



HAL
open science

Rôle de la protéine RcnB dans l'homéostasie des métaux nickel, cobalt et cuivre chez la bactérie *Escherichia coli*

Camille Bleriot

► To cite this version:

Camille Bleriot. Rôle de la protéine RcnB dans l'homéostasie des métaux nickel, cobalt et cuivre chez la bactérie *Escherichia coli*. Biochimie [q-bio.BM]. INSA de Lyon, 2010. Français. NNT : . tel-00614986

HAL Id: tel-00614986

<https://theses.hal.science/tel-00614986>

Submitted on 17 Aug 2011

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

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

Thèse

**Rôle de la protéine RcnB
dans l'homéostasie des métaux
nickel, cobalt et cuivre
chez la bactérie *Escherichia coli***

Présentée devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Pour obtenir
le grade de docteur

Formation doctorale
Ecologie Microbienne

Ecole doctorale
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation (E2M2)

Présentée par
Camille Blériot

Laboratoire d'accueil : UMR 5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie
Equipe Bactéries et Métaux

Soutenance publique prévue le 30 novembre 2010 devant le jury

M	Blanco Carlos	Professeur (Université Rennes 1)
M	Lejeune Philippe	Professeur (INSA Lyon)
Mme	Mandrand-Berthelot Marie-Andrée	Directrice de recherche (CNRS Lyon)
Mme	Michaud-Soret Isabelle	Directrice de recherche (CEA Grenoble)
Mme	Rodrigue Agnès	Maître de conférences (INSA lyon)
Mme	Schalk Isabelle	Directrice de recherche (ESBS Strasbourg)

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quadriennal 2007-2010

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://sakura.cpe.fr/ED206 M. Jean Marc LANCELIN Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université Claude Bernard Lyon 1 Bât CPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 Fax : lancelin@hikari.cpe.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://www.insa-lyon.fr/eea M. Alain NICOLAS Insa : C. PLOSSU ede2a@insa-lyon.fr Secrétariat : M. LABOUNE AM. 64.43 – Fax : 64.54	M. Alain NICOLAS Ecole Centrale de Lyon Bâtiment H9 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 eea@ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://biomserv.univ-lyon1.fr/E2M2 M. Jean-Pierre FLANDROIS Insa : H. CHARLES	M. Jean-Pierre FLANDROIS CNRS UMR 5558 Université Claude Bernard Lyon 1 Bât G. Mendel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.26 23 59 50 Fax 04 26 23 59 49 06 07 53 89 13 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE Sec : Safia Boudjema M. Didier REVEL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Cardiologique de Lyon Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69500 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr M. Alain MILLE	M. Alain MILLE Université Claude Bernard Lyon 1 LIRIS - INFOMATHS Bâtiment Nautibus 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44 82 94 Fax 04 72 43 13 10 infomaths@bat710.univ-lyon1.fr - alain.mille@liris.cnrs.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON M. Jean Marc PELLETIER Secrétariat : C. BERNAVON 83.85	M. Jean Marc PELLETIER INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-marc.Pelletier@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE M. Jean Louis GUYADER Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12	M. Jean Louis GUYADER INSA de Lyon Laboratoire de Vibrations et Acoustique Bâtiment Antoine de Saint Exupéry 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.18.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 mega@lva.insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* M. OBADIA Lionel Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.88 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Remerciements

Ce manuscrit vient concrétiser presque quatre années de recherche effectuées au sein du Laboratoire Microbiologie, Adaptation et Pathogénie de Villeurbanne. Avant toute chose, je souhaiterais remercier un certain nombre de personnes qui ont collaboré, de près ou de loin, à ce travail et lui ont permis d'exister.

En premier lieu, je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, Isabelle Michaud-Soret, Isabelle Schalk, Carlos Blanco et Philippe Lejeune ainsi que mes directrices Marie-Andrée Mandrand-Berthelot et Agnès Rodrigue. Je pense en particulier aux trois rapporteurs extérieurs, qui en plus du travail important que nécessite la rédaction d'un rapport, vont se déplacer pour la soutenance. Je tiens spécialement à remercier Carlos Blanco qui a une importance toute particulière dans ce jury. En effet, c'est dans son laboratoire que j'ai pu goûter pour la première fois à la recherche et c'est en partie grâce à lui si j'ai poursuivi dans cette voie. J'avais la chance d'avoir ma paillasse non loin de la sienne et j'ai beaucoup appris en l'observant travailler à son insu. Je suis donc très heureux de le compter dans mon jury de thèse quelques années après...

Une thèse est un travail effectué par un thésard, certes, mais trouve également son origine et quelques unes de ses orientations dans l'esprit de son directeur. Dans mon cas, j'ai eu la chance d'être encadré par deux directrices complémentaires et remarquablement efficaces. Je ne trouverais certainement pas les mots adéquats mais je ne peux qu'adresser un énorme merci à Agnès Rodrigue qui m'a accompagné au quotidien, pour sa (bio)disponibilité, ses consignes, ses idées, ses conseils,... la liste est très très (trop!) longue. Les succès de cette thèse lui sont en grande partie dus (en ce qui concerne les échecs, j'en assume la paternité). Un autre grand merci à Marie-Andrée Mandrand-Berthelot pour le recul et les suggestions qu'elle a pu apporter pour le bon déroulement de ce travail. Ce fut un plaisir tout au long de ces années et je signerai avec joie pour une deuxième thèse avec elles si je le pouvais.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de pilotage Guy Condemine, David Pignol, Florence Wisniewski-Dyé et Long-Fei Wu. Ce comité s'est réuni à mi-parcours et la discussion très intéressante que nous avons pu avoir m'a beaucoup aidé pour la fin de la thèse.

Ma gratitude va pareillement aux membres de mon équipe d'accueil, *Bactéries et*

Métaux, aussi petite soit elle. Je remercie sincèrement Julien Wawrzyniak et Géraldine Effantin pour leur soutien dans les manip ainsi que Safia Arous pour m'avoir co-encadré lors de mon arrivée dans le laboratoire. J'ai eu la chance de pouvoir co-encadrer à mon tour un étudiant de Master 1, Thomas Alexandre, pendant trois mois ce qui m'a beaucoup plu et j'en profite pour le remercier de l'aide qu'il m'a apporté. Je salue également les nombreux étudiants de passage qui se sont succédés dans le laboratoire année après année.

Ce travail n'aurait pas pu être effectué sans une assistance technique plus qu'efficace. Je remercie donc très chaleureusement Véronique Utzinger, Yvette Alfaro et Jean-Michel Prost pour leur travail essentiel à la bonne marche du laboratoire.

lors de cette thèse, j'ai eu la chance de pouvoir collaborer avec de nombreux scientifiques. Ainsi, je voudrais témoigner ma reconnaissance à Dominique Mazzocut et Roland Montserret de l'IBCP de Lyon ainsi qu'aux membres de la plateforme de protéomique de l'IMM de Marseille pour leurs différents travaux relatifs à cette thèse. J'ai également eu la chance de collaborer plus étroitement avec Florence Lagarde du laboratoire des sciences analytiques de l'école CPE de Lyon et cette collaboration a été aussi amicale que productive. J'espère ainsi pouvoir la continuer à l'avenir. Enfin, je voudrais remercier toute l'équipe du laboratoire de bioénergétique cellulaire du CEA de Cadarache. J'ai en effet eu la chance de passer plusieurs semaines là-bas. Je remercie en particulier David Pignol et Pascal Arnoux pour leur encadrement aussi sympa qu'efficace, David Lemaire et son spectromètre de masse et Daniel Garcia et ses biosenseurs. J'en profite pour remercier aussi Jean Baptiste Rioux pour son accueil lors de mes séjours dans le Sud.

Pour finir, je souhaiterais saluer tous les membres du laboratoire Microbiologie, Adaptation et Pathogénie. Je pense pouvoir dire que ces quelques années de recherche se sont extrêmement bien déroulées grâce à eux. Sur le plan professionnel, les *grands*¹ de ce labo sont très accessibles et ont toujours répondu présents lorsque j'ai eu besoin d'eux. Quant aux *petits*², je tiens vraiment à les remercier pour tout ce qu'ils ont pu m'apporter sur un plan personnel. Je ne vais pas donner ici de noms pour être sûr de ne pas faire de jaloux mais merci à tous d'avoir été ou d'être encore là.

Un grand merci également aux gens extérieurs au laboratoire qui m'ont entouré pendant ces quatre ans à Lyon et ceux (et celle!) qui me soutiennent depuis encore plus longtemps.

Je m'excuse de ne pouvoir donner la liste exhaustive de tous ceux et celles qui ont compté dans ce travail mais il aurait fallu y dédier au moins un chapitre de ce manuscrit ce qui n'est pas possible pour des raisons évidentes de logistique...

1. c'est à dire ceux qui ont démontré leur efficacité depuis bien longtemps et pour qui une manip réussie n'est pas synonyme de chance mais d'un réel talent

2. nous autres pauvres étudiants dont l'échec des manip est un lot qui a la désagréable habitude d'être quotidien

*Le plus excitant à entendre en sciences n'est pas « Eurêka »
mais plutôt « Tiens, c'est marrant... »*

Isaac Asimov

Résumé

Les métaux sont omniprésents sur la planète et sont devenus nécessaires à tous les organismes vivants au cours de l'évolution. Cependant, la quantité de métal présent dans les cellules doit être très finement régulée car une quantité trop importante de métaux peut générer une toxicité. Pour assurer cette homéostasie, les cellules doivent être capables de réguler l'import et l'efflux des métaux par l'expression dynamique de protéines spécifiques impliquées dans ces flux ioniques.

Chez la bactérie modèle *Escherichia coli*, la toxicité du nickel et du cobalt est neutralisée par l'action de la pompe RcnA, protéine membranaire capable d'exporter les ions Ni²⁺ et Co²⁺ hors de la cellule. La production de RcnA est contrôlée par le métallorégulateur RcnR capable de détecter ces ions en cas d'excès et d'induire, en réponse à ce signal, l'expression du gène *rcnA*.

Récemment, notre équipe a identifié un nouveau gène que nous avons rebaptisé *rcnB* (précédemment *yohN*). Ce gène fait partie de l'opéron *rcnAB* et est, comme *rcnA*, impliqué dans l'homéostasie des ions Ni²⁺ et Co²⁺. A l'inverse de *rcnA*, une souche mutante délétée de *rcnB* est plus résistante au nickel et au cobalt et cela est directement corrélée à une plus faible accumulation de métal dans les cellules. Le gène *rcnB* code pour une petite protéine monomérique de 10 kDa localisée dans le périplasme et ne possédant pas d'homologues décrits à l'heure actuelle. Aucune fixation des ions Ni²⁺ et Co²⁺ n'a été mise en évidence pour la protéine RcnB. Elle peut en revanche interagir avec les ions Cu⁺ et Cu²⁺ aussi bien *in vitro* que *in vivo* et un lien avec les systèmes de résistance au cuivre de *E. coli* a été mis en évidence. Or, le cuivre confère des propriétés d'oxydo-réduction particulières aux protéines qui pourraient être directement liées à la fonction de RcnB.

Des investigations complémentaires sont nécessaires pour préciser la fonction exacte de RcnB, mais ce travail a mis en évidence le premier membre d'une nouvelle famille de protéines accessoires associées aux pompes d'efflux des ions métalliques.

Mots-Clés

microbiologie - biochimie - métaux - homéostasie - résistance - *Escherichia coli* - nickel - cobalt - cuivre - pompes à efflux - système Rcn

Summary

Metals are ubiquitous on Earth and have become necessary for living organisms like bacteria. However, there is a subtle balance between the life required amount and toxicity resulting from an overload of metal ions. The intracellular level of these ions must be tightly regulated. A strategy often used by cells is to regulate uptake and efflux of metal ions by expressing specific proteins involved in this traffic.

In the bacterium *Escherichia coli*, nickel and cobalt toxicity is counterbalanced by action of the RcnA efflux pump that permits excess Ni²⁺ and Co²⁺ ions to be excluded out of cells. Its expression is under the control of the nickel and cobalt inducible RcnR metalloregulator that represses *rcnA* transcription in absence of metals.

Recently, we identified a new gene that we called *rcnB* (formerly *yohN*) involved in this system. This gene is a part of the *rcnAB* operon and as *rcnA*, is involved in nickel and cobalt homeostasis. But, unlike *rcnA*, a mutant strain lacking *rcnB* is more resistant to nickel and cobalt. This phenotype is associated to a lower accumulation of these ions in the cells. *rcnB* gene encodes a small monomeric protein of 10 kDa which is found in the periplasmic fraction. Until now, databases do not contain any described homologs. RcnB displayed any Ni²⁺ or Co²⁺ binding capacity. On the other hand, RcnB can bind both Cu⁺ and Cu²⁺ ions *in vitro*. It is equally true *in vivo* and a link with copper homeostasis was found based on the copper resistance systems of *E. coli*. This is of particular interest because copper confers particular redox properties to proteins which could be directly related to the biological function of the RcnB protein.

Further studies are required to precise the role of RcnB but this work provides the identification and characterization of the first member of a new family of accessory proteins tied to metal ions efflux pumps.

Keywords

microbiology - biochemistry - metals - homeostasis - resistance - *Escherichia coli* - nickel - cobalt - copper - efflux pumps - Rcn system

Table des matières

I	Introduction	1
1	Caractéristiques physico-chimiques d'un métal	3
1.1	Qu'est ce qu'un métal?	3
1.2	Coordination des métaux dans les biomolécules	3
1.3	Potentiels d'oxydo-réduction	5
2	Les métaux, oligoéléments essentiels à la vie cellulaire	7
2.1	Vue générale	7
2.1.1	Métaux et évolution	7
2.1.2	Sélection des ions métalliques dans les protéines	9
2.1.3	Inventaire des métaux dans une bactérie	11
2.1.4	Inventaire des métaux dans les enzymes	13
2.1.5	Notion de quantité de métal biocompatible	13
2.2	Importance du nickel dans le métabolisme bactérien	15
2.2.1	Import des ions nickel dans les cellules	15
2.2.2	Le système <i>nikABCDE</i> d' <i>E. coli</i>	15
2.2.3	Les transporteurs ECF	17
2.2.4	Les transporteurs secondaires du nickel	19
2.2.5	Les hydrogénases	21
2.2.6	Les uréases	25
2.2.7	La glyoxalase I	27
2.2.8	Les autres enzymes à nickel	29
2.3	Importance du cobalt dans le métabolisme bactérien	31
2.3.1	Import des ions cobalt dans les cellules	31
2.3.2	Rôle des ions cobalt dans les cellules	33
2.4	Importance du cuivre dans le métabolisme bactérien	33
2.4.1	Entrée du cuivre dans les cellules	35
2.4.2	Le cuproprotéome	35
2.5	Le transport des ions métalliques chez <i>E. coli</i>	37
2.6	Résumé	37
3	Toxicité des ions métalliques et moyens de défense	39
3.1	Toxicité engendrée par les ions métalliques	39
3.1.1	Les liaisons aspécifiques	39
3.1.2	Métaux et stress oxydatif	41
3.1.3	Notion de quantité toxique d'un métal	41
3.2	Les stratégies de défense des bactéries	41
3.2.1	Exclusion du métal par l'imperméabilité membranaire	43
3.2.2	Séquestration intracellulaire des métaux par des protéines chélatrices	43
3.2.3	Séquestration extracellulaire des métaux	43

