deuxièmement, on ajoute 2,5 ml de la fraction soluble de l'extrait cellulaire à la résine. Le mélange est laissé sous forte agitation toute la nuit. Ensuite on centrifuge à 7000 rpm pendant 5 minutes et on garde le surnageant, qu'on notera FT (flow through).

La troisième étape est le lavage de la résine, avec 5 ml de tampon d'extraction. Ensuite on centrifuge à 7000 rpm pendant 5 minutes. Cette opération est répétée 3 fois. On obtient W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> (wash 1, wash 2, wash 3).

La dernière étape est le clivage et l'éluat de la protéine d'intérêt. On ajoute 0,5 ml de solution contenant 66 µl de TEV protease dans 1,1 ml de tampon HEPES. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 1 heure sous forte agitation. Après centrifugation à 7000 rpm pendant 5 minutes, on obtient le surnageant E<sub>1</sub> (éluat 1). On rajoute 0.5 ml de tampon HEPES et on centrifuge dans les mêmes conditions, on obtient ainsi le surnageant E<sub>2</sub> (éluat 2).

Les fractions FT, les Wash 1, Wash 2, Wash 3, éluat 1 et éluat 2 sont portées sur gel pour faire une analyse par électrophorèse des protéines présentes.

### **3.6. Concentration des protéines purifiées par ultrafiltration**



Le concentrateur à centrifuger Vivaspin est une unité d'ultrafiltration pour la concentration d'échantillons biologiques. On l'utilise dans les rotors à angle fixe acceptant des tubes de 50 ml. La conception verticale de la membrane et la chambre mince de filtration multicanaux, diminuent le colmatage de la membrane. Un rendement de concentration > 90% est aisément atteint en moins de 30 min. On choisit une membrane avec une taille de pores inférieure à la taille de la protéine à concentrer.

Après la chromatographie, on rassemble les fractions contenant la protéine pure. L'échantillon est mis dans l'unité de concentration, on centrifuge à 3000 g pendant 30 minutes, ce qui permet de concentrer environ 100 fois.

### 3.7. Dosage colorimétrique de l'activité endoglucanase

L'activité endoglucanase est mise en évidence en utilisant la carboxyméthyl cellulose (CMC), dérivé soluble de la cellulose, comme substrat. L'activité est déterminée par le dosage colorimétrique des sucres réducteurs produits à partir de la CMC, selon Ghose, 1987.

Pour commencer, on ajoute à chaque échantillon contenu dans 0,5 ml de tampon citrate 50 mM à pH 5.2, 0,5 ml de CMC (2% dans l'eau). Le mélange réactionnel est placé dans un bain-marie à 60°C pendant 1 heure. Ensuite on ajoute 3 ml de DNS (1416 ml d'eau stérile, 10.6 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique et 19.8 g de NaOH, dissoudre, puis ajouter 306 g de Tartrate de NaK, 7.6 ml de Phénol et 8.3 g de Na métabisulfite) à chaque échantillon qui est vortexé et mis dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes.

Après refroidissement à température ambiante, et l'ajout de 20 ml d'eau à chacun des échantillons, la densité optique est lue à 540 nm contre un blanc réalisé dans les mêmes conditions, sans enzyme. La quantité de sucres est estimée par rapport à une courbe étalon (Figures 3.14 et 3.15) réalisée avec des quantités croissantes de glucose (Sigma). Ce dosage convient pour des concentrations en sucres comprises entre 0,1 et 1 mg/ml.

#### ★ Dilutions utilisées pour établir la courbe standard:

Solution stock non diluée	= glucose 2 mg/ml dans du tampon citrate pH 5.2.
1 : 1,5	= 1 ml de glucose 2 mg/ml + 0,5 ml de citrate pH 5.2
1 : 2	= 1 ml de glucose 2 mg/ml + 1 ml de citrate pH 5.2
1 : 4	= 0,5 ml de glucose 2 mg/ml + 1,5 ml de citrate pH 5.2

La mesure du standard nous permet de tracer une courbe grâce à laquelle on peut déterminer la quantité de glucose produite (en mg) en fonction de l'absorbance à 540 nm.

	<b>Mg de Glucose /0,5 ml</b>	<b>Moyenne des DO à 540 nm</b>
<b>Undiluted S<sub>1</sub></b>	1	0.644
<b>1 : 1,5</b>	0.67	0.378

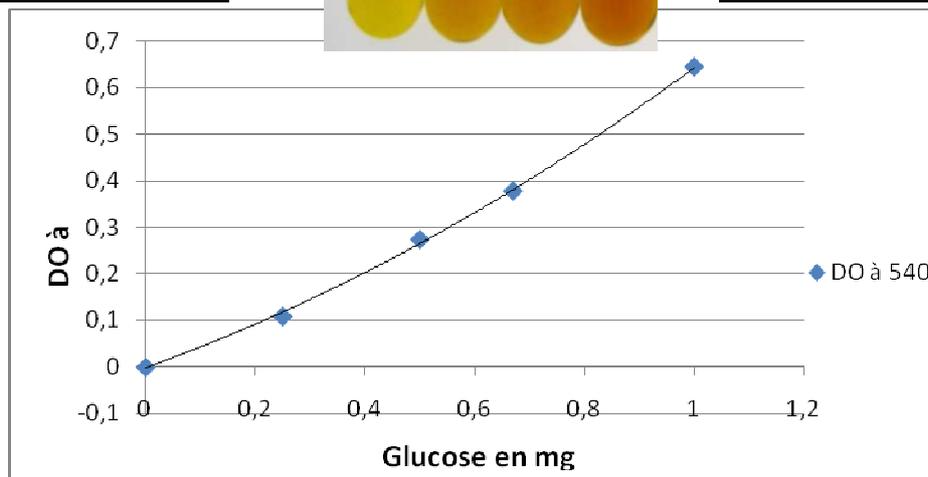
$S_2$		
1 : 2	0.5	0.274
$S_3$		
1 : 4	0.25	0.109
$S_4$		

**Tableau 3.2 : DO à 540 nm des prises de standard et la quantité correspondante de glucose**



**Figure 3.14 : Photos des dosages**

**standards utilisés pour le dosage**



**colorimétrique des sucres réducteurs**

**Figure 3.15 : Courbe Standard du dosage colorimétrique du glucose**

★ CMC :

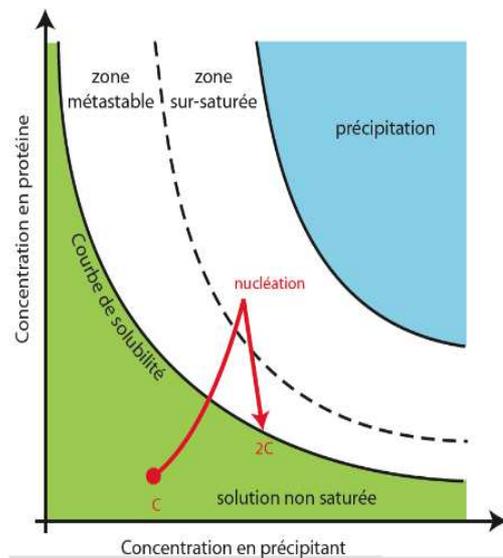
Pour cette solution, on ajoute 2g de carboxyméthyl cellulose CMC 7L2 à 100 ml d'eau purifiée.

### 3.8. Cristallogénèse et cristallographie

#### 3.8.1. Principe

Le but de la cristallogénèse est l'obtention d'un cristal de la protéine d'intérêt. La diffraction des rayons X par le cristal obtenu donne des informations sur la structure tridimensionnelle de la molécule.

La cristallisation d'une protéine nécessite de passer d'un état, dans laquelle la protéine est soluble, à un état solide et ordonné. Ce phénomène physique correspond à une séparation de phases. La cristallisation d'une protéine est influencée par différents facteurs comme sa pureté et sa stabilité, sa concentration, la nature et la concentration de l'agent précipitant, le pH, les additifs...(Fig. 3.16)

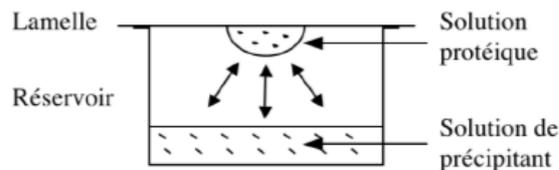


**Figure 3.16 : diagramme protéine en fonction de la précipitant. Pour obtenir la**

**de solubilité d'une concentration en agent cristallisation, on se**

**déplace de  $c$  vers  $2c$**

Les méthodes de cristallogénèse la plus utilisée est par diffusion de vapeur en goutte suspendue (Figure 3.17) :



**Figure 3.17 :**

**méthode par diffusion de vapeur, en goutte suspendue**



Une solution protéique est diluée dans la solution de cristallisation pour former une goutte de faible volume (environ 2  $\mu$ l). La lamelle sur laquelle est déposée la goutte est mise au dessus d'un réservoir contenant 0,5 ml de la même solution de cristallisation. La goutte s'équilibre dans cet espace hermétique.

Le volume du réservoir est beaucoup plus important que celui de la goutte. La sursaturation en protéine dans la goutte est atteinte par diffusion des espèces volatiles du milieu le moins concentré (la goutte) vers le milieu le plus concentré (le réservoir).

### **3.8.2. Ensemencement ou « Seeding »**

La cristallisation est un processus à deux étapes : d'abord la nucléation où les molécules de protéines forment un germe cristallin puis la croissance où les protéines viennent s'organiser autour de ce germe, couche par couche et provoquent ainsi la croissance du cristal.

Parfois, les conditions testées ne permettent pas de déclencher la cristallisation de la protéine. Cela ne veut pas dire pour autant que ces conditions ne conviennent pas à la croissance des cristaux. Une possibilité est donc de rajouter des germes cristallins dans la goutte équilibrée ce qui permet aux protéines de s'organiser autour de ceux-ci et de croître si les conditions le permettent : cette méthode est appelée « ensemencement » (ou « seeding »).

Dans le « self-seeding », les noyaux sont composés de la même protéine que celle contenue dans la goutte. Cette technique permet de mieux contrôler la qualité des cristaux obtenus précédemment en limitant la cristallisation à une seule étape.