3.2.4	Détoxification enzymatique	45
3.2.5	Réduction de la sensibilité des cibles cellulaires	45
3.3	Transport actif du métal vers le milieu extérieur : mécanisme d'efflux	45
3.3.1	Les protéines de la famille RND	47
3.3.2	Les protéines de la famille CDF	49
3.3.3	Les ATPases de type P	53
3.3.4	Les systèmes d'efflux de <i>E. coli</i>	53
3.4	Les systèmes bactériens de résistance au nickel et au cobalt	55
3.5	Toxicité et résistance au cuivre	59
3.5.1	Mécanisme de la toxicité du cuivre	59
3.5.2	Systèmes chromosomiques de résistance au cuivre chez <i>E. coli</i>	59
3.5.3	Régulation génétique de la résistance au cuivre chez <i>E. coli</i>	61
3.5.4	Systèmes additionnels de résistance au cuivre	63
3.6	Résumé	67
4	Dynamique de régulation de l'homéostasie des éléments-traces métalliques	69
4.1	Les métallorégulateurs	69
4.1.1	Les dérépresseurs	71
4.1.2	Les coactivateurs	71
4.1.3	Les corépresseurs	71
4.1.4	La place des métallorégulateurs dans l'homéostasie des ions métalliques	75
4.2	Régulation post-transcriptionnelle de l'homéostasie des métaux - le cas du fer	75
4.3	Dynamique de transport des ions métalliques	77
4.3.1	Les différents flux cellulaires	77
4.3.2	Les métallochaperons	79
4.3.3	Les chaperons à nickel	79
4.3.4	Les chaperons à cuivre	79
4.3.5	Exemple de compartimentation d'un métal : le cas du cuivre	79
4.3.6	Intervention de molécules porteuses des ions métalliques : métallophores	81
4.3.7	Interconnexion des homéostasies des différents métaux	83
4.4	Résumé	85
5	Le système Rcn, prototype d'une nouvelle famille de systèmes d'efflux	87
5.1	Découverte et caractérisation de la protéine RcnA	87
5.2	Etude de la régulation du gène <i>rcnA</i>	89
5.2.1	Caractéristiques de la régulation de <i>rcnA</i>	89
5.2.2	Régulation différentielle de <i>rcnA</i> et <i>rcnR</i>	89
5.2.3	Mécanisme d'action de RcnR	91
5.3	Mise en évidence de l'opéron <i>rcnAB</i>	91
II	Résultats	95
6	Régulation transcriptionnelle du système RcnRAB	97
6.1	Etude de la spécificité d'expression de l'opéron <i>rcnAB</i>	97
6.1.1	Effet de différents métaux sur l'interaction entre RcnR et le promoteur de <i>rcnAB</i> <i>in vitro</i>	97
6.1.2	Effet de différents métaux sur l'induction de l'opéron <i>rcnAB in vivo</i>	99
6.2	Importance de la quantité d'ions métalliques pour l'expression de l'opéron <i>rcnAB</i>	99
6.3	Régulation de l'expression de l'opéron <i>rcnAB</i> au cours de la croissance	101
6.3.1	Importance de la phase de croissance bactérienne	101

6.3.2	Cinétique de réponse du système Rcn aux ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	101
6.4	Conclusion	103
7	Rôle de RcnB dans l'homéostasie des ions nickel et cobalt	105
7.1	Implication du gène <i>rcnB</i> dans la résistance aux ions nickel et cobalt	105
7.2	Effet de la mutation de <i>rcnB</i> sur la quantité cellulaire totale d'ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	107
7.2.1	Détermination de la quantité d'ions Ni ²⁺ et Co ²⁺ dans les bactéries	107
7.2.2	Etude cinétique de l'accumulation des ions Ni ²⁺	107
7.3	Effet de la mutation de <i>rcnB</i> sur la quantité cytoplasmique d'ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	109
7.3.1	Modulation de l'expression de l'opéron <i>rcnAB</i>	109
7.3.2	Modulation de l'expression de l'opéron <i>nikABCDE</i>	109
7.3.3	Etude de l'impact de la mutation de <i>rcnB</i> sur la physiologie du nickel par suivi de l'activité hydrogénase	111
7.4	Rôle de <i>rcnB</i> dans le système Rcn	113
7.4.1	Apports respectifs de RcnA et RcnB au phénomène de résistance aux ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	113
7.4.2	Apports respectifs de RcnA et RcnB au phénomène d'accumulation des ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	115
7.5	Conclusion	117
8	Caractérisation biochimique de la protéine RcnB	119
8.1	Etude bioinformatique de la protéine RcnB	119
8.2	La répartition du système Rcn dans les bactéries	119
8.3	Purification de la protéine RcnB	121
8.4	Localisation de la protéine RcnB	123
8.4.1	Séquençage de la partie N-terminale de RcnB	123
8.4.2	Immunodétection périplasmique de la protéine RcnB	123
8.5	Caractéristiques structurales de la protéine RcnB	125
8.5.1	Etat d'oligomérisation de la protéine RcnB	125
8.5.2	Détermination de la structure secondaire de la protéine RcnB	125
8.5.3	Stabilité de la protéine RcnB	127
8.6	Interactions de la protéine RcnB avec les ions métalliques	127
8.6.1	Mise en évidence des interactions par spectroscopie	127
8.6.2	Interactions avec les ions Ni ²⁺	129
	Dialyse à l'équilibre	129
	Dot Blot	129
8.6.3	Interactions avec le cuivre	131
	Spectrométrie de masse	131
	Chromatographie par gel-filtration	131
	Spectrofluorescence	131
8.7	Essais de cristallisation	133
8.8	Conclusion	135
9	Implication de RcnB dans l'homéostasie du cuivre	137
9.1	Le gène <i>rcnB</i> est indirectement impliqué dans le phénomène de résistance aux ions cuivre	137
9.2	Effet de <i>rcnB</i> sur la quantité totale de cuivre dans les cellules	139
9.3	Relations entre le gène <i>rcnB</i> et les autres systèmes impliqués dans l'homéostasie du cuivre chez <i>E. coli</i>	139
9.3.1	Influence de RcnB sur une souche mutante délétée de <i>copA</i>	141
9.3.2	Influence de RcnB sur une souche mutante délétée de <i>cusCFBA</i>	141
9.4	Relation entre RcnB et l'activité oxydase des bactéries	143

9.4.1	Influence de RcnB sur une souche mutante délétée de <i>cueO</i>	143
9.4.2	Le gène <i>rcnB</i> permet de restaurer l'activité oxydase d'un mutant <i>cueO</i>	143
9.4.3	Activité oxydase spécifique de la protéine RcnB	145
9.5	Effets cumulés du nickel, du cobalt et du cuivre	145
9.5.1	Effet du cuivre sur l'accumulation totale de nickel et de cobalt	145
9.5.2	Effet du cuivre sur la quantité cytoplasmique de nickel et de cobalt	147
9.6	Conclusion	147

III Conclusion 149

10	Discussion et perspectives	151
10.1	Régulation transcriptionnelle du système RcnRAB	151
10.1.1	Spécificité de la réponse du système RcnRAB	151
10.1.2	Régulation différentielle par le nickel et le cobalt	152
10.1.3	Complémentarité des systèmes Nik et Rcn dans l'homéostasie du nickel	155
10.1.4	Etude de l'expression propre de <i>rcnB</i>	155
10.2	Structure et fonction de la protéine RcnB	156
10.2.1	Structure de RcnB	156
10.2.2	Interactions de RcnB avec les ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	156
10.2.3	Rôle de RcnB au sein du système Rcn	157
10.2.4	Autres fonctions possibles pour RcnB	159
10.3	Identification des partenaires de RcnB	162
10.3.1	Interactions entre RcnA et RcnB	162
10.3.2	Autres partenaires de RcnB	162
10.3.3	Structure et fonction de la protéine RcnA	163
10.4	Rôle de RcnB dans l'agrégation des bactéries	163
10.5	Identification d'une protéine induite chez le mutant <i>rcnB</i>	165
10.6	Application pratique	165

IV Matériel et Méthodes 169

11	Matériels et Méthodes	171
11.1	Souches bactériennes et plasmides	171
11.1.1	Composition des milieux de culture	171
	Milieu riche LB	171
	Milieu minimum M63	171
11.1.2	Préparation des milieux	171
11.1.3	Conditions de culture et conservation des souches bactériennes	171
11.1.4	Détermination du seuil de toxicité des métaux pour les différentes souches bactériennes	172
	Croissance sur milieu solide - Méthode des gouttes	172
	Croissance sur milieu solide - Méthode du halo d'inhibition	172
	Croissance en milieu liquide	172
11.2	Méthodes génétiques et de biologie moléculaire	172
11.2.1	Extraction d'ADN plasmidique	172
	En petite quantité (miniprép)	172
	En grande quantité (midiprép)	172
11.2.2	Séparation par électrophorèse en gel d'agarose	172
11.2.3	Clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur	172

	Digestion par des endonucléases de restriction	172
	Purification d'un fragment d'ADN	173
	Ligature de fragments d'ADN	173
	Construction des plasmides <i>rcnA-gfp</i> , pETRCB et pUCRCB	173
11.2.4	Transformation par de l'ADN plasmidique	173
	Technique du TSS	173
	Technique de l'électroporation	173
11.2.5	Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	173
11.2.6	Construction de la souche mutante $\Delta rcnB$	175
11.2.7	Transduction avec le phage P1	175
11.2.8	Empreinte à la DNase	175
	Marquage de la sonde ADN par du $^{32}\text{P}\alpha\text{-dCTP}$	175
	Préparation des échantillons	175
	Migration sur gel de polyacrylamide	175
11.3	Méthodes biochimiques	176
11.3.1	Préparation d'extraits protéiques	176
	Extraction des protéines périsplasmiques	176
	Préparation rapide d'extraits bruts	176
11.3.2	Cinétique de transport du nickel	176
11.3.3	Dosage d'activité hydrogénase	176
11.3.4	Dosage des activités β -galactosidase ou β -glucuronidase	176
11.3.5	Dosage de l'activité oxydase	177
11.3.6	Dosage de protéines par la méthode de Bradford	177
11.3.7	Séparation des protéines par électrophorèse	177
	Electrophorèse dénaturante des protéines sur gel SDS-PAGE	177
	Electrophorèse en gel Tris tricine	177
11.3.8	Purification de la protéine RcnB	177
	Surproduction de RcnB	177
	Purification de RcnB	179
	Chromatographie d'interactions hydrophobes	179
	Dialyse	179
	Chromatographie d'échange d'anions	179
11.3.9	Immunodétection (=Western Blot)	179
11.3.10	Chromatographie par Gel-Filtration	180
11.3.11	Dialyses	180
	Vérification des membranes et préparation de la protéine	180
	Dialyse à l'équilibre	180
11.3.12	Dot Blot	180
11.4	Techniques biophysiques de caractérisation des biomolécules	180
11.4.1	Techniques spectroscopiques	180
	Spectroscopie UV-Visible	180
	Dosage de la fusion <i>rcnA-gfp</i> par spectrofluorométrie	180
	Etude de l'interaction RcnB/Cu par extinction de fluorescence	181
	Spectrométrie de masse	181
	Dosage des métaux par ICP-OES	181
11.4.2	Essais de cristallisation	181
11.4.3	Dichroïsme circulaire	181
11.4.4	Identification de protéines	182
11.5	Outils bioinformatiques	182
11.5.1	Alignements de génomes	182

11.5.2	Alignements de séquences protéiques	182
11.5.3	Prédiction de topologie protéique	182
11.5.4	Recherche de domaines protéiques	182
V	Bibliographie	183
	Bibliographie	184
VI	Annexes	193

Liste des tableaux

1	Tableau périodique des éléments	2
2	Correspondance entre certains métaux et leurs ligands préférentiels	4
3	Potentiels d'oxydo-réduction de différents ions métalliques	4
4	Géométrie de coordination des cations divalents du cobalt, nickel, cuivre et zinc	8
5	Teneurs en métal théorique et réelle d'une bactérie	10
6	Proportion de métalloprotéines présentes dans les différentes classes d'enzymes	12
7	Proportion de chaque métal dans les métalloenzymes	12
8	Expression de la construction <i>rcnA-uidA</i> en fonction du temps de croissance	100
9	Détermination par ICP-OES de l'accumulation des ions nickel et cobalt par les bactéries	106
10	Détermination par ICP-OES de l'accumulation du cuivre par les bactéries . .	138
11	Effet de la complémentation par <i>rcnB</i> sur les différents mutants des systèmes de résistance au cuivre	138
12	Détermination par ICP-OES de l'accumulation du cobalt, cuivre et nickel par les bactéries	144
13	Souches bactériennes utilisées pour cette étude	170
14	Plasmides utilisés pour cette étude	170

Liste des figures

1	Géométrie de coordination privilégiée des cations divalents du cobalt, nickel, cuivre et zinc au sein des protéines	8
2	Notion de quantité biocompatible de métal	12
3	Structure du site actif des hydrogénases [NiFe]	20
4	Les trois hydrogénases majeures de <i>E. coli</i>	20
5	Biosynthèse de la grande sous-unité HycE de l'hydrogénase 3 de <i>E. coli</i> . . .	22
6	Structure de l'uréase de <i>K. aerogenes</i>	24
7	Structure du site actif de l'uréase de <i>K. aerogenes</i>	24
8	Voie de dégradation du méthylglyoxal	26
9	Les enzymes GlxI de <i>H. sapiens</i> et <i>E. coli</i>	28
10	Structure et import de la cobalamine	30
11	Les différents sites de fixation du cuivre dans les protéines	32
12	Structure du site CuB des oxydases hème-cuivre	34
13	Les principaux systèmes d'import des éléments traces chez <i>E. coli</i>	36
14	Cristal de Ni-struvite produit par <i>Streptomyces acidiscabies</i> E13	42
15	Modèle de fonctionnement du système RND CzcCBA de <i>R. metallidurans</i> (2003)	46
16	Modèle de fonctionnement du système RND AcrAB-TolC de <i>E. coli</i> (2006)	48
17	Structure de la protéine YiiP de <i>E. coli</i>	50
18	Modèle de fonctionnement Zn-dépendant de la protéine YiiP de <i>E. coli</i>	50
19	Les systèmes d'efflux des métaux nickel, cobalt, zinc et cuivre chez <i>E. coli</i>	52
20	Structure du site actif du métallochaperon CusF de <i>E. coli</i>	54
21	Systèmes de résistance au cuivre chez <i>E. coli</i>	58
22	Structure des sites actifs de l'oxydase à multi-cuivre CueO	60
23	Le métallochaperon CopC de <i>P. syringae</i>	62
24	Les sept familles de métallorégulateurs	68
25	Structure de la protéine NikR de <i>E. coli</i>	72
26	Modèle de détoxification du périplasma par les systèmes RND	76
27	Mécanisme d'acquisition du manganèse et du cuivre par CucA et MncA chez <i>Synechocystis</i> PCC 6803	80
28	Structure des nouveaux métallophores identifiés	80
29	Implication de <i>yohM</i> dans la résistance aux ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	86
30	Implication de <i>yohM</i> dans l'accumulation des ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	86
31	Représentation schématique du locus <i>yoh</i> de <i>E. coli</i>	88
32	Induction des gènes <i>rcnA</i> et <i>rcnR</i> par les ions Ni ²⁺ et Co ²⁺	88
33	Empreinte à la DNase de la région intergénique <i>rcnR</i> - <i>rcnA</i> en présence de nickel ou cobalt	90
34	Structure de la région intergénique <i>rcnR</i> - <i>rcnA</i>	92

35	Mise en évidence de l'opéron <i>rcnA-yohN</i> par RT-PCR	92
36	Empreintes à la DNase sur la région intergénique <i>rcnR-rcnA</i> en présence de métaux et de RcnR	96
37	Activité du gène rapporteur <i>rcnA-uidA</i> en fonction de la nature des ions métalliques	98
38	Expression du gène <i>rcnA</i> en fonction de la quantité de Co^{2+} et de Ni^{2+}	100
39	Cinétique d'expression de la construction <i>rcnA-gfp</i>	102
40	Influence de la mutation de <i>rcnB</i> sur la résistance des bactéries aux ions nickel et cobalt	104
41	Influence de la mutation de <i>rcnB</i> sur l'accumulation d'ions nickel	106
42	Influence de la mutation de <i>rcnB</i> sur la réponse de la fusion <i>rcnA-gfp</i> aux ions Ni^{2+} et Co^{2+}	108
43	Influence de la mutation de <i>rcnB</i> sur la réponse de la fusion <i>nikA :: lacZ</i> au nickel	108
44	Influence des composants du système Rcn sur l'activité hydrogénase	110
45	Effets relatifs de NikABCDE et RcnB sur l'activité hydrogénase des bactéries	112
46	Effet des différents composants du système Rcn sur la résistance au nickel et au cobalt.	114
47	Effet des différents composants du système Rcn sur l'accumulation d'ions nickel	114
48	Alignement graphique de la protéine RcnB de différents organismes	118
49	Organisation du système Rcn dans différents organismes	120
50	De la production à la purification de la protéine RcnB	122
51	Immunodétection de la protéine RcnB dans des extraits périplasmiques	124
52	Chromatographie par gel-filtration de la protéine RcnB	124
53	Dichroïsme circulaire de la protéine RcnB	126
54	Spectres d'émission de fluorescence de la protéine RcnB	128
55	Spectres d'absorption de la lumière UV-visible de la protéine RcnB	128
56	Test d'interaction entre la protéine RcnB et les ions ^{63}Ni	130
57	Spectres de masse de la protéine RcnB	132
58	Spectres d'émission de fluorescence de la protéine RcnB en présence de cuivre	134
59	Crible des conditions de cristallisation de la protéine RcnB	134
60	Influence de la mutation de <i>rcnB</i> sur la résistance des bactéries aux ions cuivre	136
61	Lien entre <i>rcnB</i> et <i>copA</i> pour le phénomène de résistance au cuivre.	140
62	Lien entre <i>rcnB</i> et <i>cusCFBA</i> pour le phénomène de résistance au cuivre.	140
63	Lien entre <i>rcnB</i> et <i>cueO</i> pour le phénomène de résistance au cuivre.	142
64	Effet de RcnB sur l'activité oxydase de différentes souches.	142
65	Activité oxydase de la protéine RcnB purifiée.	144
66	Effet croisé des ions nickel, cobalt et cuivre sur l'expression de la fusion <i>rcnA-gfp</i>	146
67	Profil d'expression des systèmes Nik et Rcn	154
68	Influence de la mutation de <i>rcnB</i> sur l'agrégation des bactéries	164
69	Induction de l'expression d'une protéine inconnue chez le mutant <i>rcnB</i>	164
70	Vue microscopique de bactéries exprimant la fusion <i>rcnA :: gfp</i>	166
71	Principe de l'empreinte à la DNase	174
72	Schéma de l'appareil FPLC utilisé	178

Première partie

Introduction

Tableau 1 – Tableau périodique des éléments

	1																18															
1	1 H																	13	14	15	16	17	2 He									
2	3 Li	4 Be																	5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne								
3	11 Na	12 Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar														
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr														
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe														
6	55 Cs	56 Ba	*	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn														
7	87 Fr	88 Ra	**	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Uuu	112 Uub		114 Uuq		116 Uuh		118 Uuo														
			* 6	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu														
			** 7	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr														

Légende:
 métaux
 métalloïdes
 non-métaux

Les symboles des éléments sont indiqués ainsi que leur numéro atomique. Les métaux de transition sont figurés dans le cadre rouge. La ligne noire en escalier sépare les éléments considérés comme conducteurs à gauche des isolants à droite. * correspond aux lanthanides et ** aux actinides.