## **Chapitre IV : Résultats**

### **1. Essais de production de la protéine CopG native**

#### **1.1. Le vecteur d'expression**

Le vecteur d'expression utilisé est le pET30, c'est un système pET qui est l'un des systèmes les plus puissants développés pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli*.



Les gènes cibles sont clonés dans les plasmides pET sous le contrôle du promoteur fort du bactériophage T7, dont l'expression dépend de la production de l'ARN polymérase du phage T7 par la cellule hôte.

## 1.2. Stratégie

Les plasmides d'expression ont été construits en clonant le gène *copG*, amplifié à partir de l'ADN génomique de *C. metallidurans* CH34, dans le vecteur pET30 (comme décrit dans le Chapitre III : Matériels et Méthodes) de sorte à intégrer ou non une étiquette 6His C-terminale au gène *copG*. Les vecteurs d'expression ont été introduits dans les souches d'*E.coli* HMS174 et KRX par transformation. Après induction par l'IPTG pour HMS174, ou par le rhamnose pour KRX, La production de la protéine CopG a été testée.

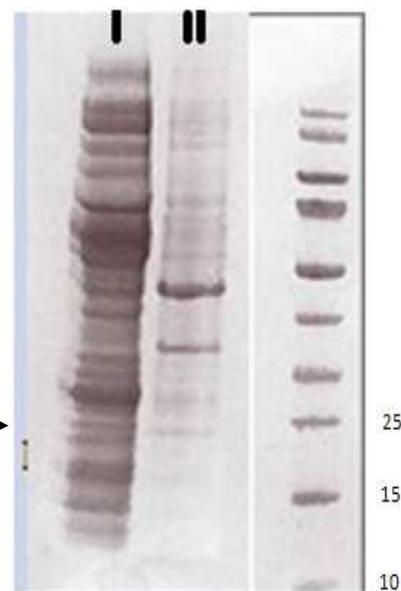
## 1.3. Analyse de la production

- **Expression de *copG* avec ou sans étiquette 6His dans HMS174 :**

HMS174 (DE3) porte une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase du phage T7 sous contrôle du promoteur lacUV5, qui est inductible à l'IPTG.

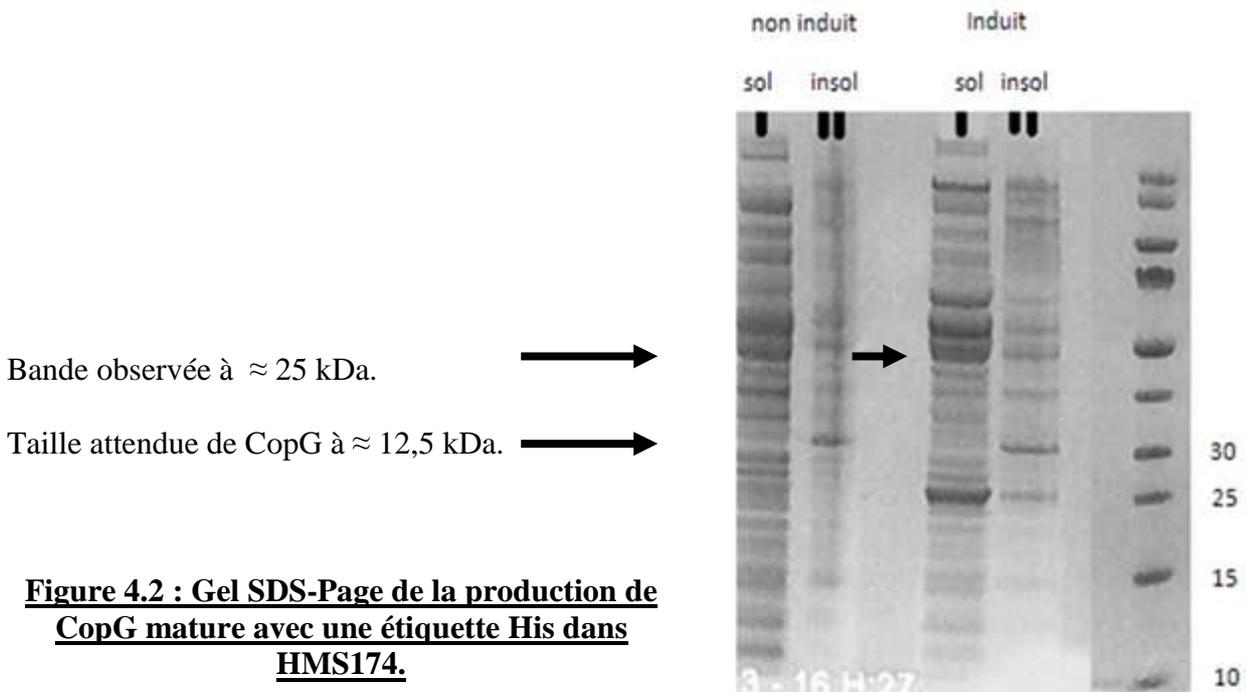
L'expression de CopG est induite par la production de l'ARN polymérase du phage T7 dans la cellule hôte. Les extraits cellulaires analysés sur gel sont obtenus après traitement aux ultrasons et centrifugation pour séparer la fraction soluble de la fraction insoluble. Les gels réalisés n'ont pas révélé la production d'une protéine de la masse attendue pour CopG (avec ou sans étiquette 6His en C-terminal), c'est-à-dire 12,5 kDa :

Taille attendue pour CopG à  $\approx 12,5$  KDa.  $\longrightarrow$



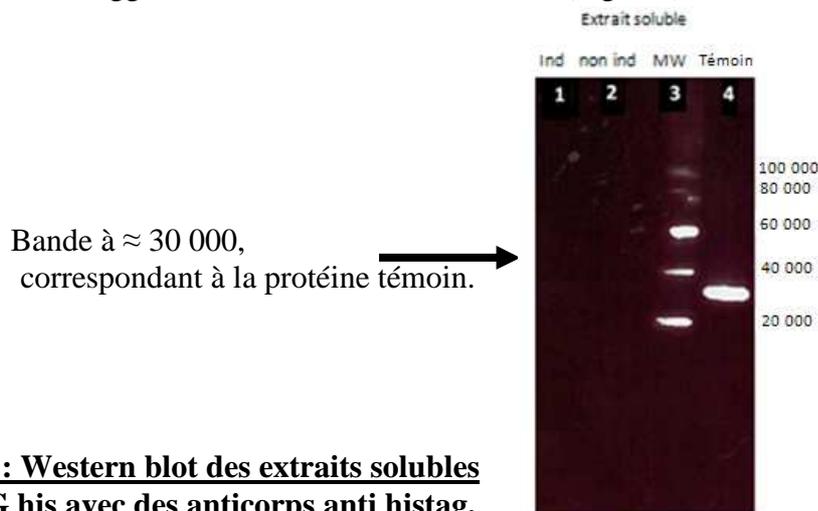
**Figure 4.1 : Gel SDS-Page de la production de CopG mature sans étiquette Histidine dans HMS174.**

***(I) Fraction soluble ; (II) Fraction insoluble***



**Figure 4.2 : Gel SDS-Page de la production de CopG mature avec une étiquette His dans HMS174.**

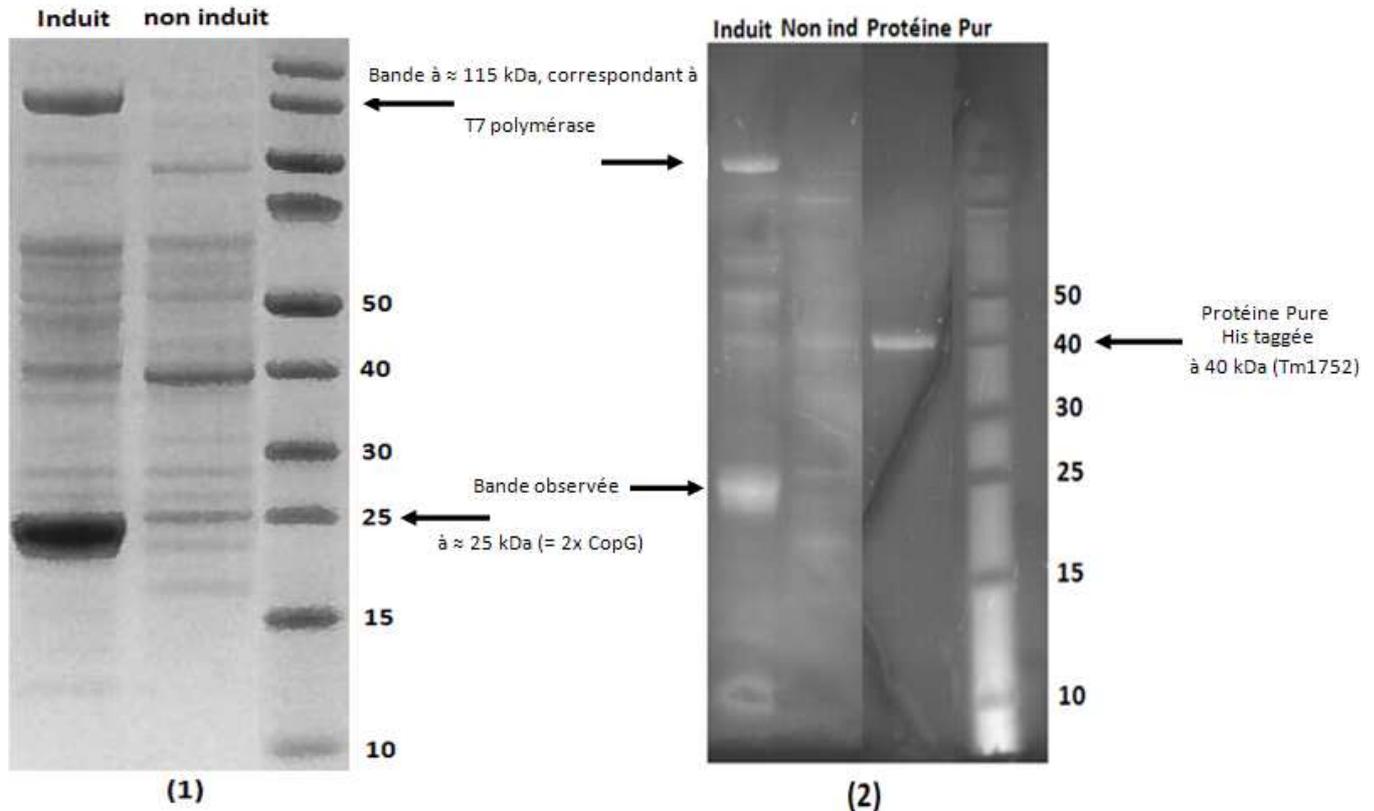
Dans le cas de la protéine his-taguée, on observe l'apparition d'une bande importante aux environs de 25 kDa après induction, mais pas à 12.5 kDa, comme attendu. La bande à 25 kDa pourrait correspondre à un dimère de CopG (2 x 12.5 kDa). Pour tester cette hypothèse, on a effectué une analyse par Western Blot sur ce gel avec des anticorps anti-His tag ; aucune protéine His taguée n'a été détectée dans l'extrait (Fig. 4.3) :