Chapitre 1

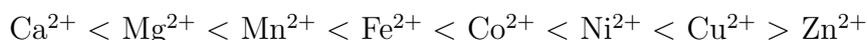
Caractéristiques physico-chimiques d'un métal

1.1 Qu'est ce qu'un métal ?

Le terme métal désigne, avec les métalloïdes et les non-métaux, l'un des trois groupes présents dans le tableau périodique des éléments [Tableau 1]. Tous les membres de ce groupe ont la particularité de pouvoir perdre des électrons et ainsi former des ions positifs ou cations. Le sous-groupe des métaux de transition regroupe tous les éléments présents dans le bloc *d* du tableau périodique qui s'étend de la colonne 3 à la colonne 12 à l'exception des lanthanides et actinides. Ces atomes ont tous leur orbitale électronique *s* saturée et diffèrent par leur orbitale *d* incomplète. Cette lacune électronique permet de les considérer comme des acides de Lewis qui peuvent former des complexes avec des ligands non métalliques se comportant alors comme des bases de Lewis. Ces dernières peuvent partager leur paire d'électrons libres pour établir la liaison avec l'ion métallique [1, 2].

1.2 Coordination des métaux dans les biomolécules

La formation de complexes entre les métaux et les atomes constituant des macromolécules biologiques permet d'obtenir des molécules ayant des propriétés catalytiques uniques ce qui les rend indispensables au métabolisme cellulaire. La formation d'interactions entre métal et ligand dépend des propriétés intrinsèques de ces atomes. Ainsi, le rapport charge/rayon atomique également appelé polarisation ou mollesse selon le principe HSAB¹ [3] est essentiel et plus un atome métallique sera polarisé, plus l'interaction avec un ligand potentiel sera forte. Or, la polarisation d'un élément augmente globalement de gauche à droite dans le tableau périodique. Selon ce concept, les métaux peuvent être classés en fonction de leur capacité d'interaction avec les ligands. Une classification simplifiée a été établie [4], la série de Irving-Williams :



Les cations divalents sont classés du moins au plus affins.

1. Hard and Soft Acids and Bases, au sens de Lewis du terme

Tableau 2 – Correspondance entre certains métaux et leurs ligands préférentiels

Cations métalliques	Ligands fréquents
Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ , Fe ³⁺ , Mn ²⁺	H ₂ O, NH ₃ , ROH, RNH ₂ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , OH ⁻ , RCOO ⁻
Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺	Pyridine, Imidazole, NO ₂ ⁻ , SO ₃ ²⁻
Cd ²⁺ , Cu ⁺ , Ag ⁺	CN ⁻ , RS, RSH

Tableau adapté de [5, 6, 7].

Tableau 3 – Potentiels d'oxydo-réduction de différents ions métalliques

oxydant	potentiel E ⁰ (V)	réducteur	oxydant	potentiel E ⁰ (V)	réducteur
Na ⁺	- 2,71	Na	Ni ²⁺	- 0,25	Ni
Ca ²⁺	- 2,686	Ca	H⁺	0,0000	H₂
Mg ²⁺	- 2,372	Mg	Cu ²⁺	+ 0,159	Cu ⁺
Mn ²⁺	- 1,185	Mn	Cu ²⁺	+ 0,340	Cu
Zn ²⁺	- 0,7618	Zn	Cu ⁺	+ 0,520	Cu
Fe ²⁺	- 0,44	Fe	Fe ³⁺	+ 0,77	Fe ²⁺
Cd ²⁺	- 0,40	Cd	Ag ⁺	+ 0,7996	Ag
Co ²⁺	- 0,28	Co	Au ³⁺	+ 1,5	Au

Les potentiels d'oxydo-réduction sont indiqués pour une température de 25°C à pression atmosphérique pour des solutions aqueuses de substance pure à 1 mol.L⁻¹ [8].

Toutefois, cette série ne peut à elle seule expliquer toutes les interactions recensées à ce jour puisque tous les ligands devraient préférentiellement interagir avec l'élément le plus polarisé, ici le cuivre, ce qui n'est pas le cas *in vivo*. Dans les cellules, les ligands sont essentiellement les atomes d'azote (N), d'oxygène (O) et de soufre (S). Or, ces éléments diffèrent par leur polarisation. Ainsi, S est un ligand très polarisé alors que O l'est beaucoup moins, N étant situé à un niveau intermédiaire. Les métaux les plus polarisés comme le cuivre, auront tendance à interagir préférentiellement avec des ligands soufrés, les métaux ayant une polarisation intermédiaire avec des ligands azotés et les métaux les moins polarisés avec les composés oxygénés [Tableau 2].

Cette tendance ne constitue toutefois pas une règle absolue. Ainsi, un métal très polarisé aura une affinité meilleure qu'un autre métal faiblement polarisé pour tous les sites d'interactions potentiels [9]. Les ions métalliques sont coordonnés par un nombre variable de ligands allant de deux à six² en fonction de leurs propriétés électroniques. Par cette interaction, les métaux modifient les propriétés physico-chimiques de leur environnement direct³ [10]. La sphère de coordination⁴ de la molécule module en contrepartie les propriétés de réactivité du métal.

1.3 Potentiels d'oxydo-réduction

Les métaux, de par leurs propriétés intrinsèques, forment des couples dont les potentiels d'oxydo-réduction varient beaucoup d'une espèce à l'autre [Tableau 3]. Le terme fréquemment employé est la noblesse d'un métal, plus le potentiel sera élevé et plus le métal sera noble. Le potentiel d'oxydo-réduction est une propriété intrinsèque fondamentale dictant la réactivité de chaque métal et joue un rôle très important dans les réactions biochimiques de la cellule. Ainsi, les ions cuivre et fer peuvent être sous forme réduite ($\text{Cu}^+/\text{Fe}^{2+}$) ou oxydée ($\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) selon les conditions physiologiques de la cellule. Or, cette modification de la charge peut avoir des répercussions sur la coordination atomique et donc sur la nature des sites d'interaction.

2. quatre et six étant les configurations privilégiées

3. acidité ou basicité, nucléophilie ou électrophilie et caractère oxydant ou réducteur

4. atomes impliqués dans les liaisons avec l'ion métallique

Chapitre 2

Les métaux, oligoéléments essentiels à la vie cellulaire

2.1 Vue générale

2.1.1 Métaux et évolution

La Vie sur Terre est apparue il y a presque 4 milliards d'années et, depuis, s'est développée continuellement jusqu'à atteindre la biodiversité que nous connaissons aujourd'hui. Tout au long de ce processus d'évolution, les organismes vivants ont su tirer de leur environnement tous les éléments issus de l'hydrosphère, la lithosphère et l'atmosphère afin d'assurer leur survie, leur développement et leur prolifération. Or, les conditions environnementales ont varié au cours de l'histoire géologique modulant la solubilité et donc la biodisponibilité de certaines molécules et notamment des ions métalliques. C'est pourquoi certains de ces ions, créés au sein du noyau terrestre dès l'origine de la planète, ont été sélectionnés durant l'évolution pour prendre part aux processus clés de la vie et sont devenus essentiels pour assurer certaines fonctions [11].

Ainsi, il est généralement admis que l'atmosphère de la Terre primitive était fortement réductrice de par la présence de quantités importantes de gaz atmosphériques tels que le dihydrogène (H_2), le méthane (CH_4) ou encore le sulfure d'hydrogène (H_2S). De plus, il a été montré que les océans primitifs étaient riches en sulfures métalliques et sous ces conditions, le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le cadmium (Cd) sont peu solubles et donc peu biodisponibles alors que le fer (Fe) sous forme ferreuse Fe(II), le manganèse (Mn), le cobalt (Co) et le nickel (Ni) le sont beaucoup plus [12]. Les cellules ont donc intégré préférentiellement ces derniers dans leur métabolisme et les enzymes les utilisant aujourd'hui peuvent être considérées comme des reliques de cette époque.

Les premiers organismes photosynthétiques apparus il y a un peu plus de 2 milliards d'années ont profondément modifié les conditions environnementales et notamment la solubilité des ions métalliques [14]. L'arrivée du dioxygène (O_2) d'abord dissous dans les océans puis progressivement relâché dans l'atmosphère peut à ce titre être considérée comme une catastrophe écologique responsable d'une pollution majeure et irréversible de la planète [15]. Les organismes ayant survécu à ce changement drastique de l'environne-

Tableau 4 – Géométrie de coordination des cations divalents du cobalt, nickel, cuivre et zinc

Nombre de ligands	Géométrie de coordination	Nombre de cas recensés			
		Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
≥ 7	<i>total</i>	12	7	8	3
6	<i>total</i>	210	415	366	108
	<i>dont octaédrique</i>	131	272	214	64
5	<i>total</i>	18	19	499	69
	<i>dont trigonal-bipyramidale</i>	0	0	237	18
	<i>dont pyramidale carrée</i>	0	0	19	8
4	<i>total</i>	71	430	523	110
	<i>dont tétraédrique</i>	15	2	0	43
	<i>dont planaire carrée</i>	26	346	383	22
3	<i>total</i>	1	1	4	2
2	<i>total</i>	0	1	0	0

Les données sont extraites de [13].

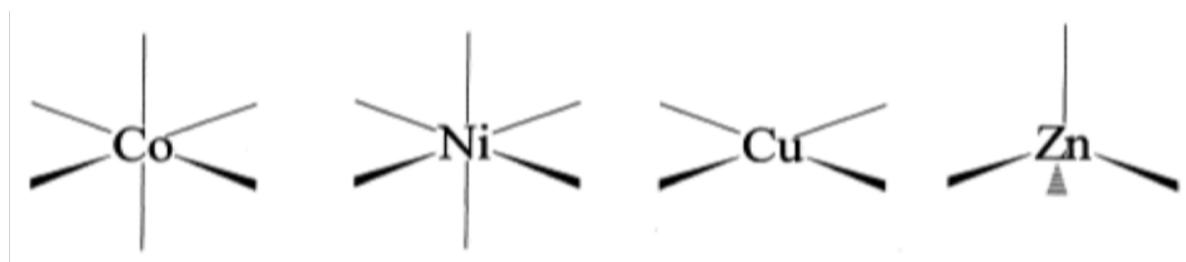


Figure 1 – Géométrie de coordination privilégiée des cations divalents du cobalt, nickel, cuivre et zinc au sein des protéines

Les triangles pleins symbolisent les liaisons en premier plan tandis que les pointillés marquent les liaisons en arrière plan. D'après [13].

ment se sont adaptés en développant un métabolisme oxydatif ce qui a créé un besoin pour des métaux avec de nouvelles caractéristiques d'oxydo-réduction.

Les exemples du cuivre et du fer illustrent bien ce phénomène. Dans le monde primitif anaérobie, le cuivre était principalement sous forme de sulfures de Cu(I) insolubles dans l'eau à pH neutre et uniquement localisés dans les eaux acides des failles océaniques. L'oxydation du Cu(I) insoluble en Cu(II) soluble suite à l'apparition du dioxygène a permis l'utilisation biologique de ce métal et de ses propriétés d'oxydo-réduction particulières. Le cuivre Cu(II) est donc un bioélément moderne. Inversement, le fer était initialement présent sous forme soluble Fe(II). L'oxydation en Fe(III) insoluble a contraint les êtres vivants à développer tout un arsenal de molécules fixant ce métal, les sidérophores, pour acquérir le fer essentiel à leur métabolisme [16, 17]. La faible solubilité du fer Fe(III) et la présence de cuivre Cu(II) dans les océans actuels poussent d'ailleurs les organismes océaniques à abandonner progressivement l'utilisation du premier pour le second [18].

Ce rapport très fin entre métaux et organismes vivants peut aussi être plus indirect. Ainsi, certains auteurs suggèrent que l'apparition de dioxygène dans l'atmosphère aurait été grandement facilitée par une baisse d'origine volcanique de la teneur en nickel des eaux océaniques il y a 2,7 milliards d'années [19, 20]. Cette baisse aurait entraîné une carence pour les organismes méthanogènes possédant des métalloenzymes à nickel essentielles à leur survie aboutissant à une diminution de la production de méthane. Or, ce gaz peut réagir avec et donc consommer le dioxygène provoquant une baisse de la teneur atmosphérique [21]. La diminution de production du nickel volcanique et donc de méthane aurait alors accéléré l'apparition du dioxygène dans l'atmosphère et toutes les conséquences imputables à cet événement.

L'histoire évolutive du vivant est donc toujours restée très profondément liée à celle de l'environnement dans lequel les organismes se développent. Ainsi, la vie a gagné graduellement en degré de complexité aussi bien au niveau macroscopique, passant des êtres unicellulaires primitifs aux eucaryotes supérieurs, qu'au niveau microscopique avec des cellules renfermant toujours plus de protéines aux fonctions métaboliques toujours plus nombreuses.

2.1.2 Sélection des ions métalliques dans les protéines

Le modelage du génome au cours de l'évolution a conduit à l'apparition de diverses familles de protéines capables d'interagir avec différents ions métalliques. Pour ces macromolécules, la séquence primaire et les structures secondaires vont dicter la conformation repliée et vont influencer la sélection du métal. Chacun des ions métalliques adoptera alors une géométrie de coordination particulière [Tableau 4 et Figure 1]. Ainsi, une poche d'interaction d'une protéine donnée sera plus adaptée à tel ou tel métal correspondant au niveau de plus faible énergie thermodynamique¹. Toutefois, dans une cellule, les protéines sont dynamiques et les contraintes stériques ne sont pas constantes. De plus, elles se trouvent dans un environnement complexe très éloigné d'une solution idéale qui ne

1. meilleure stabilité du complexe

Tableau 5 – Teneurs en métal théorique et réelle d'une bactérie

métal	rayon (pm)	nombre d'oxydation (n.o)	concentration dans l'eau de mer	concentration dans <i>Escherichia coli</i>
Sodium	95	Na(I)	457 mM	236 mM
Potassium	133	K(I)	9,72 mM	161 – 210 mM
Magnésium	65	Mg(II)	55,5 mM	44 – 54 mM
Calcium	99	Ca(II)	9,98 mM	0,3 – 1,5 mM
Fer	76	Fe(II)/Fe(III)	179 nM	180 μ M
Zinc	74	Zn(II)	153 nM	270 μ M
Nickel	72	Ni(II)	92 nM	5 μ M
Cuivre	69	Cu(I)/Cu(II)	47,2 nM	18 μ M
Manganèse	80	Mn(II)	36,4 nM	1,7 μ M
Cobalt	74	Co(II)	4,58 nM	0,5 μ M
Molybdène	62	Mo(VI)	104 nM	8 μ M
Cadmium	97	Cd(II)	979 pM	n.d
Chrome	52	Cr(VI)	962 pM	1.1 μ M
Vanadium	59	V(V)	39,3 nM	77 μ M
Argent	126	Ag(I)	2,78 nM	n.d
Or	137	Au(I)	55,8 pM	n.d
Mercure	110	Hg(II)	150 pM	n.d
Plomb	120	Pb(II)	145 pM	n.d
Uranium	97	U(VI)	12,6 nM	n.d
Arsenic	47	As(V)	40 nM	n.d
Antimoine	62	Sb(V)	2,71 nM	n.d

Les bioéléments majeurs sont sur fond vert, les éléments traces sur fond jaune, les éléments essentiellement toxiques sur fond orange et les éléments uniquement toxiques sur fond rouge [22, 23, 24]. Il est important de bien se représenter la quantité d'atomes métalliques présents dans les bactéries. Par exemple, pour *E. coli*, le volume communément admis est de $2 \cdot 10^{-17} \text{ m}^3$ soit $2 \cdot 10^{-14}$ litres ($\pi \times (1,3 \mu\text{m})^2 \times 4 \mu\text{m}$) [25]. Or, 1 mol = $6,022 \cdot 10^{23}$ atomes et donc 1 nM représente 3 atomes par bactérie.

contiendrait qu'une seule sorte de macromolécule et une seule sorte de métal. Les protéines entrent ainsi en contact avec différents cations de charge identique et très proches en taille. Dans ce contexte, il semble que l'exclusion des ions inadaptés soit un défi plus grand que la fixation de l'ion adapté. Cette dernière peut en outre être biaisée en particulier chez les polypeptides en cours d'élongation [10]. Pour illustrer ce concept, une étude s'est intéressée à substituer l'ion cuivre du site actif de l'enzyme oxydase spécifique des amines de *Escherichia coli* (ECAO) par les ions nickel, cobalt ou zinc [26]. Dans ce cas précis, tous les ions testés se fixent mais seul le cuivre permet l'activité de l'enzyme grâce à son potentiel d'oxydo-réduction élevé. Le phénomène est comparable pour la protéine CsoR de *Bacillus subtilis* qui se fixe à l'ADN sous forme apo et qui, sous forme liée à un ion Cu^+ , perd son affinité et se décroche. La substitution du cuivre par du zinc ou du nickel, fixés avec une affinité légèrement moins bonne, n'entraîne pas la dissociation du complexe ADN-protéine probablement car le changement de conformation induit par ces métaux n'est pas suffisant [27].