**Figure 4.3 : Western blot des extraits solubles pET30 copG his avec des anticorps anti histag. induit ; (3) Marqueur de masse moléculaire MagicMaker ; (4) Protéine His-taguée témoin**

**de HMS174  
(1) Induit ; (2) Non**

Vu qu'il est possible que le Histag C-terminal ne soit pas accessible aux anticorps, nous avons également effectué une coloration directe des His-tags sur gel SDS (Pierce).



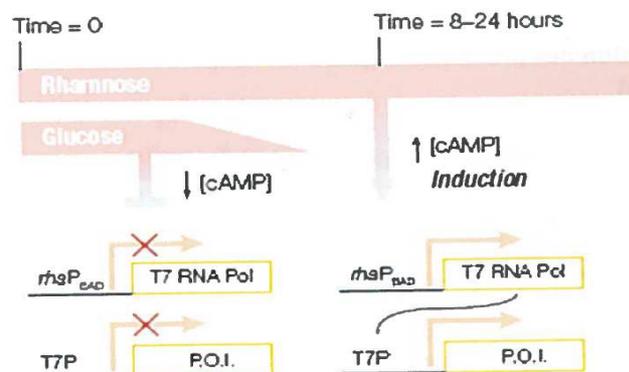
**Figure 4.4 : Gels SDS-Page de la fraction soluble d'un extrait induit et non induit de CopG mature avec une étiquette His dans HMS174. (1) Dans le bleu de Coomassie ; (2) dans le colorant pour les His Tag (Pierce)**

Après coloration dans le colorant Histag, on voit apparaître de nombreuses protéines révélées au bleu de Coomassie, ce qui indique que la coloration HisTag est peu spécifique.

• **Production de CopG avec ou sans étiquette 6His dans KRX :**

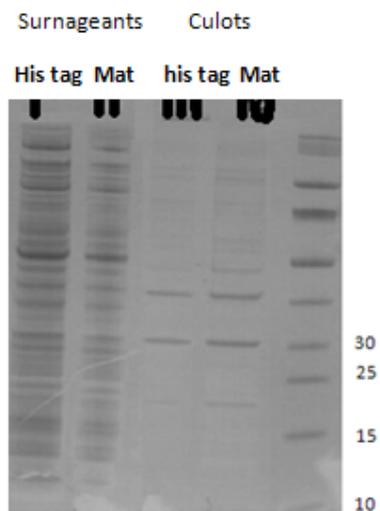
KRX est une souche d'*E.coli* K<sub>12</sub> qui contient une copie chromosomique du gène de la T7 ARN polymérase étroitement régulé par un promoteur rhamnose (*rhaP<sub>BAD</sub>*). Le promoteur *rhaP<sub>BAD</sub>* est soumis à la répression catabolique par le glucose.

La présence du rhamnose active le promoteur et l'expression de l'ARN polymérase du phage T7 permet la transcription du gène codant pour la protéine recombinante (P.O.I. : Protein Of Interest), mais uniquement lorsque le glucose présent dans le milieu de culture est totalement consommé par la croissance bactérienne. Avant induction, l'expression de la protéine recombinante, qui est sous le contrôle d'un promoteur T7, est exceptionnellement faible, comme le montre la figure :



**Figure 4.5 : Auto-induction de l'expression de CopG dans la souche KRX.**

Pour l'expression de CopG dans la souche KRX, on a testé différentes conditions d'induction (voir Matériel et Méthodes) et différents temps d'incubation : 7h30, 11h, 24h. Les résultats obtenus en condition « early » après 24h d'incubation sont illustrés sur la figure 4.6.



Bande attendue pour CopG à  $\approx 12,5$  kDa.  $\longrightarrow$

**Figure 4.6 : Gel SDS-Page de la production de CopG mature avec et sans Tag His dans KRX.**

**(I) Fraction soluble de CopG His ; (II) Fraction soluble de CopG mature ; (III) Fraction insoluble de CopG His, (IV) Fraction insoluble de CopG mature**

La bande attendue à 12.5 kDa correspondant à CopG n'est pas observée sur le gel.

## **2. Production de la protéine CopG en fusion**

Nous avons effectué de nouvelles constructions où CopG est fusionné à d'autres protéines, cette démarche a été envisagée pour les avantages qu'elle présente (Tagu and Moussard, 2003). En effet, souvent :

- La stabilité de la protéine de fusion est meilleure que celle de la protéine simple
- Sa solubilité est accrue.
- Sa purification est facilitée

Il existe plusieurs vecteurs commerciaux permettant la construction de fusions (avec le maltose binding protein, la GST, ...). Nous disposons au laboratoire de vecteurs permettant de réaliser des fusions avec une halogénase modifiée (HaloTag®), ce qui facilite grandement la purification de la protéine d'intérêt.



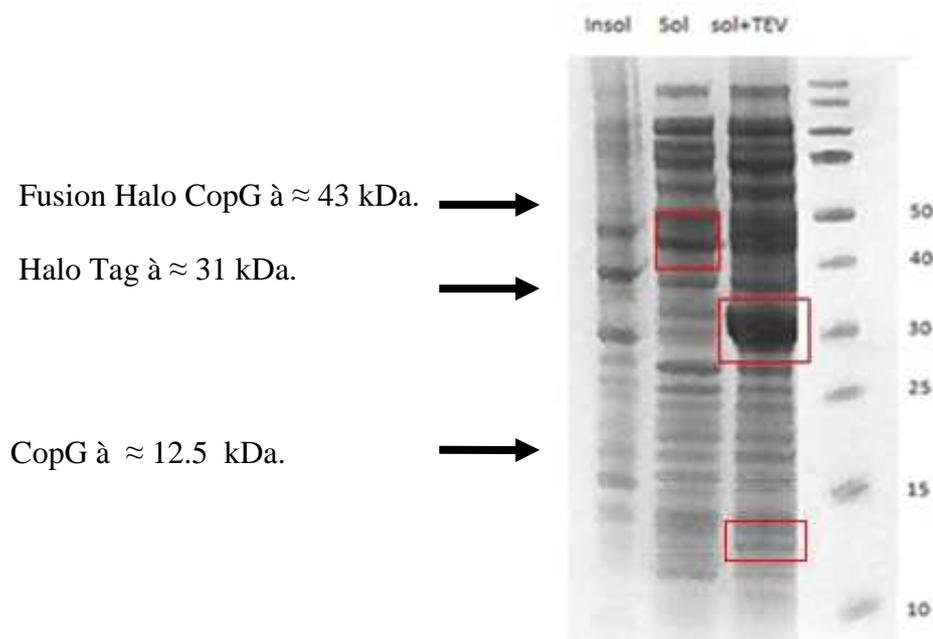
## 2.1. En fusion avec un tag Halo en N-terminal

Le vecteur HaloTag pFN18A<sup>®</sup> est configuré pour ajouter l'étiquette Halo<sup>®</sup> (halogénase modifiée) à l'extrémité amino-terminale de la protéine d'intérêt. Il permet l'expression de la protéine fusion sous la dépendance de l'ARN polymérase T7. L'étiquette Halo est une halogénase modifiée qui a la particularité de former des liaisons covalentes avec ses ligands ce qui permet l'immobilisation des protéines fusion sur la résine Halolink<sup>®</sup> sur laquelle ligand est fixé, ce qui facilite sa purification (Ohana *et al.*, 2009).

La construction du plasmide d'expression a été réalisée par clonage du gène *copG* amplifié, à partir de l'ADN génomique de *C. metallidurans* CH34, dans le vecteur pFN18A.

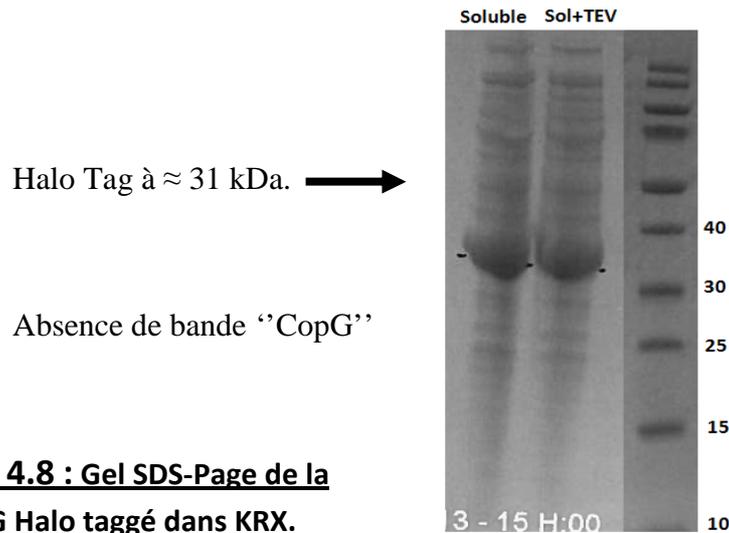
La production de la protéine correspondante a été analysée dans la souche KRX après induction par le rhamnose. Les fractions solubles et insolubles de l'extrait cellulaire sont analysées par électrophorèse sur gel SDS. On observe la production de la fusion Halo-CopG à  $\approx 43$  kDa ( $31 + 12.5$  kDa) (Figure 4.7).

La protéase TEV clive la protéine fusion entre l'étiquette Halo et la protéine d'intérêt. Après addition de la protéase TEV à la fraction soluble de l'extrait cellulaire on observe l'apparition d'une bande importante à 31 kDa qui correspond l'étiquette Halo. On ne voit pas cependant apparaître en parallèle de bande importante à 12.5 kDa, taille attendue de CopG (Figure 4.7).



**Figure 4.7 : gel SDS-Page de surexpression de CopG Halo taggé dans KRX lors du clivage par la TEV.**

Après plusieurs semaines, le même extrait a été à nouveau analysé sur gel et on remarque que la fusion Halo CopG est instable car la bande correspondante à cette dernière a été dégradée, en donnant naissance à une bande de 31 kDa, correspondant à l'halogénase. Comme il n'apparaît pas de bande nette à 12.5 kDa (taille correspondant à CopG), la partie CopG de la protéine fusion a vraisemblablement été dégradée (protéolysée).

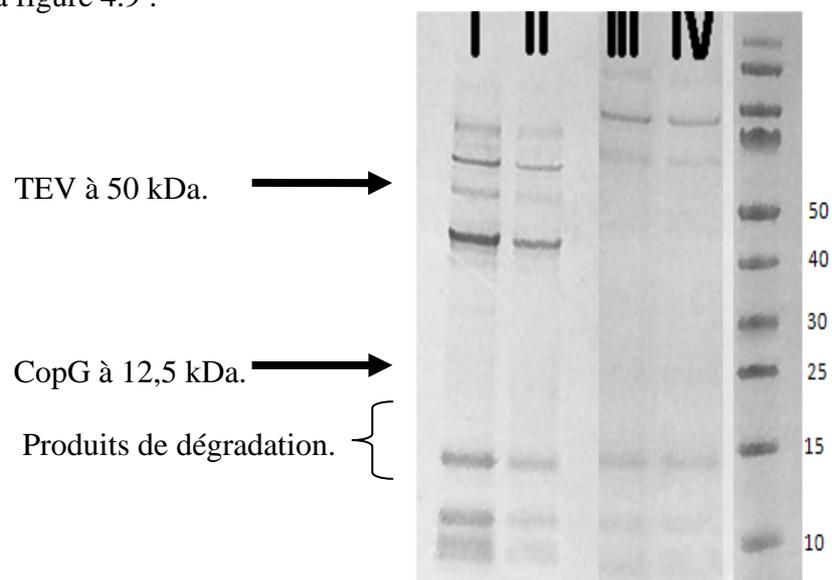


**Figure 4.8 : Gel SDS-Page de la CopG Halo taggé dans KRX.**

**production de**

**(I) Extrait soluble ; (II) Extrait soluble traité à la TEV protéase**

La purification de la protéine CopG en fusion avec Halo a été réalisée sur résine Halolink en "batch" (voir Chapitre III : Matériels et Méthodes). Cette purification a permis de mettre en évidence une bande à 12.5 kDa (CopG) après clivage par la TEV. Cependant la quantité de CopG diminue considérablement après élimination de la TEV (qui est His Taggée) sur résine chélatée au  $Ni^{2+}$ , comme on le voit sur la figure 4.9 :





**Figure 4.9 : Gel SDS-Page des différentes étapes de purification par Batch method de CopG halo taggé dans KRX avant (à gauche : I et II) et après (à droite : III et IV) élimination de la protéase TEV par une résine chélatée au Ni<sup>2+</sup>**

Après élimination de la protéase TEV, on remarque que la concentration de CopG diminue considérablement. Cette observation pourrait indiquer que CopG est retenu sur la résine chélatée au Ni<sup>2+</sup>.

## 2.2. En fusion avec un tag Halo en C-terminal

Le vecteur HaloTag pFC20K ® est configuré pour ajouter l'étiquette Halo® à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine d'intérêt et permet l'expression de cette protéine sous la dépendance de l'ARN polymérase du phage T7.

La construction du plasmide d'expression a été réalisée par clonage du gène *copG* amplifié, à partir de l'ADN génomique de *C. metallidurans* CH34, dans le vecteur pFC20K, où le tag Halo est en position C-terminale. La protéine fusion correspondante n'a pas pu être produite dans la souche KRX.

## 2.3. En fusion avec la protéine Tm1752

### 2.3.1. La protéine Tm1752

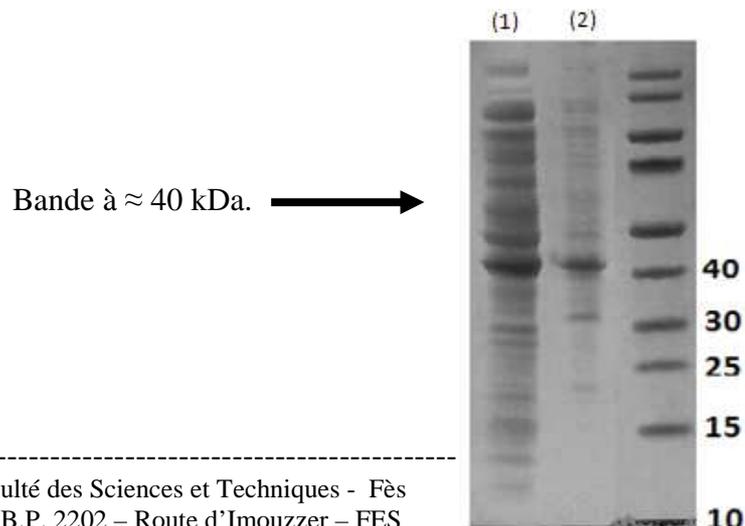
La production de CopG dans les constructions précédentes n'ayant pas été jugée suffisante pour sa caractérisation, de nouvelles fusions ont été envisagées. La première est une fusion avec la protéine Tm1752, de masse moléculaire de 39 kDa, qui est prédite être une endoglucanase de *Thermoloba maritima*. Cette activité enzymatique supposée devrait permettre de suivre son activité par dosage colorimétrique.

Dans le cadre d'un projet général de détermination de structure 3D, la protéine Tm1752 (His taggé en N-terminal) a été produite et sa structure déterminée (PDB 1VJZ).

Ceci devrait nous permettre d'utiliser la méthode de remplacement moléculaire pour résoudre la structure de la protéine d'intérêt fusionnée.

La production de la protéine Tm1752 a été examinée dans la souche KRX (Fig. 4.10)

On observe après induction une bande à environ 40 kDa, ce qui correspond à la taille attendue de la protéine Tm1752. La plus grande partie de la protéine se trouve dans la fraction soluble.





**Figure 4.10 : Gel SDS-Page de production de la protéine Tm1752 dans KRX. (I) Fraction soluble ; (II) Fraction insoluble.**

La protéine Tm1752 est annotée comme “endoglucanase” sur base de son homologie avec d’autres protéines dans les banques de données. Cette activité n’a cependant jamais été confirmée expérimentalement.

L’activité endoglucanase de l’extrait cellulaire contenant la protéine Tm1752 a donc été testée par un dosage colorimétrique.

	<b>Extrait cellulaire de KRAX (pMH4 : Tm1752)</b>	
	<b>Induit</b>	<b>Non induit</b>
<b>Quantité de Glucose produit en mg/ml d’extrait</b>	4.6 mg/ml	0.11 mg/ml
<b>Concentration en protéine dans l’extrait</b>	3.3 mg/ml	5.6 mg/ml
<b>Activité Spécifique</b>	1.40 mg glucose/mg protéine	0.02 mg glucose/mg protéine

**Tableau 4.1 : Mesure de l’activité endoglucanase dans l’extrait cellulaire contenant la protéine Tm1752.**

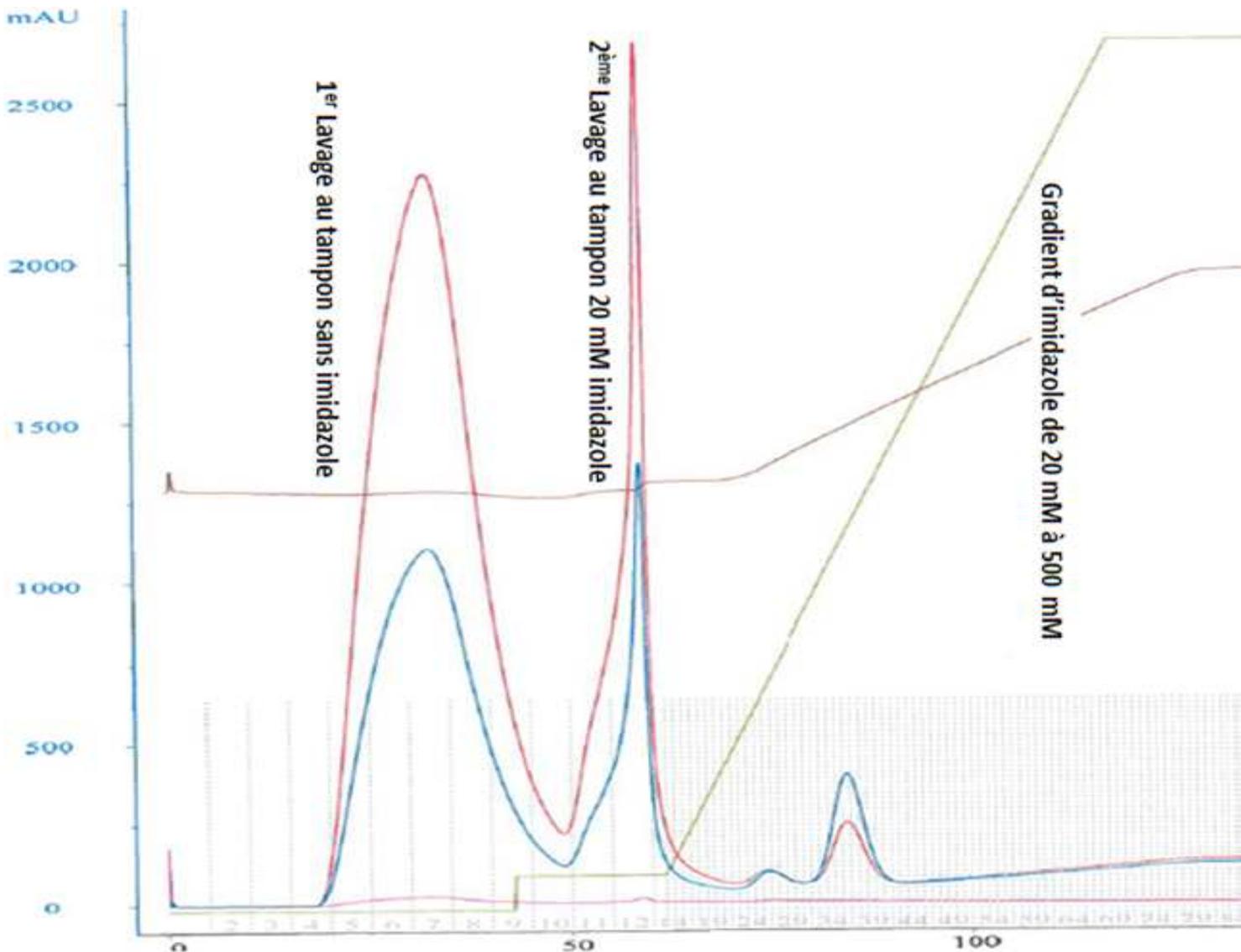
Cette colorimétrie permet de mesurer la quantité de sucres réducteurs produits par action de l’endoglucanase sur la carboxy-méthylcellulose, un de ses substrats.