La seule affinité des ions métalliques telle qu'elle est prédite par la série de Irving-Williams ne permet donc pas d'expliquer toutes les interactions ayant lieu dans les cellules. D'autres phénomènes biologiques dont les principaux sont la concentration locale de chaque ion, la spéciation, l'intervention de protéines chaperons ou encore les phénomènes de compétition entre les ions métalliques interviennent dans ces processus de reconnaissance et fixation.

2.1.3 Inventaire des métaux dans une bactérie

Les différents métaux du tableau périodique [Tableau 1] possèdent leurs propres caractéristiques physico-chimiques² qui en font des entités distinctes d'intérêt inégal pour les cellules. La spéciation des métaux dans les cellules est extrêmement mal connue mais il est communément admis que les métaux sont sous forme ionisée, essentiellement M^+ ou M^{2+} et que ces cations forment des complexes avec les molécules organiques rendant nulle ou presque la quantité d'ions libres. Quatre classes de métaux se distinguent selon leur toxicité [Tableau 5].

1. Les bioéléments majeurs Cette catégorie est constituée par les éléments des deux premières colonnes du tableau périodique que sont le sodium, le magnésium, le potassium et le calcium. Ces métaux sont en quantité très importante dans les cellules ($>10^{-3}$ M) et sont absolument nécessaires à la vie cellulaire car ils participent au métabolisme de base³.

2. Les éléments traces Cette catégorie regroupe de nombreux métaux de la première ligne des métaux de transition ainsi que le molybdène. Les quantités intracellulaires sont moindres que pour les bioéléments majeurs mais restent non négligeables (compris entre

2. solubilité, potentiel d'oxydo-réduction, géométrie de coordination, etc...

3. expression du génome et activité d'enzymes fondamentales

Tableau 6 – Proportion de métalloprotéines présentes dans les différentes classes d'enzymes

classe	famille	% de métalloenzymes
EC 1	oxydoréductases	44
EC 2	transférases	40
EC 3	hydrolases	39
EC 4	lyases	36
EC 5	isomérasés	36
EC 6	ligases	59

Les enzymes sont classées selon la norme internationale E.C. [28] et les données, tirées de [29], montrent la proportion de métalloenzymes à l'intérieur de chacune des six catégories.

Tableau 7 – Proportion de chaque métal dans les métalloenzymes

métal	% de représentation
Mg	37
Zn	21
Fe	18
Mn	14
Ca	5
Co, Cu	3
Ni, K, Na	<2

Les données sont adaptées de [30].

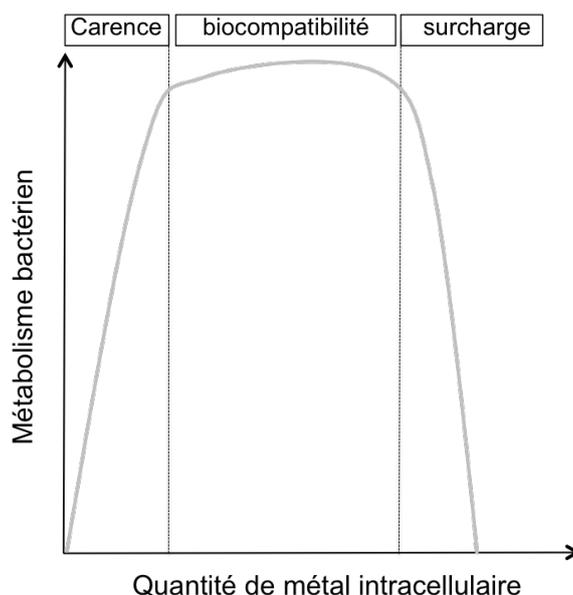


Figure 2 – Notion de quantité biocompatible de métal

Le métabolisme bactérien, reflet de la viabilité cellulaire, est représenté en fonction de la concentration intracellulaire d'un ion métallique donné. Les valeurs de biocompatibilité et de toxicité sont propres à chaque métal et dépendent également de l'espèce bactérienne étudiée. Pour les métaux toxiques, les états de carence et de biocompatibilité sont inexistantes.

10^{-3} et 10^{-6} M). Les éléments traces sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires⁴.

3. Les éléments toxiques Dans cette catégorie se trouvent des métaux dont très peu de fonctions biologiques sont décrites. Par exemple, pour le cadmium, seulement une enzyme a été décrite à l'heure actuelle pour une algue unicellulaire marine [31] et aucune utilisation par les bactéries. De ce fait, ces éléments peuvent être considérés comme présentant essentiellement une toxicité pour les bactéries.

4. Les éléments abiotiques Ces éléments n'ont strictement aucune fonction biologique caractérisée actuellement et peuvent être considérés comme des éléments minéraux totalement exclus des processus métaboliques. Les cellules doivent donc uniquement s'en préserver. Les métaux de cette catégorie sont de loin les plus importants en nombre et sont majoritairement retrouvés dans les deuxième et troisième lignes des métaux de transition du tableau périodique ainsi que dans le groupe des métalloïdes.

2.1.4 Inventaire des métaux dans les enzymes

Il est fréquemment énoncé qu'environ un tiers des enzymes possèdent un métal en cofacteur et sont donc des métalloprotéines. En réalité, une approche systématique portant sur 1371 enzymes a permis de montrer que 41 % de ces enzymes contiennent un ion métallique et dans 87 % des cas, celui-ci est retrouvé dans le centre catalytique [29]. La même étude détaille la proportion de métalloenzymes dans chacune des six familles d'enzymes répertoriées [Tableau 6].

Parmi les métaux retrouvés dans les enzymes, le magnésium est de loin le plus fréquent suivi par le zinc, le fer et le manganèse. Les autres, dont le nickel, le cobalt et le cuivre, sont beaucoup plus rares [Tableau 7]. Certains métaux sont par ailleurs spécifiques de catégories d'enzymes comme par exemple le cuivre et le fer retrouvés dans 90 % des cas dans les oxydo-réductases. A l'opposé, le zinc est le seul métal retrouvé dans les six classes d'enzymes.

2.1.5 Notion de quantité de métal biocompatible

La quantité intracellulaire de chaque métal se doit d'être très finement régulée. En effet, dans un état de carence en un métal essentiel, certaines enzymes nécessaires au métabolisme bactérien ne peuvent pas fonctionner ce qui compromet la survie des cellules. A l'inverse, un excès de métal, même si celui-ci est nécessaire, peut générer une toxicité par interaction avec des cibles aspécifiques. Les bactéries doivent donc constamment maintenir une quantité intracellulaire de chaque métal compatible avec leur survie et leur développement [Figure 2].

4. fourniture d'énergie, réactions d'oxydo-réduction, stabilisation de structures

2.2 Importance du nickel dans le métabolisme bactérien

2.2.1 Import des ions nickel dans les cellules

Le nickel figure parmi les éléments-traces [Tableau 5]. Comme tous les autres cations métalliques nécessaires à la vie cellulaire, les ions Ni^{2+} présents dans le milieu extérieur doivent tout d'abord franchir la membrane externe. Cette étape est pour l'heure très peu caractérisée. Des porines de la membrane externe sont probablement impliquées dans ce transport [32]. Chez *E. coli*, les porines majoritaires sont OmpC, OmpF et PhoE. OmpF est la protéine la plus abondante de la membrane externe [33]. Or, il a été montré que les protéines OmpC et OmpF transportaient plus les cations que les anions [34] ce qui permet de supposer un rôle dans l'approvisionnement du périplasma en cations métalliques. Plus récemment, le système de fourniture d'énergie TonB/ExbB/ExbD, déjà décrit pour son rôle dans le transport de sidérophores [35], a été montré comme intervenant dans l'import de nickel [36]. Dans cette étude réalisée sur *Helicobacter pylori*, il est montré que le nickel franchit la membrane externe grâce au récepteur FrpB4 appartenant à la famille des OMP (Outer Membrane Protein) et que ce transfert requiert l'intervention du complexe TonB/ExbB/ExbD. Des homologues de ce récepteur FrpB4, absent chez *E. coli*, ont été retrouvés chez d'autres bactéries et pourraient constituer une voie d'entrée importante des ions Ni^{2+} dans le périplasma.

L'import dans le cytoplasme peut par la suite s'effectuer de manière spécifique grâce à des transporteurs à haute affinité. Ces transporteurs se répartissent en deux groupes principaux. Le premier de ces groupes se compose des systèmes ABC⁵ représenté chez *E. coli* par le système *nikABCDE* et des transporteurs ECF⁶. Ces deux types de systèmes appartiennent au même groupe et ont la particularité d'être multiprotéiques. Ils diffèrent uniquement par le composant soluble dans le périplasma, absent pour les ECF. L'autre groupe se compose des transporteurs secondaires qui à la différence des membres du premier groupe sont des perméases à un seul composant. Les membres les plus significatifs de ce groupe sont les transporteurs NiCoT⁷ et les familles UreH et HupE/UreJ [37].

Chez *E. coli*, les ions Ni^{2+} sont importés par le système NikABCDE. Mais en conditions d'excès d'ions métalliques, il a été montré que le nickel pouvait emprunter le transporteur aspécifique CorA dédié à l'import de magnésium [38]. Une troisième voie d'entrée est suspectée probablement par un autre transporteur du magnésium comme la protéine MgtA.

2.2.2 Le système *nikABCDE* d'*E. coli*

Ce système a été découvert puis caractérisé au laboratoire lors d'études sur des mutants ayant perdu toute activité hydrogénase [39, 40, 41]. Il est composé de cinq gènes organisés en un même opéron *nikABCDE*. Cet opéron est réprimé par le produit du gène *nikR*, un

5. ATP-Binding Cassette

6. Energy Coupling Factor

7. Transporteurs à Nickel et Cobalt

métallo-régulateur qui sera détaillé plus loin. Les protéines NikA-E possèdent de fortes similitudes avec les systèmes de transport d'oligopeptides retrouvés chez de nombreuses bactéries. La protéine NikA, d'une taille de 56 kDa est localisée dans le périplasma et est présente sous forme monomérique [42]. Cette protéine est pour l'heure la seule protéine périplasmique caractérisée chez *E. coli* comme ayant de l'affinité pour le nickel qu'elle fixe à raison d'un atome par molécule avec un K_d de l'ordre de 10^{-7} M [42]. Une étude structurale avait révélé que le nickel était coordonné par cinq à sept atomes d'oxygène ou d'azote et un atome de soufre [43]. Mais depuis, la structure tridimensionnelle de la protéine NikA a été résolue [44]. Bien que cette étude ait apporté beaucoup d'informations sur le repliement de la protéine, la structure exacte du site de fixation du nickel restait mal comprise. L'ion Ni^{2+} était supposé être lié indirectement à la protéine probablement par l'intermédiaire de molécules d'eau [44]. D'autres résultats portant sur des cristaux de la protéine NikA ont permis de mieux comprendre cette interaction NikA- Ni^{2+} . En effet, la structure tridimensionnelle de cristaux de NikA a été déterminée avec comme ligand du fer ferrique Fe(III) à la place du nickel. Dans ces cristaux, la distribution électronique observée ne correspond pas à l'interaction directe de l'atome métallique avec les ligands de la protéine NikA mais l'ion Fe(III) semble chélaté par l'EDTA, composé utilisé au cours du processus de purification de NikA. Ceci suggère qu'un métallophore proche de l'EDTA d'un point de vue structural est impliqué dans la fixation de l'ion Ni^{2+} *in vivo* [45]. Cette petite molécule appelée nickélophore par analogie aux sidérophores pourrait être le BTC⁸ [46]. Toutefois, l'existence de ce composé intermédiaire n'a pour l'heure pas été montrée *in vivo*. Par ailleurs, un second site de fixation du nickel de plus faible affinité ($K_d \approx 10^{-5}$ M) existe dans NikA mais celui-ci ne semble pas avoir de signification biologique [47].

En ce qui concerne les autres protéines du système, NikB et NikC constituées par des hélices α et fortement hydrophobes, elles formeraient le canal membranaire permettant le passage du nickel à travers la membrane cytoplasmique. Quant aux protéines NikD et NikE, elles possèdent les motifs de Walker A et B, signatures caractéristiques de protéines participant au couplage énergétique par hydrolyse de l'ATP [48].

Le système Nik a été mis en évidence et caractérisé chez *E. coli* mais a depuis été retrouvé chez d'autres bactéries comme *Brucella suis* [49] ou encore *Yersinia pseudotuberculosis* [50]. Ce système est nécessaire à la fonction de certaines métalloenzymes, notamment les uréases impliquées dans la virulence de ces organismes.

2.2.3 Les transporteurs ECF

Il existe d'autres transporteurs apparentés au système NikABCDE et chargés d'importer le nickel dans le cytoplasme bactérien. Ces transporteurs appartiennent à la famille des transporteurs ECF. Ils sont beaucoup plus répandus dans le monde bactérien que le système NikABCDE tel qu'il est présent chez *E. coli* mais ils ne sont pas uniquement dédiés aux métaux [51]. Les transporteurs ECF sont dépourvus de composant soluble extracytoplasmique chargé de capter le substrat. Ils sont composés d'une protéine trans-

8. Butane-1,2,4-TriCarboxylate

membranaire et d'une ou deux protéines cytoplasmiques possédant une activité ATPase. Ces composants sont comparables aux éléments présents dans tous les systèmes ABC. En revanche, l'originalité des transporteurs ECF réside dans l'autre composant du système qui est spécifique au substrat [52]. Celui-ci n'est pas soluble dans le périplasme et peut être constitué d'une ou deux protéines membranaires chargées de reconnaître et de lier le composé transporté. Du fait de leur récente mise en évidence, le mécanisme d'action précis des transporteurs ECF n'est pas encore élucidé à l'heure actuelle. Le système UreMQO de *Streptococcus salivarius* est un exemple de transporteur ECF dédié à l'import de nickel [53].