Suite à ce dosage on peut confirmer que la protéine Tm1752 a bien une activité endoglucanase. On mesure dans l'extrait induit 70 fois plus d'activité spécifique que dans l'extrait non induit (tableau 4.1.).

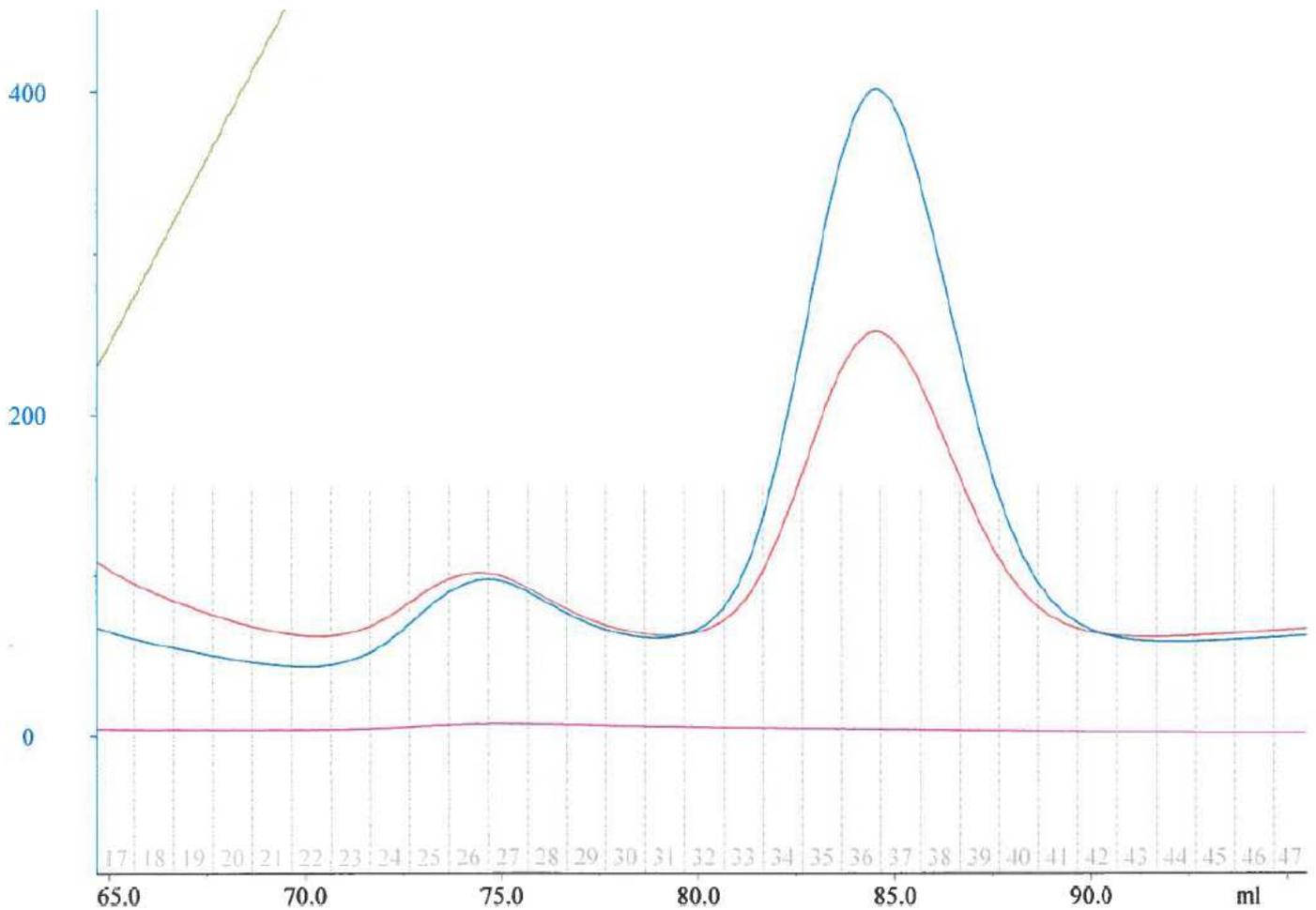
### 2.3.2. Purification et caractérisation de la protéine Tm1752

Une étiquette 6-histidine est présente en N-terminal de Tm1752, elle permet sa purification par chromatographie d'affinité IMAC.

La purification de la protéine Tm1752 a donc été faite par chromatographie d'affinité  $\text{Ni}^{2+}$ .



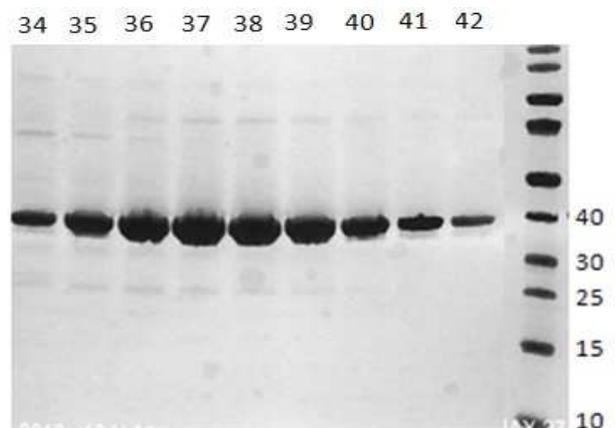
**Figure 4.11 : Chromatogramme sur colonne  $\text{Ni}^{2+}$  sépharose de la purification de la protéine Tm1752.**



**Figure 4.12 : Agrandissement du chromatogramme de la figure 4.9 de la fraction 17 à 47, élution par gradient d'imidazole de 20 mM à 500 mM.**

Les fractions de 34 à 42, qui correspondent au 2<sup>ème</sup> pic élué au cours du gradient d'imidazole, ont été analysées sur gel et montre toute une bande à  $\approx 40$  kDa

Bande à  $\approx 40$  kDa correspondant à Tm1752. →



**Figure 4.13 : Gel SDS-Page des fractions éluées de la colonne Ni<sup>2+</sup> sépharose contenant la protéine Tm1752**

On a ensuite mesuré l'activité endoglucanase de chaque fraction du pic d'éluion de la protéine Tm1752. L'activité spécifique est mesurée en mg de glucose/mg de protéine et nous permet de déterminer que c'est la fraction 40 qui est la plus pure.

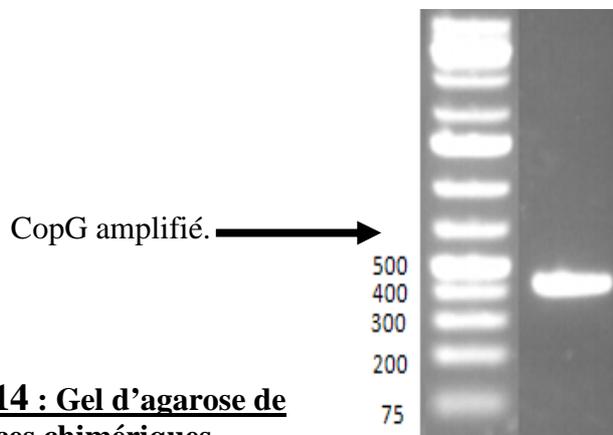
	<b>F 34</b>	<b>F 35</b>	<b>F 36</b>	<b>F 37</b>	<b>F 38</b>	<b>F 39</b>	<b>F 40</b>
<b>Quantité de glucose produite/ ml</b>	0.75 mg	1.55 mg	2.4 mg	3.25 mg	2.9 mg	3.6 mg	2.2 mg
<b>Concentration en protéine</b>	0.3 mg/ml	0.64 mg/ml	1.02 mg/ml	1.31 mg/ml	1.21 mg/ml	1.00 mg/ml	0.5 mg/ml
<b>Activité Spécifique</b>	<b>2.5</b>	<b>2.42</b>	<b>2.35</b>	<b>2.48</b>	<b>2.39</b>	<b>2.47</b>	<b>3.9</b>

**Tableau 4.2 : Mesure de l'activité spécifique des fractions F34 à F42**

La mesure de l'activité spécifique de la fraction la plus pure (la fraction 40) permet de déterminer que l'extrait de départ contenait environ 36% de la protéine Tm1752, ce qui est en concordance avec ce qui est observé sur le gel 4.8.