2.2.4 Les transporteurs secondaires du nickel

En plus de ces complexes de plusieurs protéines tirant leur énergie de l'hydrolyse de l'ATP, il existe des perméases composées d'une seule protéine fonctionnant comme des transporteurs secondaires et tirant donc parti du gradient électrochimique. La famille des NiCoT regroupe les perméases de haute affinité spécifiques du nickel et/ou du cobalt et largement distribuées dans les bactéries [54]. Le premier représentant de cette famille identifié fut le gène *hoxN* de *Ralstonia metallidurans* [55]. Celui-ci code pour une protéine composée de huit hélices α transmembranaires uniquement dédiée à l'import de nickel [56]. La source d'énergie du système n'est pas clairement définie et la faible accumulation de nickel suggère qu'il s'agit d'un mécanisme d'uniport. Quelques résidus caractéristiques de cette famille ont été identifiés et notamment le motif HX₄DH localisé dans l'hélice II. Une mutation du résidu aspartate ou histidine (HX₄DH) entraîne une perte de l'activité de transport tandis qu'une mutation de l'autre résidu histidine (HX₄DH) diminue drastiquement l'affinité du système pour les ions nickel [57]. D'autres résidus, principalement des aspartates et des histidines, ont été montrés comme étant requis pour le transport. De nombreux homologues à la protéine HoxN ont été caractérisés depuis chez les bactéries comme NhlF chez *Rhodococcus rhodochrous* [58], NixA chez *H. pylori* [59] ou encore NicT chez *Mycobacterium tuberculosis* [60]. De manière intéressante, la protéine NhlF est capable de transporter les ions Ni²⁺ et Co²⁺ avec une affinité comparable. Cette différence entre HoxN et NhlF trouve son origine dans des résidus de l'hélice II qui influencent la sélectivité et le transport des ions métalliques [61].

Une autre famille de perméases dont le représentant principal est UreH est connue pour transporter le nickel [37]. Les membres de cette famille sont très proches des NiCoT mais ne possèdent pas exactement les mêmes motifs caractéristiques bien qu'ils soient très proches et sont prédites pour ne posséder que six segments transmembranaires.

Enfin, une troisième famille de perméases à nickel existe, la famille HupE/UreJ. Un nouveau membre de cette famille a encore été récemment identifié. Il s'agit de la protéine codée par le gène *hupE* chez *Rhizobium leguminosarum* [62]. Cette protéine comporte six hélices transmembranaires. Des résidus importants pour la fonction de transport ont été mis en évidence et notamment un motif HX₅DH localisé dans l'hélice I ainsi qu'un autre motif FHGX[AV]HGXE situé quant à lui dans l'hélice IV et propre à cette famille.

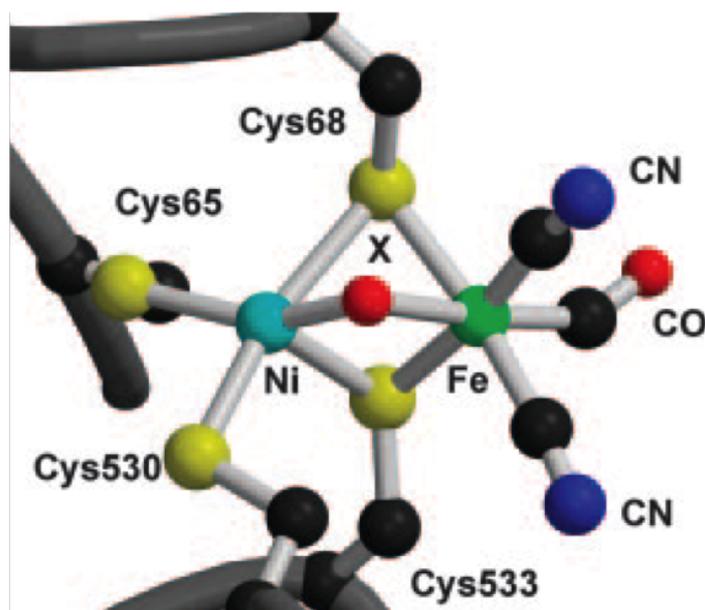


Figure 3 – Structure du site actif des hydrogénases [NiFe]

Exemple d'un site actif d'une hydrogénase de *Desulfovibrio gigas*. L'atome de nickel est représenté en bleu, celui de fer en vert et les atomes de soufre des cystéines en jaune. Les ligands diatomiques CN et CO sont quant à eux représentés avec C = noir, N = bleu et O = rouge. Les acides aminés intervenant dans la liaison des métaux et leur position dans la séquence sont indiqués [63].

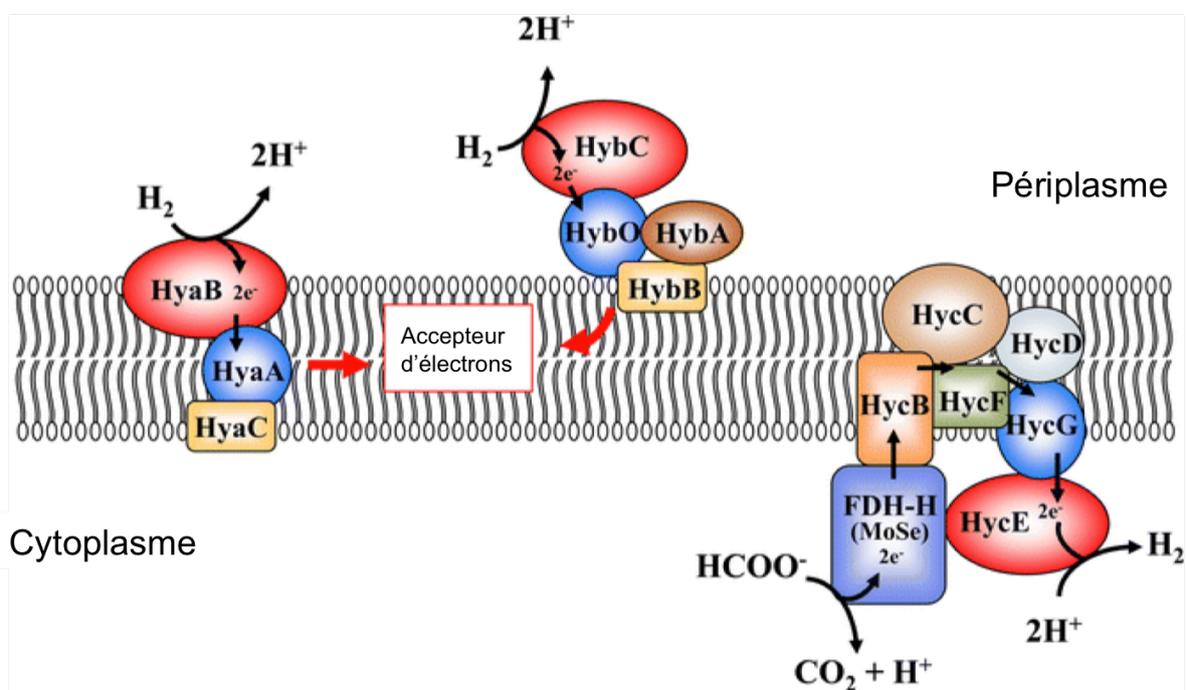


Figure 4 – Les trois hydrogénases majeures de *E. coli*

Les trois hydrogénases Hyd1, Hyd2 et Hyd3 de *E. coli* sont représentées de gauche à droite. La grande sous-unité contenant le site actif est en rouge tandis que la petite sous-unité qui permet le transfert d'électrons est en bleu. Les autres protéines constitutives des hydrogénases sont figurées également [64].

2.2.5 Les hydrogénases

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le plus petit substrat connu en biologie, le dihydrogène, et jouent un rôle primordial dans le métabolisme énergétique en catalysant l'oxydo-réduction du dihydrogène selon la réaction suivante :



Trois familles d'hydrogénases phylogénétiquement différentes ont été définies selon que leur site actif contienne deux atomes de fer, [FeFe], un atome de fer et un atome de nickel [NiFe] ou un seul atome de fer [Fe]⁹ [65, 66, 67]. Les ions métalliques jouent le rôle de cofacteur catalytique grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction particulières. Les hydrogénases [NiFe] sont les plus largement répandues et dérivent très probablement d'un ancêtre commun ayant évolué dans l'atmosphère primitive de la Terre riche en dihydrogène et où le nickel était largement biodisponible. La caractérisation structurale d'une hydrogénase [NiFe] de *Desulfovibrio gigas* a montré que l'atome de nickel était coordonné par quatre résidus cystéines alors que l'atome de fer était en interaction avec deux de ces mêmes résidus mais également avec des ligands diatomiques [68] identifiés plus tard comme étant un CO et deux CN [69] [Figure 3].

L'activité hydrogénase de *E. coli* est connue depuis très longtemps [70] mais il a été montré ensuite que cette activité était due à trois enzymes immunologiquement différentes [71]. Celles-ci, dénommées hydrogénases 1, 2 et 3, appartiennent toutes à la famille des [NiFe] [Figure 4].

L'hydrogénase 1 (Hyd1) est la plus abondante chez *E. coli*. Elle est synthétisée exclusivement en anaérobiose en présence de formiate [73]. L'hydrogénase 2 (Hyd2) est elle aussi synthétisée en conditions anaérobies et assure la quasi-totalité de la dissociation du dihydrogène [73, 74]. Ces deux enzymes ont leur site actif orienté vers le périplasma [75] et permettent de dissocier le dihydrogène en protons ce qui libère des électrons qui pourront être utilisés par des accepteurs de la membrane. Elles possèdent une structure modulaire comparable, sous forme d'hétérodimères avec une grande sous-unité α (HyaB ou HybC) de ≈ 60 kDa qui renferme le site actif contenant les métaux et une petite sous-unité β (HyaA ou HybO) de ≈ 40 kDa contenant des centres fer-soufre [Fe-S] qui assurent le transit des électrons vers les accepteurs terminaux. Les similarités de séquence sont très marquées entre les sous-unités de ces deux hydrogénases [64]. Malgré ces points communs, les topologies membranaires de Hyd1 et Hyd2 sont différentes de par la présence de sous-unités supplémentaires. HyaC permet la localisation de Hyd1 dans la membrane interne. Quant à HybA et HybB, elles n'ont aucun rôle dans l'ancrage à la membrane mais sont nécessaires à la fonction de Hyd2. Elles sont supposées jouer un rôle dans le transfert des électrons [76]. Ainsi, Hyd1 peut être considérée comme une protéine intégralement membranaire tandis que Hyd2 est une protéine ancrée à la membrane interne [75, 77]. La raison biologique de cette différence de topologie n'est toujours pas clarifiée. De plus, la régulation de l'expression des deux hydrogénases est distincte. Il est clair que les deux enzymes ne sont

9. la dénomination Hmd (pour H₂-forming methyltetrahydromethanopterin dehydrogenase) peut également être rencontrée

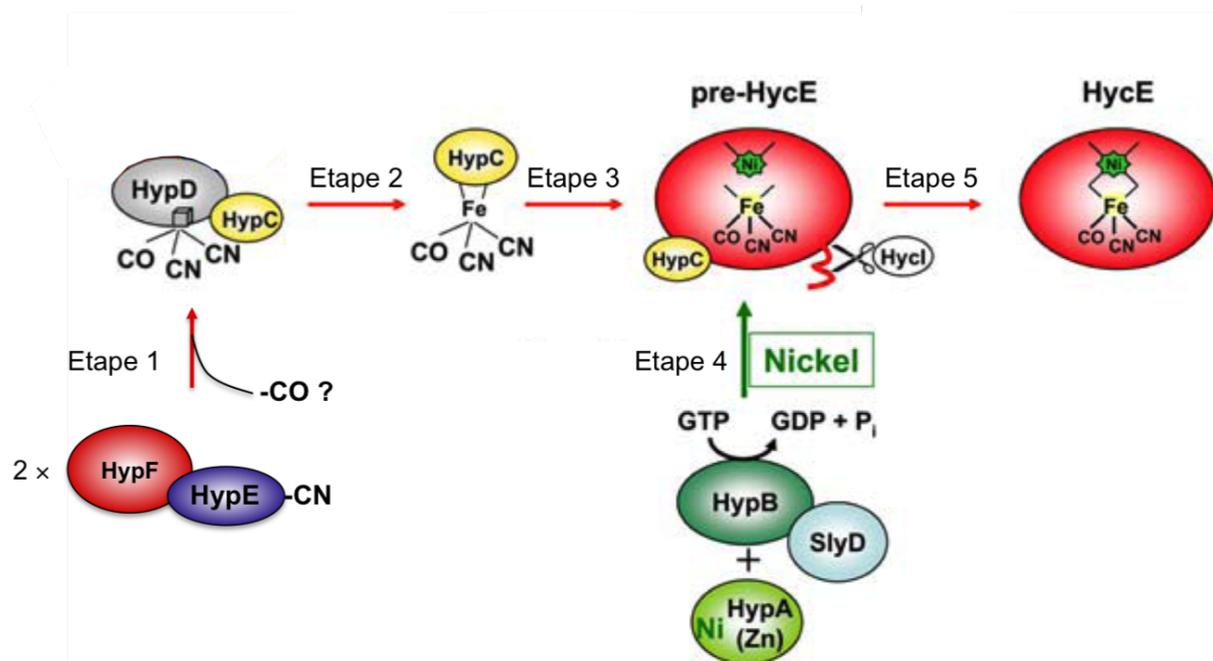


Figure 5 – Biosynthèse de la grande sous-unité HycE de l'hydrogénase 3 de *E. coli*

Lors de l'étape 1, le groupement $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ est transféré à la protéine HypC grâce à l'intervention du complexe chaperon HypDEF. Puis, HypC transfère ce groupement au précurseur de la grande sous-unité pre-HycE. Ensuite, le complexe HypAB-SlyD transfère l'atome de nickel à ce même précurseur. Finalement, la protéase spécifique HycI clive le peptide C-terminal ce qui aboutit à une forme maturée fonctionnelle de HycE. Figure adaptée de [64, 72].

pas synthétisées en aérobiose [78] mais induites en anaérobiose [79]. Toutefois, l'expression de l'hydrogénase 1 est induite en phase stationnaire et en conditions acides [80, 81] alors que celle de Hyd2 est plus importante en phase exponentielle de croissance [79].

Chez *E. coli*, il existe une troisième hydrogénase très différente des deux premières. L'hydrogénase 3 (Hyd3) fait partie d'un complexe multienzymatique formiate hydrogénélyase composé, en plus de cette enzyme, d'une formiate déshydrogénase catalysant la dissociation du formiate en dioxyde de carbone et hydrogène [82] ainsi que de six polypeptides codés par l'opéron *hyc* permettant le transfert d'électrons vers les accepteurs finaux, les protons [83]. Hyd3 est un membre de la sous-classe des [NiFe] hydrogénases qui partagent une grande similarité de séquence avec des sous-unités de la NADH : quinine oxydo-réductase¹⁰ impliquant un possible rôle dans la production d'énergie [84]. A la différence de Hyd1 et Hyd2, son site actif est tourné vers le cytoplasme.

De plus, il existe chez *E. coli* un opéron *hyf* codant une probable quatrième hydrogénase [85]. Cet opéron *hyf* code pour tous les homologues des polypeptides Hyc (Hyd3) ainsi que pour des composants partageant une forte similarité avec des éléments du complexe I. Toutefois, les essais portant sur la caractérisation de cette quatrième hydrogénase n'ont pas été concluants et les conditions d'expression *in vivo* ne sont pas connues actuellement [86].

Les hydrogénases sont codées par de nombreux gènes organisés en plusieurs opérons. En plus des gènes de structure codant pour les petites sous-unités (*hyaA*, *hybO* et *hycG*) et les grandes sous-unités (*hyaB*, *hybC* et *hycE*) respectivement des hydrogénases 1, 2 et 3, il existe tout un ensemble de gènes accessoires codant pour des protéines de maturation nécessaires à l'activité de ces enzymes [88, 89]. Parmi eux, les plus importants sont les gènes *hyp*. Deux d'entre eux, *hypA* et *hypC*, sont spécifiques pour la maturation de Hyd3 tandis que les quatre autres *hypB*, *hypD*, *hypE* et *hypF* sont requis pour la maturation des trois hydrogénases. Les homologues des gènes *hypA* et *hypC*, respectivement *hybF* et *hybG* sont eux spécifiques de la maturation de Hyd1 et Hyd2 [90, 91]. Les protéines codées par les gènes *hypC/hybG*, *hypD*, *hypE* et *hypF* permettent la création du demi-site actif contenant l'atome de fer lié aux composés diatomiques [92]. Brièvement, HypE et HypF forment un complexe relativement stable ($K_d \approx 10^{-7}$ M) qui utilise l'ATP pour créer le groupement HypE-CN [93, 94, 95]. Le complexe HypE-HypF peut ensuite transférer le ligand -CN à un complexe HypC-HypD [96] [Figure 5 étape 1]. L'origine du ligand -CO n'est quant à elle pas très claire. Le transfert du groupement $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ à la grande sous-unité HycE est alors réalisé grâce à la protéine HypC [Figure 5 étapes 2 et 3] qui reste en complexe avec cette sous-unité pour permettre l'insertion du nickel [97, 98]. Celle-ci a ensuite lieu grâce aux métalloenzymes HypA/HybF et HypB qui sont capables de fixer le nickel [99] [Figure 5 étape 4]. HybF fixe du nickel avec un $K_d \approx 10^{-6}$ M grâce notamment à un résidu histidine conservé [100]. L'autre composant, la GTPase HypB peut lier un ion nickel sur un site de haute affinité comportant le motif CXXCGC ($K_d \approx 10^{-12}$ M) et un autre de faible affinité ($K_d \approx 10^{-6}$ M) [101]. Le rôle exact de chacun de ces sites n'est pas encore bien compris. Il est supposé que HypB agisse sous forme de dimère pour

10. correspondant au complexe I de la chaîne respiratoire

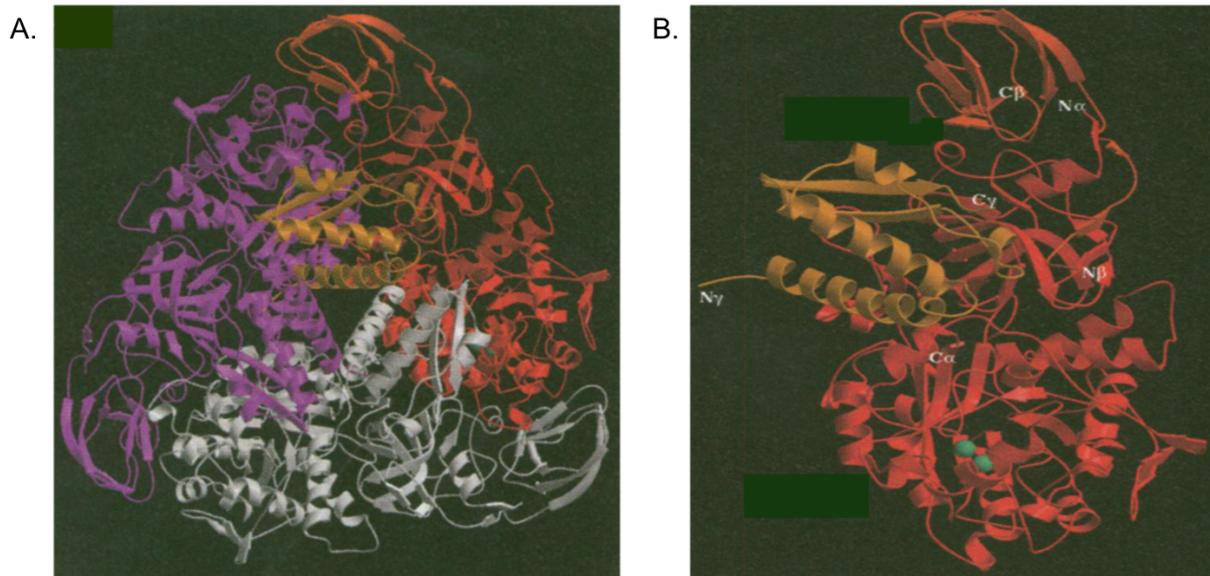


Figure 6 – Structure de l'uréase de *K. aerogenes*

A. Uréase active constituée d'un trimère des 3 sous-unités UreA, UreB et UreC, chaque monomère étant représenté en violet, rouge ou blanc. **B.** Détail d'un monomère avec UreA en jaune (sous-unité γ), UreB en orange (sous-unité β) et UreC en rouge (sous-unité α). Les extrémités de chaque sous-unité sont figurées et les ions Ni^{2+} sont représentés comme une sphère verte [87].

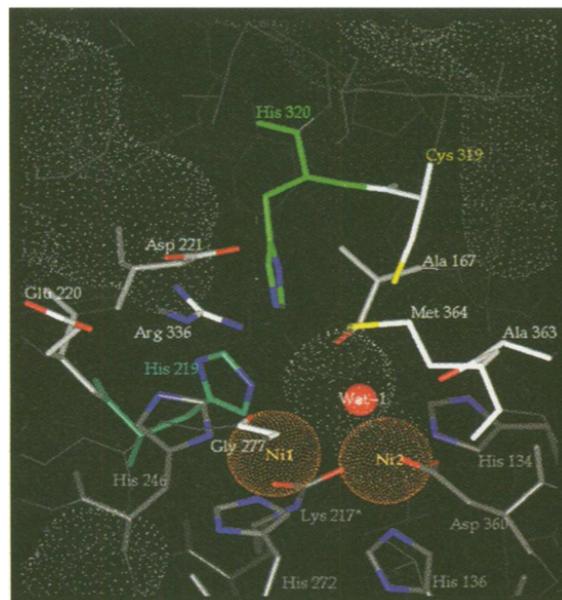


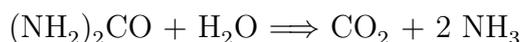
Figure 7 – Structure du site actif de l'uréase de *K. aerogenes*

Les sphères de coordination des différents ligands sont représentées par des pointillés. Les résidus importants pour l'interaction avec les atomes de nickel sont signalés. Wat-1 = molécule d'eau [87].

délivrer l'ion Ni^{2+} à l'hydrogénase, dimère dont la formation serait induite par l'hydrolyse du GTP [102, 103]. En plus de HypA et HypB, le transfert de l'ion Ni^{2+} implique un autre élément, SlyD. La protéine SlyD agit comme un chaperon qui se fixe à HypB et améliore l'efficacité du transfert de l'atome de nickel vers le site actif [104]. SlyD possède un domaine C-terminal particulièrement riche en résidus connus pour chélater les métaux avec quinze histidines, six cystéines et sept aspartates ou glutamates. De plus, une souche déficiente en SlyD accumule moins de nickel [105]. Suite à l'insertion de l'atome de nickel dans la grande sous-unité préalablement repliée grâce notamment à l'action des protéines chaperons GroES/GroEL [106], un clivage endoprotéolytique de la partie C-terminale peut avoir lieu [Figure 5 étape 5]. Celui-ci est réalisé par les protéases spécifiques HyaD, HybD et HycI respectivement pour Hyd1, Hyd2 et Hyd3 [107, 108, 109]. Enfin, la grande sous-unité ainsi maturée, s'associe avec la petite sous-unité pour former un hétérodimère qui, dans le cas de Hyd1 et Hyd2, est exporté vers le périplasma [77] sous forme repliée via la machinerie de translocation membranaire Tat [110].

2.2.6 Les uréases

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser l'urée en dioxyde de carbone et ammoniacque selon la réaction suivante :



Pour l'anecdote, l'uréase fut la première enzyme à être isolée sous forme de cristal à partir de graines du haricot *Canavalia ensiformis*. Ces cristaux obtenus en 1926 ont ainsi joué un rôle décisif dans la démonstration de la nature protéique des enzymes [112]. De plus, cette même enzyme a été identifiée presque 50 ans plus tard comme étant la première enzyme contenant du nickel et a ainsi permis d'attribuer le premier rôle biologique à cet élément [113].

Bien que les souches dérivées de *E. coli* K12 massivement utilisées dans les laboratoires n'en possèdent pas, les uréases à nickel sont largement retrouvées dans les souches entérohémorragiques comme la souche O157 : H7 [114] et sont de ce fait d'un intérêt tout particulier. Dans ces souches, les uréases permettent d'augmenter localement le pH pour assurer la survie des bactéries dans des conditions d'acidité prononcée comme dans l'estomac humain [115]. Le système le mieux caractérisé est celui de *Klebsiella aerogenes* mais son fonctionnement peut être extrapolé à celui présent chez *E. coli*. Le locus correspondant aux gènes de l'uréase est composé par sept gènes *ureDABCEFG* qui codent d'une part pour l'enzyme UreABC proprement dite [116] et pour quatre protéines accessoires requises pour l'activité biologique [117]. L'uréase est un trimère de trimères des protéines UreA, UreB et UreC [87] [Figure 6]. Elle contient trois sites actifs au total, chaque monomère ayant le sien. Ces sites possèdent chacun deux atomes de nickel [Figure 7]. L'un de ces atomes interagit avec trois ligands, deux azotes provenant de résidus histidine et un oxygène d'un résidu carbamyl-lysine [87]. La géométrie peut être décrite comme pseudotétrahédrique avec un quatrième ligand faiblement coordonné, ici une molécule

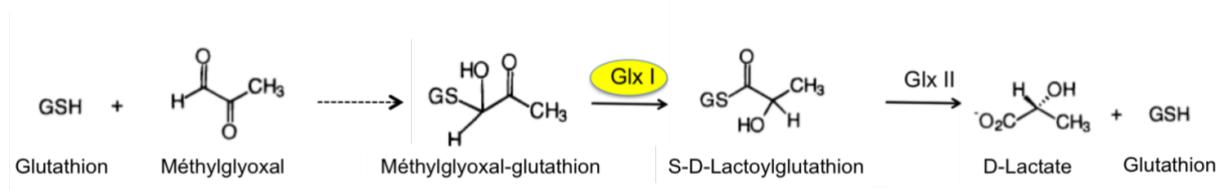


Figure 8 – Voie de dégradation du méthylglyoxal

Le méthylglyoxal, composé toxique, est transformé en lactate selon une voie métabolique impliquant deux enzymes. La première réaction est non enzymatique et consiste en la synthèse d'un hémithioacétal, le méthylglyoxal-glutathion. Puis, la glyoxalase I catalyse la conversion de ce composé en thioester, le S-D-lactoylglutathion. Celui-ci est ensuite hydrolysé en D-lactate et glutathion par la glyoxalase II. Les deux glyoxalases sont des métalloenzymes mais seule la glyoxalase I contient du nickel [111].

d'eau. L'autre atome de nickel interagit avec cinq ligands, deux azotes de résidus histidines et trois oxygènes provenant d'un aspartate, de la molécule d'eau et du même résidu carbamyl-lysine que le premier atome de nickel. La géométrie peut ici être considérée comme trigonal-bipyramidale [87].

Au niveau de la maturation de l'enzyme, le mécanisme n'est que partiellement élucidé à l'heure actuelle. Bien que les quatre protéines UreD, UreE, UreF et UreG soient requises pour la maturation de l'uréase, une très faible activité uréase vingt fois inférieure à la normale peut toutefois être détectée en absence de ces protéines accessoires chez *B. subtilis* [118]. Il est proposé que UreD agirait en tant que chaperon pour stabiliser l'uréase afin d'incorporer le nickel plus aisément [119]. La formation de ce complexe UreD-UreABC serait la première étape du processus permettant la formation ultérieure de complexes avec UreF et UreG [120]. UreF serait capable de moduler l'activation de l'uréase en empêchant la liaison des atomes de nickel aux protéines inactives non carbamylées [121]. Les protéines UreD et UreF ont donc essentiellement un rôle de chaperon permettant à l'apouréase UreABC d'être correctement conformée pour être chargée par le nickel. Quant à UreG, elle possède 25 % de similarité avec la GTPase HypB intervenant dans la maturation des hydrogénases [voir 2.2.5] mais contrairement à celle-ci, elle ne semble pas fixer directement de molécules de GTP ou d'ATP *in vitro* [122]. Toutefois, son site de reconnaissance des nucléotides est requis pour son activité *in vivo* ce qui laisse supposer une telle interaction dans ces conditions [123]. Mais la question de la contribution de la fixation et l'hydrolyse du GTP par UreG à la biosynthèse des uréases reste ouverte. Enfin, UreE est une protéine qui fixe directement les ions Ni^{2+} . Les propriétés de métallation de UreE ont fait l'objet de beaucoup d'études mais aucun modèle définitif n'a émergé actuellement. La protéine UreE de *B. pasteurii* peut fixer deux ions Ni^{2+} par dimère avec un K_d de l'ordre de 10^{-5} M. Le site d'interaction de l'ion Ni^{2+} n'est pas exactement décrit mais il met en jeu au moins trois résidus histidines dont un est strictement conservé [124]. Chez *K. aerogenes*, UreE fixe les ions Ni^{2+} à raison de six atomes par dimère avec un K_d également de l'ordre de 10^{-5} M [125]. Cette protéine a la particularité de posséder un domaine C-terminal particulièrement riche en résidus histidines (10 résidus sur 15). Ceux-ci seraient impliqués dans la chélation des ions Ni^{2+} [126]. Ils constituent toutefois une spécificité de *K. aerogenes* et la stœchiométrie la plus fréquente est celle de deux ions Ni^{2+} par dimère [127]. A l'inverse des trois autres protéines accessoires, UreE n'est pas strictement nécessaire à l'activité uréase *in vivo*.

2.2.7 La glyoxalase I

Cette enzyme intervient dans la voie de dégradation des α -cétoaldéhydes [Figure 8]. Le plus important de ces composés est le méthylglyoxal qui est surtout généré par la dégradation des trioses phosphate [128]. Il a été montré que le méthylglyoxal pouvait engendrer une certaine cytotoxicité de par la formation de liaisons covalentes avec l'ADN [129] mais également avec les résidus lysine et arginine des protéines [130]. La glyoxalase I (GlxI) présente chez des eucaryotes tels *Homo sapiens* ou *Saccharomyces cerevi-*

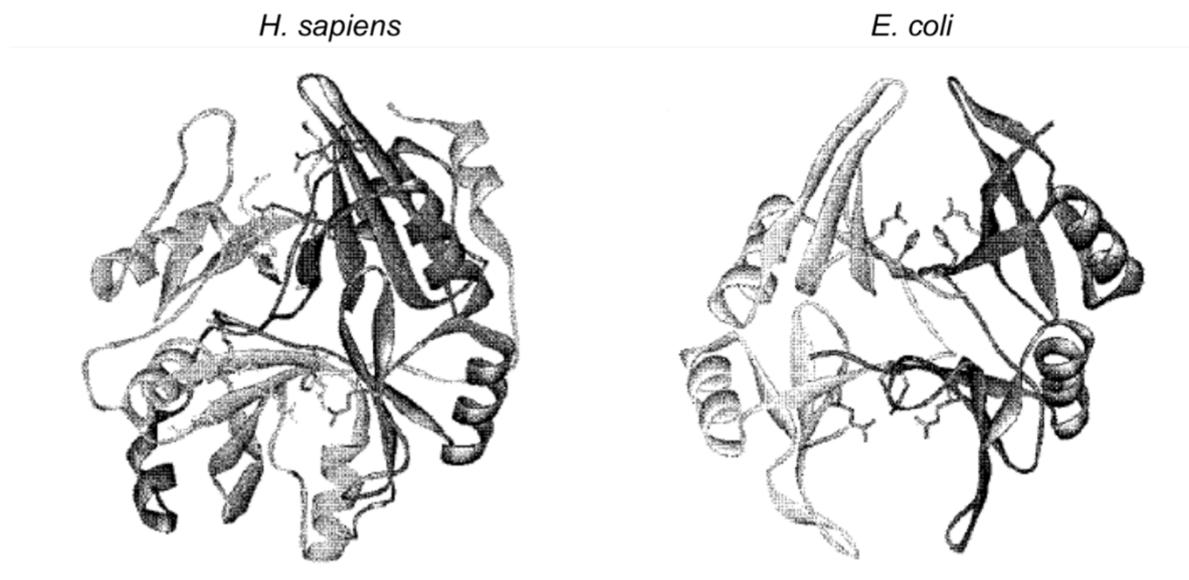


Figure 9 – Les enzymes GlxI de *H. sapiens* et *E. coli*

Structure tridimensionnelle de cristaux de la glyoxalase I de *H. sapiens* et *E. coli* [128]

siae et chez certaines bactéries comme *Pseudomonas putida* est activée par la fixation d'un ion Zn^{2+} par monomère [131, 132]. A l'inverse, l'activité de l'enzyme de *E. coli* est préférentiellement stimulée par la fixation d'un ion Ni^{2+} par monomère [111]. Malgré cette différence, les deux types d'enzymes partagent la même structure dimérique et sont proches du point de vue de la séquence et de la conservation du site actif. Ainsi, les protéines GlxI de *E. coli* et *H. sapiens* partagent 36 % d'identité et trois résidus interagissant avec l'ion métallique sur quatre [133]. Chez *H. sapiens*, le zinc est coordonné par les résidus Gln33, Glu99, His126 et Glu172 et deux molécules d'eau dans une géométrie octaédrique alors que chez *E. coli*, ce sont les résidus His5, Glu56, His74, Glu122 et deux molécules d'eau qui coordonnent le nickel dans une géométrie octaédrique [Figure 9]. La raison de cette sélection d'un métal différent pour les deux enzymes n'est toujours pas clarifiée à l'heure actuelle.

2.2.8 Les autres enzymes à nickel

Les trois familles d'enzymes précédentes sont les seules protéines à nickel identifiées chez *E. coli* à ce jour et sont largement distribuées dans le règne bactérien. Mais, il existe d'autres familles de protéines utilisant le nickel comme cofacteur qui ne sont pas retrouvées chez *E. coli*.