### **2.3.3. Construction d'une fusion Tm1752 : CopG**

Cette construction est réalisée par "Overlap PCR" (Voir Chapitre III : Matériel et méthodes). En premier lieu on amplifie le gène *copG* avec des amorces chimériques, afin qu'il ait des extrémités homologues au point d'insertion dans le plasmide cible (Figure 4.12). Chaque brin de l'amplicon de cette première PCR est ensuite utilisé comme amorce pour une deuxième PCR (la PCR de chevauchement), pour obtenir la fusion de CopG avec le pMH4 : Tm1752 qui sert de matrice (voir Chapitre III : Matériels et méthodes).

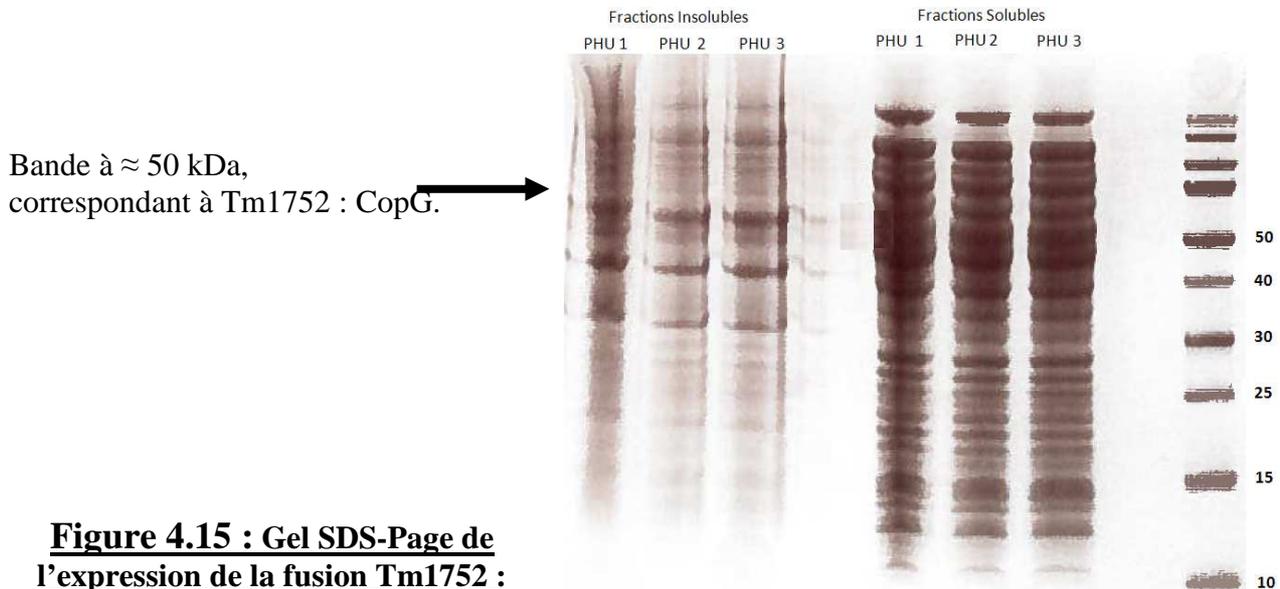


**Figure 4.14 : Gel d'agarose de  
amorces chimériques**

**l'amplification de *copG* avec les**

Suite à cette deuxième amplification et à l'élimination du plasmide parent, on obtient une fusion pMH4 : Tm1752 : CopG, qui est vérifiée par séquençage.

L'expression de la fusion pMH4 : Tm1752 : CopG, nommée PHU a été faite dans la souche KRX :



**Figure 4.15 : Gel SDS-Page de l'expression de la fusion Tm1752 : CopG dans KRX, en condition early**

**après 20h**

Après production de la protéine fusion dans la souche KRX induite, on obtient un extrait cellulaire sur lequel on réalise un dosage colorimétrique pour voir si la protéine fusion Tm1752 : CopG (PHU) montre une activité endoglucanase:

	<b>PHU</b>		<b>Tm1752 induit</b>
	<b>Induit</b>	<b>Non induit</b>	
<b>Quantité de glucose produit en mg/par ml d'extrait</b>	2.66 <i>mg/ml</i>	0.2 <i>mg/ml</i>	4.6 <i>mg/ml</i>
<b>Concentration en protéine de l'extrait</b>	9 <i>mg/ml</i>	13.5 <i>mg/ml</i>	3.3 <i>mg/ml</i>
<b>Activité Spécifique</b>	<i>0.29</i> <i>mg glucose/mg protéine</i>	<i>0.015</i> <i>mg glucose/mg protéine</i>	<i>1.40</i> <i>mg glucose/mg</i>



			<i>protéine</i>
--	--	--	-----------------

**Tableau 4.3 : Mesure de l'activité spécifique de la fusion.**

La mesure de l'activité spécifique, montre qu'elle n'est que d'environ 20% de celle de l'extrait de Tm1752. Si la protéine Tm1752 : CopG est aussi efficace que Tm1752, ce résultat pourrait s'expliquer par une production nettement moindre que la protéine PHU : on ne voit en effet pas de bande très importante à 50 kDa sur le gel 4.13.

## **2.4. En fusion avec la protéine BDI-3087**

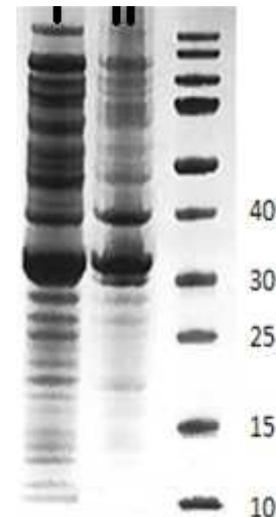
### **2.4.1. La protéine BDI-3087**

La protéine BDI\_3087 est une protéine de 269aa de *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503. Elle est annotée comme pouvant être une lipoprotéine dont la fonction est inconnue.

Elle a été produite, cristallisée et sa structure a été déterminée (PDB 3JX8). Elle a une masse de 29 kDa.

La production de la protéine BDI\_3087 a été analysée dans la souche KRX (Figure 4.14) après induction au rhamnose

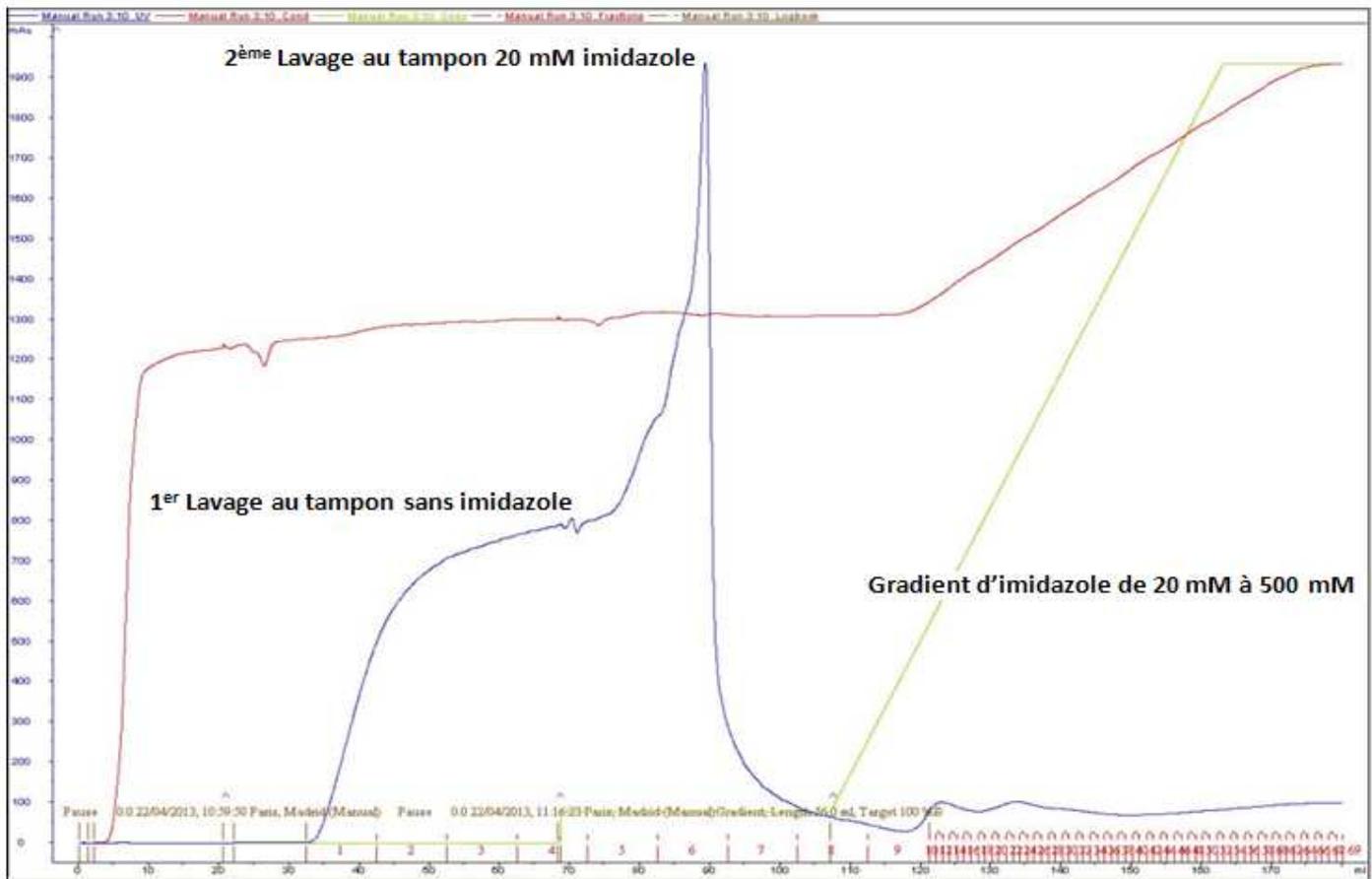
Bande à  $\approx 30$  kDa, correspondant à BDI\_3087.  $\longrightarrow$



**Figure 4.16 : Gel SDS-Page de l'expression de la protéine BDI-3087 dans KRX. (I) Fraction soluble ; (II) Fraction insoluble**

### **2.4.2. Purification de la protéine**

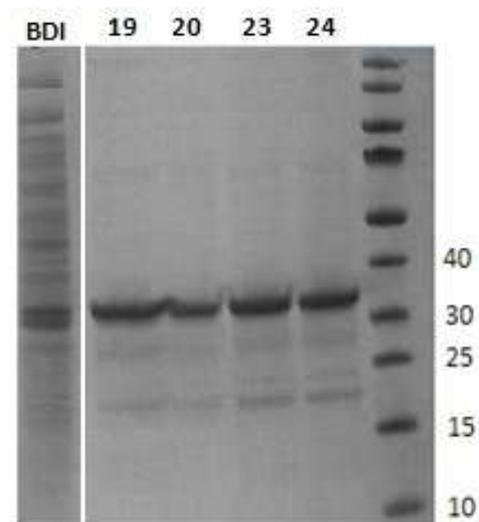
La purification de la protéine BDI\_3087 qui est également his-tagguée en N-terminal, a été réalisée par chromatographie d'affinité  $\text{Ni}^{2+}$ .