Tout d'abord, la superoxyde dismutase, enzyme chargée de transformer l'anion superoxyde (O_2^-) extrêmement toxique en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. De nombreuses dismutases de cet anion sont connues pour fixer du cuivre, du zinc, du fer ou encore du manganèse. Mais, l'une de ces enzymes, retrouvée notamment dans les bactéries du genre *Streptomyces* et codée par le gène *sodN*, a la particularité de contenir du nickel [139]. La structure tridimensionnelle de cette protéine a depuis été résolue et il a été montré que le nickel est sous forme Ni(III) et coordonné par une histidine et deux cystéines [140].

La déshydrogénase spécifique du monoxyde de carbone catalysant l'oxydation réversible de monoxyde en dioxyde de carbone a également été montrée comme étant une protéine à nickel chez *Rhodospirillum rubrum* [141]. L'atome de nickel est, dans ce cas, coordonné par une cystéine et trois atomes de soufre d'un même centre fer-soufre [142]. De manière intéressante, dans cet organisme, une autre protéine, CooC, proche en séquence des protéines HypB et UreG et deux autres, CooJ et CooT, fixant le nickel sont impliquées dans la maturation de cette enzyme même si le processus n'est pas encore caractérisé [143, 144].

Une autre enzyme originale est également connue pour fixer le nickel. Il s'agit de l'acétylCoA synthase / décarbonylase. Cette enzyme peut en effet, chez les bactéries acétogènes, réduire le CO_2 en CO au niveau d'un site actif pour former du coenzyme A à un autre site alors que chez les bactéries méthanogènes, elle assure la réaction inverse en décomposant le coenzyme A et oxydant le CO en CO_2 . Les deux sites actifs contiennent du nickel et ressemblent à ceux des déshydrogénases spécifiques du monoxyde de carbone [145]. Le nickel y est présent sous forme Ni(I) coordonné par un noyau tétrapyrrole dans le méthyl-coenzyme M. Celui-ci, associé à une réductase, permet la production de méthane

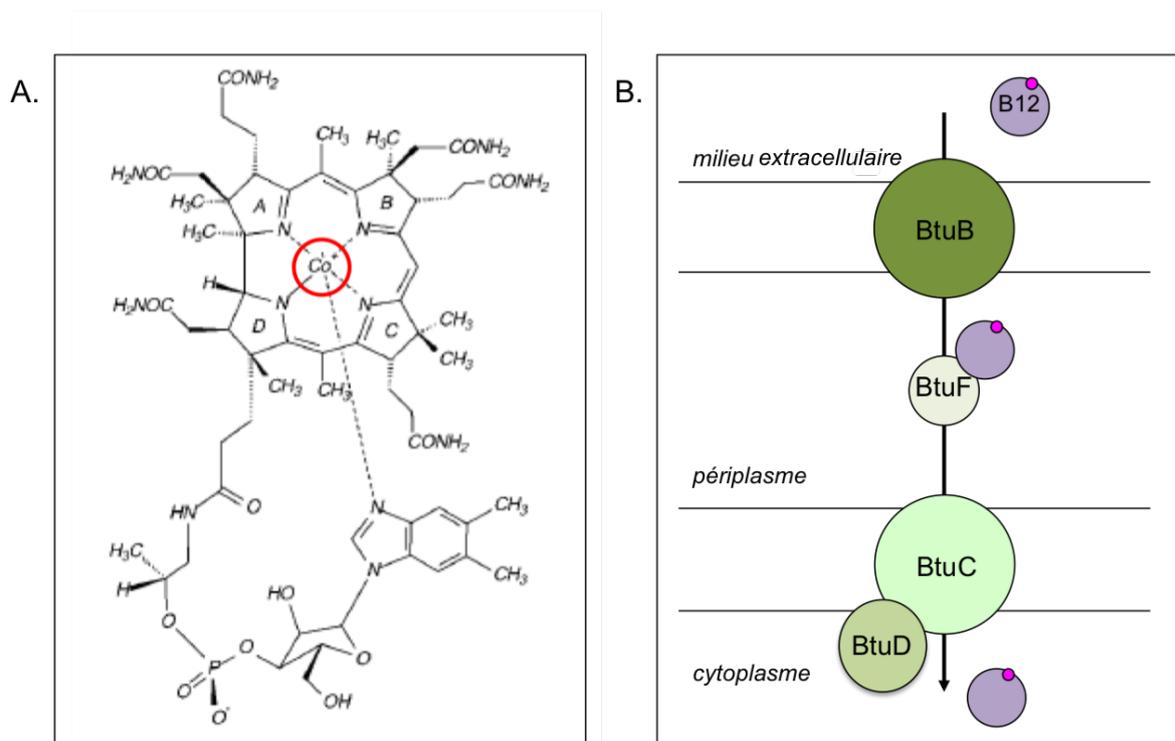


Figure 10 – Structure et import de la cobalamine

A. Structure de la vitamine B12. L'ion Co^{2+} est entouré en rouge. Il est principalement coordonné par quatre atomes d'azote de cycle pyrrole au sein d'un noyau corrine [134]. **B.** Import de la cobalamine par le système Btu chez *E. coli*. La porine BtuB permet le franchissement de la membrane externe par la vitamine B12 qui est prise en charge par BtuF dans le périplasme. BtuF peut ensuite interagir avec BtuC pour permettre l'import dans le cytoplasme, l'énergie étant fournie par l'ATPase BtuD. L'ion cobalt est figuré par un point magenta [135, 136, 137, 138].

chez les archées méthanogènes [146].

Enfin, une dioxygénase catalysant la dégradation d'un sous-produit du métabolisme de la méthionine, l'aci-réductone, est décrite comme possédant un atome de nickel dans son site actif chez *Klebsiella pneumoniae* [147]. Des expériences portant sur ce site ont montré que le nickel était coordonné par trois histidines et trois autres ligands azotes ou oxygènes non identifiés [148].

Toutes ces protéines constituent autant d'exemples de sites actifs différents liant du nickel. La majorité d'entre eux met en jeu quatre ou six ligands ce qui confirme les données du tableau 4.

2.3 Importance du cobalt dans le métabolisme bactérien

Le métabolisme du cobalt dans la cellule de *E. coli* repose sur son rôle au cœur de la vitamine B12 (cobalamine) [Figure 10 A.] qui nécessite la coordination d'un ion Co^{2+} pour fonctionner.

2.3.1 Import des ions cobalt dans les cellules

Des transporteurs spécifiques du cobalt ont été recensés chez de nombreuses bactéries. Ceux-ci appartiennent surtout aux familles des NiCoT ou des transporteurs ECF [voir 2.2.1]. Ainsi, le transporteur ECF *cbiMNOQ* est très largement répandu [52]. Le transporteur du magnésium *CorA* est également capable de transporter le cobalt¹¹ [151].

Chez *E. coli*, aucun système d'import du cobalt sous forme Co^{2+} n'a encore été caractérisé. Cependant, en plus du transporteur aspécifique *CorA*, cette bactérie possède le transporteur du zinc *ZupT* qui est capable de prendre en charge les ions Co^{2+} lorsque ceux-ci sont en excès [152]. Il est toutefois peu probable que, en conditions physiologiques, ces transporteurs puissent transporter les ions Co^{2+} étant donnée leur faible affinité pour ces ions et les quantités très faibles de cobalt biodisponible dans les milieux naturels [Tableau 5].

En revanche, *E. coli* est capable d'importer la vitamine B12 qu'elle ne peut pas synthétiser *de novo* [Figure 10 B.]. Le cobalt n'ayant pour l'heure aucune autre fonction clairement établie, ce transport peut avoir une grande importance. Une porine de la membrane externe, *BtuB* est capable de fixer la cobalamine avec une forte affinité ($K_d \approx 10^{-9}$ M), le transport étant couplé au gradient de protons par l'intermédiaire du complexe *TonB-ExbB-ExbD* [135]. Le franchissement de la membrane interne est effectué grâce à un système ABC très proche du système *Nik*. Celui-ci est codé par l'opéron *btuCED* où *BtuC* est le composant transmembranaire et *BtuD* est la sous-unité possédant l'activité ATPase [136]. Le composant périplasmique n'est pas codé par *btuE* dont la fonction est inconnue mais par le gène isolé *btuF*. La protéine *BtuF* possède une affinité comparable à celle de *BtuB* pour la cobalamine et une structure proche de celle de *NikA* mais plus

11. le nom *CorA* vient d'ailleurs de là (Cobalt-résistance) car les bactéries présentent un phénotype de résistance au cobalt accru lorsque ce transporteur est muté

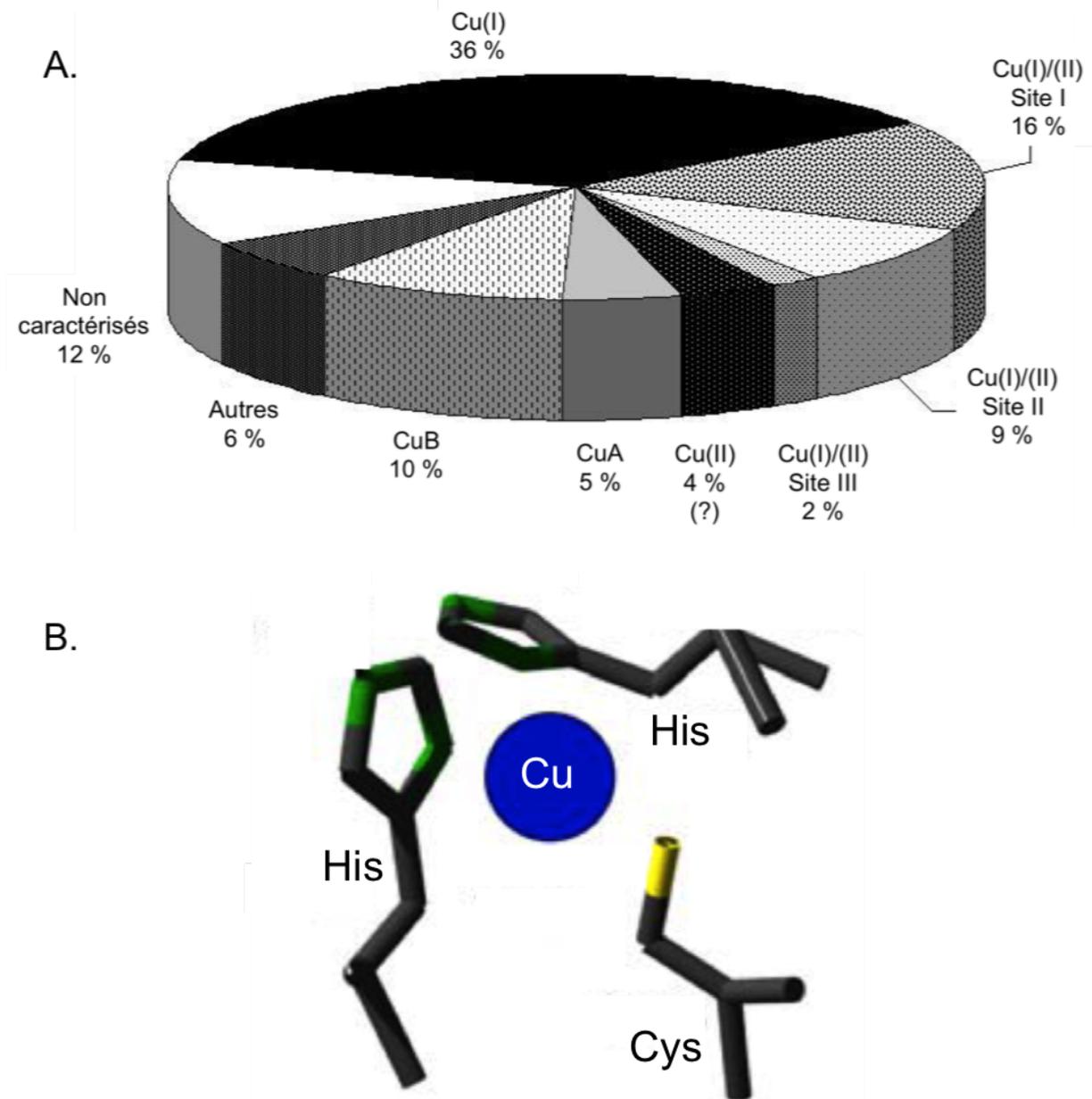


Figure 11 – Les différents sites de fixation du cuivre dans les protéines

A. Les pourcentages de chacun des sites de fixation du cuivre dans les protéines répertoriées dans les bases de données comme protéines à cuivre sont indiqués [149]. **B.** Structure minimale d'un site I de liaison du cuivre aux protéines. L'atome Cu est représenté en bleu, les atomes d'azote des histidines en vert et l'atome de soufre de la cystéine en jaune [150].

ouverte du fait de la taille plus importante de son substrat [137, 138].

2.3.2 Rôle des ions cobalt dans les cellules

E. coli possède de nombreuses enzymes contenant la vitamine B12 comme cofacteur. Parmi les plus importantes figurent la méthionine synthase ou encore la méthylmalonyl-CoA mutase [153]. En revanche, l'existence d'enzymes possédant un ion Co^{2+} coordonné directement par des résidus d'acides aminés n'est pas formellement démontrée. En effet, certaines enzymes ont été annotées comme des protéines à cobalt sur la base d'études *in vitro* comme la méthionine aminopeptidase [154]. Pour cette enzyme, une étude *in vivo* ultérieure a permis de démontrer que le fer était en fait un cofacteur plus probable [155]. D'autres exemples existent mettant en doute un rôle physiologique du cobalt autre que celui joué dans la cobalamine chez *E. coli*. En revanche, il existe quelques enzymes dont le site actif contient un site actif à cobalt chez d'autres bactéries même si là encore, la nature du métal en conditions physiologiques est discutée.

2.4 Importance du cuivre dans le métabolisme bactérien

Les protéines fixant du cuivre représentent moins de 1 % de toutes les protéines connues et la majorité de celles-ci fixent les ions cuivreux (Cu^+). Seuls les membres de la famille des oxydoréductases possèdent un atome de cuivre alternant entre les formes ion cuivreux et ion cuivrique (Cu^{2+}). De même, aucune protéine fixant un ion uniquement stable à l'état cuivrique n'a été identifiée à ce jour [157]. Les ions cuivreux sont très mous selon le principe HSAB déjà évoqué et réagissent donc préférentiellement avec les ligands soufrés comme les résidus cystéine et méthionine [Tableau 2]. Par ailleurs, le cytoplasme des bactéries à gram-négatif est plutôt réducteur de par la présence de glutathion en quantité importante (de l'ordre de 10^{-3} M). Le cuivre aura donc plutôt tendance à être sous forme d'ions cuivreux complexés par les groupements thiols du glutathion et des cystéines. A l'inverse, le périplasme est plus oxydant et les résidus méthionines seront donc plus utilisés, les cystéines ayant tendance à former des ponts disulfure dans un tel environnement [158, 159]. Un site d'interactions protéine - cuivre est cependant fréquemment composé des trois ligands donneurs (S, O et N). Le nombre de ces ligands varie pour le cuivre entre deux et six, trois étant le plus commun [149]. Les ligands les plus fréquents sont les cystéines et les histidines (65 %) puis les méthionines (15 %), les glutamates (7 %) et les aspartates (6 %) [157]. De nombreux sites de liaison du cuivre ont été décrits [Figure 11 A.]. Parmi eux, les sites I, II et III sont fréquemment retrouvés dans des protéines impliquées dans des processus d'oxydo-réduction. Ils diffèrent par leurs propriétés spectroscopiques résultant d'une géométrie de coordination différente [160, 161]. Le site le mieux caractérisé à l'heure actuelle est le site I. Celui-ci est toujours composé de deux ligands histidines et un ligand cystéine interagissant avec l'ion cuivre. La géométrie particulière de ce site conduit à une distance très courte entre l'atome de soufre donneur du résidu cystéine et l'atome de cuivre [Figure 11 B.]. Il en résulte une interaction très forte entre ces deux atomes qui