**Figure 4.17 : le graphique de la chromatographie d'affinité  $\text{Ni}^{2+}$  de la protéine BDI-3087.**

Les fractions 19, 20, 23 et 24 du pic élué en imidazole ont été analysées sur gel (Figure 4.16). Elle contiennent une protéine d'environ 30 kDa.

Bande à 30 kDa, correspondant à BDI\_3087. →



**Figure 4.18 : Gel SDS-Page des fractions de la chromatographie d'affinité Ni<sup>2+</sup> de la protéine BDI-3087**

Les fractions de 19 à 24 ont été concentrées et cette préparation a servi pour les essais de cristallogénèse.

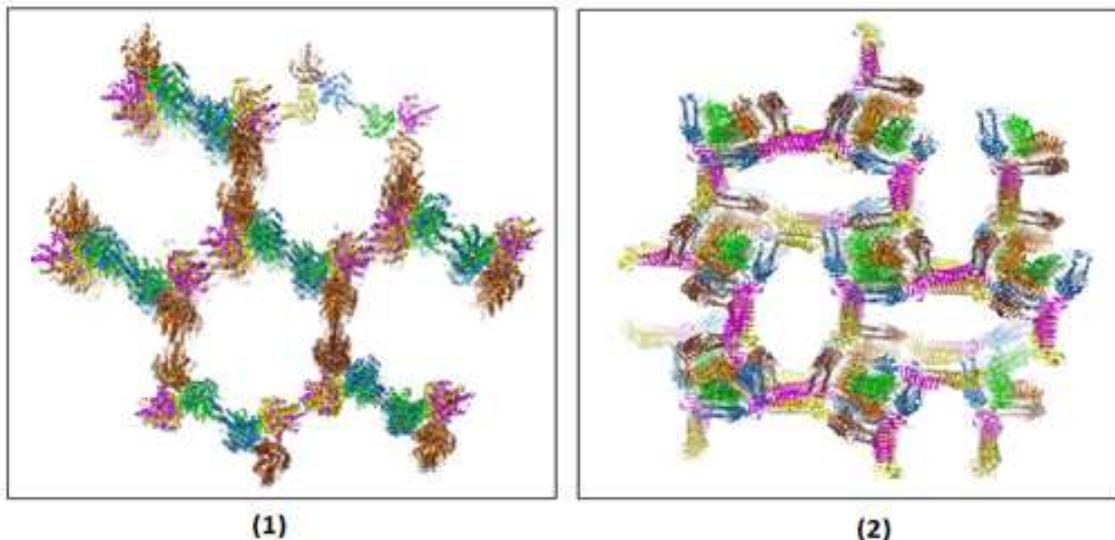
**2.4.3. Résultats de BDI 3087 : CopG**

Cette construction est réalisée par Overlap PCR, comme pour la protéine Tm1752 : CopG. Aucun candidat de séquence correcte n'a pu être obtenu.

**3. Essais de cristallographie**

La structure des deux protéines Tm1752 et BDI\_3087 est connue (figure 3.17). Par conséquent, des conditions de cristallogénèse sont publiées avec le descriptif des clones. Néanmoins, il est parfois difficile de reproduire la cristallogénèse dans un laboratoire différent. En effet, les méthodes de préparation de la protéine diffèrent et la composition de l'échantillon de protéine (tampon, pH, présence ou pas de NaCl) peut influencer la cristallogénèse. De plus, il n'y a pas de données détaillées sur les conditions de purification de ces protéines sur le site DNAsu.

D'où la nécessité de retrouver les conditions pour nos préparations, et dans les conditions du laboratoire.



**Figure 3.19 : Structure des cristaux obtenus avec les protéines : (1) Tm1752 ; (2) BDI-3087, montrant les cavités remplies de solvant où une protéine fusionnée pourrait co-cristalliser**

**3.1. Cristallogénèse de la protéine Tm1752**

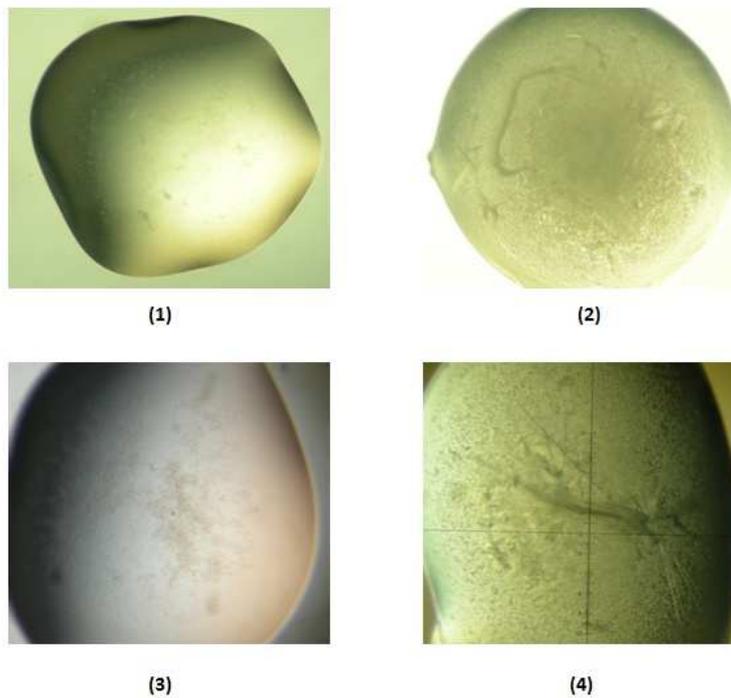
**Les conditions données pour la cristallisation de Tm1752 sont :**

Bicine 100 mM pH 9.0, dioxane 2%, PEG 20000 10%.

Selon la mesure de l'absorbance à 280 nm la concentration de la protéine Tm1752 pure est de 900  $\mu\text{M}$ . Pour retrouver les conditions de cristallisation au laboratoire, on a testé différentes concentrations de la protéine (180  $\mu\text{M}$  et 450  $\mu\text{M}$ ), fait varier le pH et le pourcentage en PEG autour de la condition publiée. Différentes conditions ont été testées :

- pH 7, pH 7.5, pH 8.0, pH 8.5, pH 9.0 et pH 9.5.
- PEG 6%, 8%, 10%, 12% et 14%.
- Concentration en Tm1752 : 180  $\mu\text{M}$  et 450  $\mu\text{M}$ .

Les essais de cristallogénèse ont été réalisés en goutte suspendue. On suit l'apparition de précipités ou de formes cristallines (figure 3.20).



**Figure 3.20 :**  
de gouttes  
**(1) Goutte**

**Aspect typique**  
suspendues  
**claire, (2)**

**Précipité abondant, (3) Précipité léger, (4) Aiguilles.**

Le tableau 4.3 donne une synthèse des résultats des essais de cristallisation :

	8%		10%		12%		14%	
	450 $\mu\text{M}$	180 $\mu\text{M}$						
pH 7.0						***		
pH								

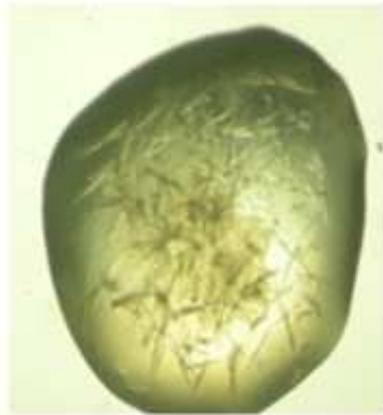
7.5									
pH									
8.0									
pH									
9.0									

**Tableau 4.4 : Résultats des essais de cristallogenèse de la protéine Tm1752**

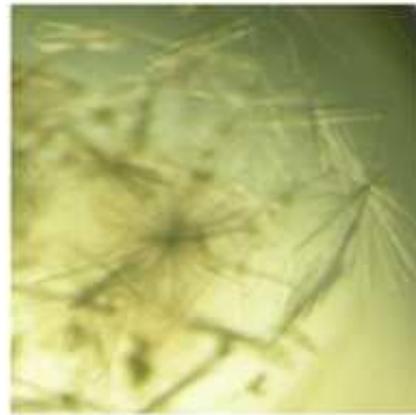
**Rouge = Précipité abondant ; Bleu = Précipité léger ; Vert = Goutte claire ; \* = aiguilles.**

Dans nos essais, la précipitation est favorisée à pH neutre. Une seule condition (12% en PEG 20000) a permis l'apparition d'une forme cristalline (aiguilles), analysable à la diffraction aux rayons X. L'analyse a confirmé que ces aiguilles sont effectivement de nature protéique, mais de taille trop réduite pour obtenir un spectre de diffraction complet.

L'apparition de cristaux dans d'autres conditions, peut être provoquée par la technique du "seeding", qui consiste à inoculer la goutte avec des germes cristallins. Quelques uns des cristaux apparus ont été récupérés dans 250 µl la solution à pH 7.0 et 12% en PEG 20000. Ils ont été broyés afin d'obtenir une multitude de petits germes cristallins. On introduit 0.2 µl de la préparation d'aiguille broyées dans la goutte pré-équilibrée contenant 1 µl de protéine et 1 µl de solution de cristallisation.



(1)



(2)

**Figure**  
**Photos de**  
**de**

**3.21 :**  
**gouttes**

**cristallographie**

*(1) Goutte obtenue après le seeding. (2) Agrandissement de la goutte (1).*

Le *seeding* a été réalisé au départ de la goutte à 180 µM en Tm1752 à pH 7.0 et PEG 12% et a donné les résultats suivants :

Seed N°1	10%		12%		14%
	250 µM	125 µM	250 µM	125 µM	250 µM



<b>pH</b> <b>7.0</b>	*****	*****	*****	*****	*****
<b>pH</b> <b>7.5</b>					
<b>pH</b> <b>8.0</b>					

**Tableau 4.5 : tableau des résultats de l'essai de seeding de la protéine Tm1752.**

*Dans la goutte la protéine diluée 4x = 125 µM et diluée 2x = 250 µM.*

*Rouge = Précipité abondant ; Bleu = Précipité léger ; Vert = Goutte claire ; \* = aiguilles.*

On observe qu'on a ainsi élargi la plage de cristallisation de la protéine Tm1752. Néanmoins, il apparaît de nombreuses aiguilles (Fig.3.21), mais pas de formes cristallines plus volumineuses.

### 3.2. Cristallogénèse de la protéine BDI-3087

**Les conditions données pour la cristallisation de BDI-3087 sont :**

Sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M, Bicine 500 mM est à pH 8.0 et pH 8.5.

Selon la mesure de l'absorbance à 280 nm la concentration de la protéine BDI-3087 pure est de 430 µM. Pour retrouver les conditions de cristallisation pour notre préparation de BDI\_3087, on a fait varier le pH, la concentration en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> autour de la condition publiée. On été testés :

- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2.0 M, 2.2 M, 2.4 M, 2.6 M et 2.8 M.
- pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0 et pH 8.5.

Les essais ont initialement été réalisés avec une solution de protéine à 100 µM. Les résultats de la cristallogénèse sont représentés dans le tableau suivant

	2.0 M	2.2 M	2.4 M	2.6 M	2.8 M
<b>pH</b> <b>7.0</b>					
<b>pH</b> <b>7.5</b>					
<b>pH</b> <b>8.0</b>					
<b>pH</b> <b>8.5</b>					

**Tableau des résultats**

**4.6 : tableau de l'essai de**

**cristallographie de la protéine BDI-3087.**

*Rouge = Précipité abondant ; Bleu = Précipité léger ; Vert = Goutte claire ; \* = aiguilles.*



On observe que l'on se trouve partiellement sur la plage de précipitation.

## **Chapitre V : Discussion, Conclusions et Perspectives**

### **1. Discussion et conclusions**

#### **1.1. Production de la protéine CopG**

Au cours de ce travail de fin d'étude, nous avons testé différents systèmes et différentes souches d'expression et de production de CopG.

Lors des essais de production de la protéine CopG native avec ou sans étiquette His, nous n'avons pas observé de bande à la taille attendue de CopG (12.5 kDa).

Pour la production en fusion avec un tag Halo, la protéine fusion aloTag : CopG est produite mais se dégrade progressivement, on observe une protéolyse progressive de la partie CopG.

Lors de la production de la fusion Tm1752 : CopG, nous avons pu suivre l'activité endoglucanase, qui est bien présente, mais nettement moindre que lorsque la protéine Tm1752 est produite seule. L'essai de purification de la fusion (PHU) a été infructueux.

L'absence de production de la protéine native, la production réduite et la dégradation dans les protéines fusion Halo : CopG et Tm1752 : CopG, suggèrent que la protéine CopG est instable quand elle est produite dans le cytoplasme d'*E. coli*.

La production réduite et l'instabilité de la protéine, ont empêché de tester l'activité thiorédoxine de CopG.

#### **1.2. Cristallogénèse**

Tm1752 et BDI\_3087, les deux protéines avec lesquelles des fusions ont été tentées, ont été produites et purifiées.



---

Nous avons testé les conditions de cristallisation de nos préparations.

Pour Tm1752, on a observé des formes cristallines (aiguilles), cependant la plage de précipitation ne s'est pas avérée être celle attendue. Pour BDI\_3087, la plage de précipitation observée est aussi déplacée, et aucune forme cristalline n'a pu être observée.

## **2. Perspectives**

### **2.1. Production de protéine CopG**

Les bactéries à Gram négatif possèdent des protéines périplasmiques DsbA, DsbB... dédiées à la formation et l'échange de ponts disulfure dans le périplasm (Messens and Collet, 2006 ; Inaba, 2009).

La protéine CopG possède 4 cystéines, susceptibles de former des ponts disulfure. L'instabilité de la protéine produite dans le cytoplasme pourrait être liée à l'absence d'un pont disulfure essentiel à son repliement. En effet, dans *C. metallidurans* CopG n'est pas cytoplasmique, mais périplasmique.

Pour tester cette hypothèse, il faudrait :

- Produire la protéine CopG dans le périplasm de *E. coli*, en maintenant son peptide signal dans le clone d'expression.
- Produire CopG dans une souche qui permet la formation des ponts disulfure dans le cytoplasme d'*E. coli*, par exemple "Origami 2 (DE3)" (Novagen).

### **2.2. Cristallogénèse**

En vue d'obtenir des formes cristallines de meilleure qualité, il faudra affiner les conditions qui sont adéquates pour nos préparations.



## Références

- Bolhuis H, van Veen H, Poolman B, Driessen A, Wil N (1997). *Konings mechanism of multidrug transporters*. FEMS Microbiology Reviews 21: 55-84.
- Bryksin A, Matsumura I (2010). *Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids*. Bio Techniques 48: 463-465.
- Carvalho A, Fernandes P, Ramos M (2006). *Similarities and Differences in the thioredoxin superfamily*. P.Bio Mol.Bio 91:229-48.
- Davigneault M (2004) in Limules:une histoire naturelle Institut océanographique eds
- Ghose T (1987). *Measurement of cellulase activities*. Pure Appl. Chem. 59: 257-268.
- Grass G, Fan B, Rosen B, Lemke K, Schlegel H, Rensing C (2001). *NreB from Achromobacter xylosoxidans 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance*. J. Bacteriol. 183: 2803-2807.
- Harrison M, Jones C, Solioz M, Dameroun C (2000). *Intracellular copper routing: the role of copper chaperones*. TIBS 25: .
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems J.Biol.Chem.264:13963-6
- Inaba K (2009). *Disulfide bond formation system in Escherichia coli*. J. Biochem. 146: 591-597.
- Janssen P, Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, Benotmane M, Leys N, Vallaeys T, Lapidus A, Monchy S, Médigue C, Taghavi S, McCorkle S, Dunn J, van der Lelie D, Mergeay M (2010). *The Complete Genome Sequence of Cupriavidus metallidurans Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments*. PLoS One 5: 1-33.
- Kinch L, Baker D, Grishin N (2003). *Deciphering a novel Thioredoxine-Like Fold Family*. Proteins: structure, Function, and Genetics 52: 323-331.
- Laurent T, Moore E, Reichard P (1964) Enzymatic synthesis of desoxyribonucleotides IV Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from Escherichia coli B J.Biol.Chem.239:3436-44
- Lemaire S, Keryer E, Stein M, Schepens I, Issakidis-Bourguet E, Gérard-Hirne C, Miginiac-Maslow M, Jacquot J-P (1999). *Heavy-Metal Regulation of Thioredoxin Gene Expression in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology, Vol. 120, pp. 773-778.
- Linder M, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N (1998) Copper transport AM. J. Clin. Nutr. 67:965(S)-971(S)
- Mergeay M, Houba C, Gerits J (1978). *Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper, and zinc ions: evidence from curing in*
- Messens J, Collet J-F (2006). *Pathways of disulfide bond formation in Escherichia coli*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 38: 1050-1062.
- Monchy S, Benotmane M, Janssen P, Vallaeys T, Taghavi S, van der Lelie D, Mergeay M (2007). *Plasmids pMOL28 and pMOL30 of Cupriavidus metallidurans are specialized in the maximal viable response to heavy metals*. J Bacteriol. 189: 7417-7425.
- Monchy S, Benotmane M, Wattiez R, van Aelst S, Auquier V, Borremans B, Mergeay M, Taghavi S, van der Lelie D, Vallaeys T (2006). *Transcriptomic and proteomic analyses of the*



- pMOL30-encoded copper resistance in Cupriavidus metallidurans strain CH34. Microbiology 152: 1765-1776.*
- Munson G, Lam D, Outten F, O'Halloran T (2000) Identification of copper-responsive two component system on the chromosome of Escherichia coli K-12 J. Bacteriol.82:5864-71
- Nies D. (2003). *Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes*. FEMS microbiology reviews 27:313:339.
- Ohana R, Encell L, Zhao K, Simpson D, Slater M, Uhr M, Wood K (2009). *HaloTag7: A genetically engineered tag enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification*. Protein Express Purif 68: 110-120.
- Park C, Raines R (2001) *Adjacent cysteine residues as a switch*. Protein Engineering 14: 939-942.
- Paulsen I, Saier M (1997). *A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins*. J Membr; Biol. 156: 99-103.
- Puig S, Thiele D (2002). *Molecular mechanisms of copper uptake and distribution*. Curr. Opin. Chem. Biol. 6: 171-180.
- Rae T, Schmidt P, Pufahl R, Culotta V O'Halloran T (1999) *Undetectable intracellular copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. Science 284:805-8
- Rensing C, Ghosh M, Rosen B (1999). *Families of Soft-Metal-Ion transporting ATPases*. J. Bacteriol. 181: 5891-5897.
- Rensing C, Grass G (2003). *Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment*. FEMS Microbiol. Reviews 782: 1-17.
- Rouch D, Lee B, Morby A (1995). *Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance*. J. Ind. Microbiol. 14:132-141.
- Saier M, Beatty J, Goffeau A, et al. (1999). *The major facilitator superfamily*. J. Mol. Microbial. Biotechnol. 1:257-279.
- Williams R, Frausto da Silva (1996). *The natural selection of chemical elements*. Oxford University Press. Oxford. 1996.
- Zacharias P Ramachandraiah A (1985) Identification of Cu(II)/Cu(III) couples in binuclear copper II complexes Polyhedron 4:1013-17