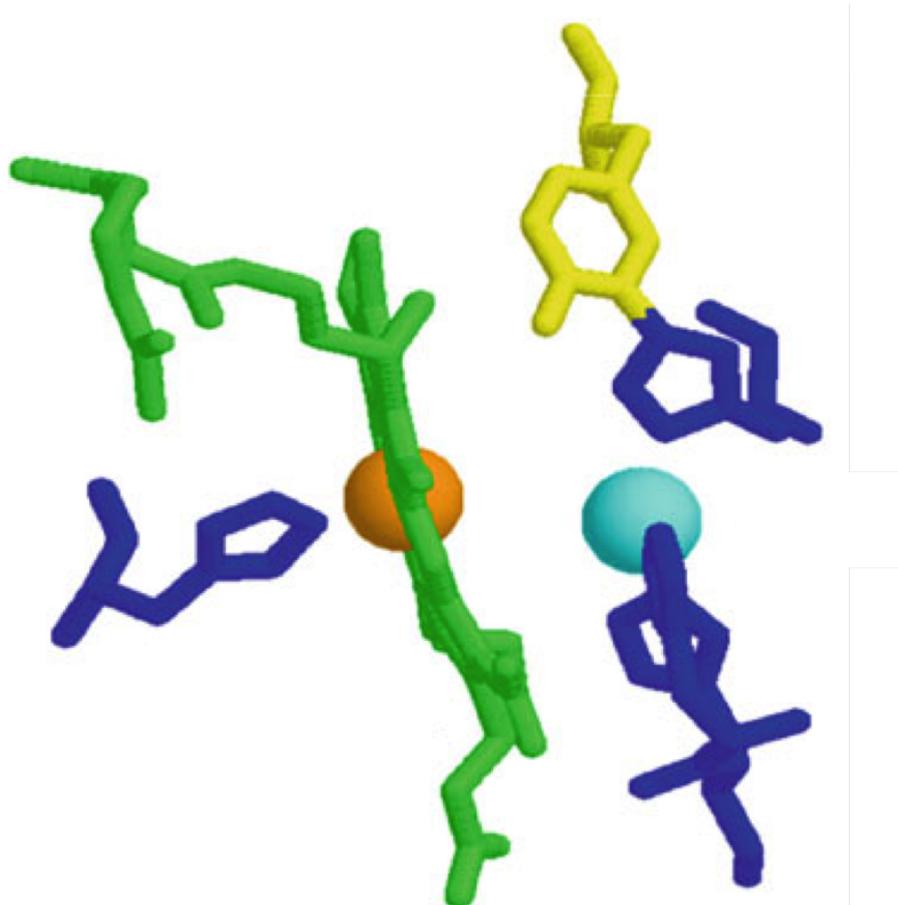


Figure 12 – Structure du site CuB des oxydases hème-cuivre

L'exemple présenté ici est le site CuB du cytochrome *bo*₃ de *E. coli*. Le noyau hémique est représenté en vert tandis que les résidus histidines sont en bleu et le résidu tyrosine en jaune. L'atome de cuivre apparaît en cyan et l'atome de fer en orange [156].

se traduit par une bande d'absorption à une longueur d'onde de ≈ 600 nm et une intense coloration bleue. Ainsi, les protéines possédant un site I ont été dénommées protéines à cuivre bleues [162]. Dans la moitié des sites I recensés, un résidu méthionine intervient comme quatrième ligand [163]. Les sites II et III sont beaucoup moins connus, le site II ne possédant qu'un seul atome de cuivre alors que le site III est un site binucléaire [150]. Le site CuA est quant à lui retrouvé dans certaines oxydo-réductases. Il s'agit d'un site binucléaire présentant une forte symétrie de coordination. En plus d'une liaison Cu-Cu, deux résidus cystéines sont liés à chacun des deux atomes métalliques. Une méthionine et un quatrième ligand¹² complètent la sphère de coordination [164]. Quant au site CuB, il est lui-aussi binucléaire et est composé d'un cofacteur hème et d'un atome de cuivre. Ce dernier est coordonné par trois résidus histidines [Figure 12].

2.4.1 Entrée du cuivre dans les cellules

Chez les eucaryotes, le cuivre est nécessaire dans le cytoplasme pour la synthèse d'enzymes à cuivre comme l'oxydase du cytochrome C localisée dans les mitochondries et des systèmes de transport du cuivre comme Ctr1 existent donc [165]. Pour les bactéries, il n'y a pour l'heure aucune protéine cytoplasmique caractérisée comme nécessitant la fixation de cuivre pour fonctionner. Les cuproenzymes identifiées sont localisées dans la membrane plasmique ou le périplasma. Il n'y a donc pas nécessairement besoin que le cuivre pénètre dans le cytoplasme. Pour cette raison, très peu de transporteurs permettant l'import de cuivre sont décrits chez les bactéries. Le transporteur CtaA appartenant à la famille des ATPases de type P permet l'entrée du cuivre dans le cytoplasme chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 [166]. De plus, un homologue de ce transporteur, l'ATPase CopA existe chez la bactérie à gram-positif *Enterococcus hirae* [167]. Récemment, une autre ATPase dénommée HmtA chez *Pseudomonas aeruginosa* a été identifiée comme permettant également le transport du cuivre [168]. Chez la bactérie à gram-positif *B. subtilis*, la protéine membranaire YcnJ est fortement induite par le cuivre et un mutant n'exprimant plus le gène *ycnJ* accumule moins de cuivre. De plus, la partie N-terminale de la protéine localisée vers le milieu extérieur possède de l'affinité pour les ions cuivreux et cuivriques. Cette protéine est donc un bon candidat pour être un système d'import du cuivre [169]. En revanche, chez *E. coli*, aucun système n'est décrit à ce jour.

2.4.2 Le cuproprotéome

48 % des protéines à cuivre ont un rôle dans le transfert d'électrons et 44 % ont un rôle dans l'homéostasie et le stockage du cuivre lui-même [149]. Le cuproprotéome est composé par l'ensemble des protéines qui nécessitent un ou plusieurs atomes de cuivre pour assurer leur fonction mais n'inclut pas les transporteurs, les protéines de stockage et les protéines chaperons. Une analyse génomique récente portant sur 450 organismes bactériens a montré que la grande majorité (72 %) possédait au moins une protéine à

12. méthionine ou glutamate

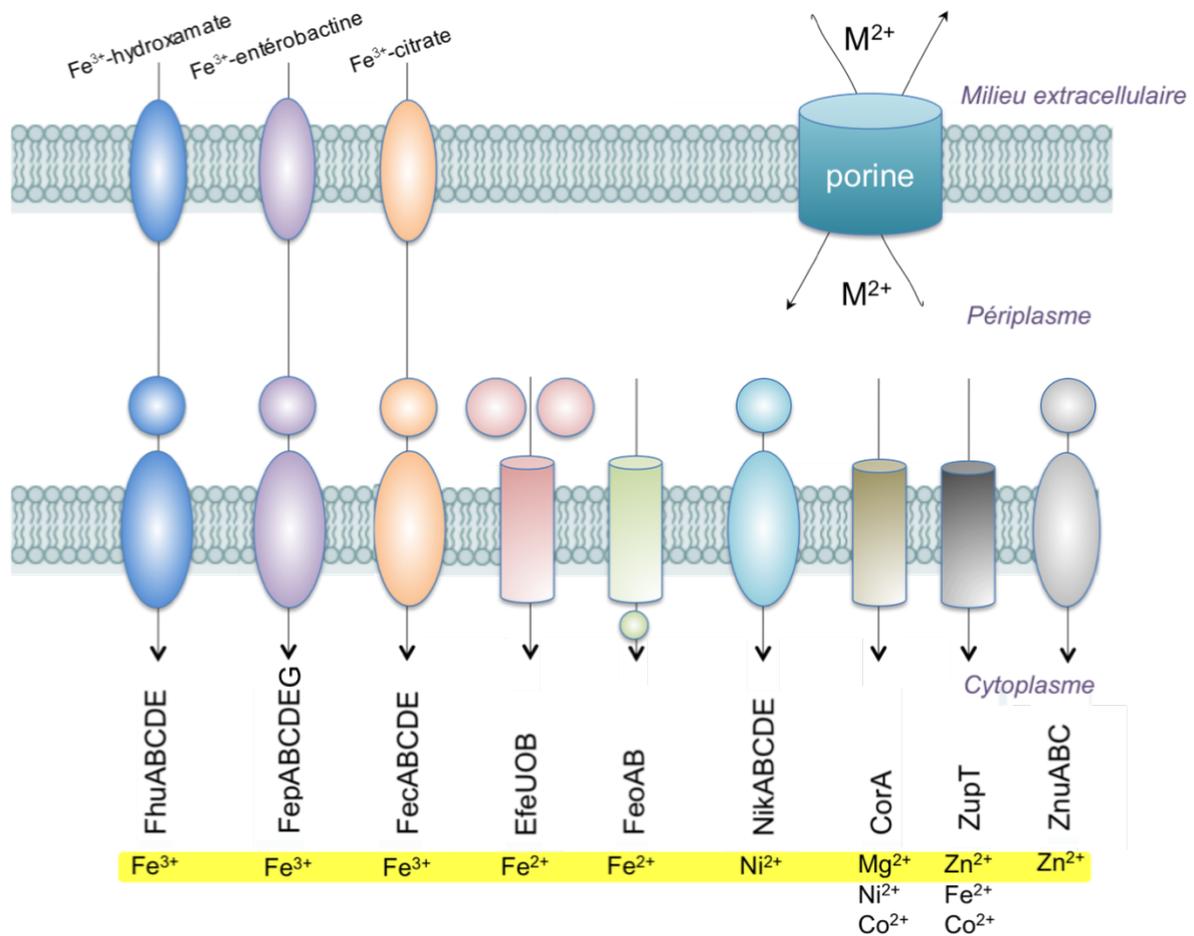


Figure 13 – Les principaux systèmes d'import des éléments traces chez *E. coli*

Les différents transporteurs impliqués dans l'import des éléments traces sont : Fhu (ferric hydroxamate uptake) [170], Fep (ferric enterobactin-transporting protein) [171], Fec (ferric dicitrate transport system) [172], Efe (elemental ferrous iron uptake) [173], Feo, (ferrous iron-uptake system) [174], Nik (Nickel uptake) [41], CorA (Cobalt resistance) [151], ZupT (zinc-uptake transporter) [175] et Znu (zinc uptake) [176]. Les transporteurs de type ABC sont figurés par des ovales, les cylindres symbolisant les autres transporteurs. Le substrat préférentiel de chaque transporteur est surligné en jaune et les métaux transportés secondairement sont indiqués également. M^{2+} fait référence à tous les cations métalliques dont l'étape du franchissement de la membrane externe n'est pas connue. Figure adaptée d'après [30].

cuivre [177]. La famille de cuproprotéines, de loin la plus répandue, est celle des oxydases hème-cuivre. Celles-ci sont les enzymes terminales de la chaîne respiratoire et permettent la réduction de l'accepteur final, le dioxygène, en eau. Le site catalytique de ces enzymes est un site CuB. En plus de ce centre hème-cuivre, ces enzymes possèdent un autre noyau hémique et parfois un site CuA¹³ qui permettent le transfert d'électrons vers le site CuB et jouent un rôle dans la reconnaissance du substrat [178]. Outre cette famille d'enzymes, les déshydrogénases spécifiques du NADH et quelques membres de la famille des dismutases de l'anion superoxyde sont des cuproenzymes retrouvées de manière significative dans bon nombre de bactéries (> 20 %). La très large majorité des protéines qui répondent à cette définition du cuproprotéome appartiennent à la famille EC1 des oxydo-réductases et sont majoritairement retrouvées chez les organismes aérophiles [177].

2.5 Le transport des ions métalliques chez *E. coli*

La bactérie *E. coli* est probablement l'un des organismes les mieux connus à l'heure actuelle et de nombreux transporteurs de métaux de la catégorie éléments-traces sont identifiés [Figure 13]. La majorité d'entre eux est impliquée dans le transport des ions fer dont la biodisponibilité extrêmement faible nécessite l'intervention de sidérophores. Pour le nickel et le zinc, respectivement un et deux systèmes sont connus. Pour le cobalt en revanche, aucun transporteur spécifique de la forme ionique n'a été mise en évidence et il est possible que le système Btu soit la seule source de ce métal. Toutefois, il reste de nombreux gènes de fonction inconnue chez *E. coli* et il n'est pas impossible que d'autres transporteurs soient mis à jour dans le futur.

2.6 Résumé

Les ions métalliques ont des caractéristiques physico-chimiques qui permettent aux enzymes d'assurer diverses fonctions biologiques. Chaque métal interagit différemment avec les résidus d'acides aminés et module ainsi la réactivité des protéines. Chez *E. coli*, le nickel est surtout important pour la fonction des hydrogénases, le cobalt pour son rôle dans la vitamine B12 et le cuivre, grâce à ses propriétés d'oxydo-réduction, assure le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. De nombreux systèmes d'import, fréquemment des systèmes ABC, permettent l'approvisionnement des cellules en ions métalliques donnés. Ces transporteurs sont en général spécifiques d'une seule espèce d'ion métallique.

13. ce qui n'est pas le cas pour l'oxydase du cytochrome C de *E. coli* par exemple

Chapitre 3

Toxicité des ions métalliques et moyens de défense

3.1 Toxicité engendrée par les ions métalliques

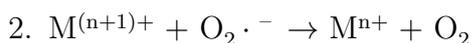
Bien que les ions métalliques soient nécessaires, la quantité intracellulaire de chaque métal se doit d'être très finement régulée pour empêcher une surcharge des cellules synonyme de toxicité. Cette toxicité peut revêtir différentes formes.

3.1.1 Les liaisons aspécifiques

Les mêmes caractéristiques qui font des métaux des oligoéléments essentiels à la vie cellulaire en font également des composés toxiques lorsque leur quantité devient trop importante. Cette toxicité résulte des propriétés physico-chimiques des ions métalliques et de leurs interactions avec les composants cellulaires. La toxicité d'un ion métallique est influencée par de nombreux facteurs abiotiques comme le pH ou la température mais également par la capacité du métal à entrer dans la cellule et les interactions qu'il pourra y effectuer. En effet, les composants cellulaires comme l'eau, les chaînes latérales des protéines ou les acides nucléiques sont des ligands potentiels des métaux. D'une manière générale, plus un atome sera mou, plus l'interaction avec ses ligands sera forte [7]. Ainsi, la plupart des métaux durs sont essentiels (Mg, Ca ou Na) tandis que les métaux intermédiaires (Ni, Co ou Cu) sont requis à l'état de traces et les métaux les plus mous sont toxiques (Ag, Cd ou Hg). Ces derniers ont une plus grande affinité notamment pour les composés soufrés et vont avoir pour effet, lorsque leur quantité sera trop importante, de bloquer les groupes fonctionnels de certaines molécules. Ainsi, il va se créer un phénomène de compétition avec les métaux essentiels plus durs et donc ayant moins d'affinité pour ces ligands. De plus, les métaux mous, thiophiles, peuvent interagir avec les résidus méthionines et cystéines. L'interaction avec ces derniers peut empêcher la création de ponts disulfure et donc affecter le repliement correct des protéines [5].

3.1.2 Métaux et stress oxydatif

Un autre aspect de la toxicité liée aux métaux est celui du stress oxydatif. En effet, les métaux peuvent générer ce stress en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction. En conditions physiologiques, les éléments principalement concernés sont le fer et le cuivre. Ceux-ci sont capables de générer le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) à partir d'espèces oxygénées réactives telles que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène normalement générées par les bactéries aérophiles du fait de leur utilisation du dioxygène au cours de la respiration. Les réactions de génération de ce composé sont décrits par les équations suivantes :



Le radical hydroxyle est très toxique car hautement réactif. Ainsi, il peut causer des cassures de brins d'ADN [179]. Ce radical libre peut également dégrader les acides gras ce qui déstabilise les membranes biologiques et conduit à la formation de molécules toxiques [180]. Enfin, il est capable d'oxyder les acides aminés notamment les chaînes latérales des résidus arginine, cystéine, histidine, lysine et proline et ainsi conduire à la fragmentation des protéines ou à des liaisons aspécifiques inter ou intramoléculaires [181, 182].

3.1.3 Notion de quantité toxique d'un métal

La quantité toxique d'un métal reste cependant relativement complexe à définir car elle ne sera considérée comme excessive et toxique que lorsque la croissance des bactéries sera affectée. Mais ce stade ne correspond qu'à un seuil critique où les mécanismes de défense et de réparation sont saturés et ne permettent plus de parer au stress métallique [183]. En réalité, les dommages causés aux composés cellulaires par les métaux commencent bien avant cette perte de viabilité pour des quantités de métaux beaucoup plus faibles.

3.2 Les stratégies de défense des bactéries

Les premiers microorganismes sont apparus dans les failles océaniques il y a environ 3,5 milliards d'années dans des conditions acides et de haute température favorisant une biodisponibilité importante des ions métalliques [185]. De ce fait, les systèmes de défense, prioritaires en terme d'évolution, sont probablement apparus indépendamment des systèmes d'acquisition. Pour lutter contre la toxicité engendrée par un excès de métal, les bactéries peuvent en premier lieu agir sur la régulation de l'import des métaux dans le cytoplasme via la répression de l'expression des gènes codant ces transporteurs spécifiques. Lorsque ceci n'est pas suffisant, six différents mécanismes de résistance existent [186, 187]. Les microorganismes peuvent posséder des systèmes de défense s'appuyant sur un seul ou une combinaison de ces mécanismes.

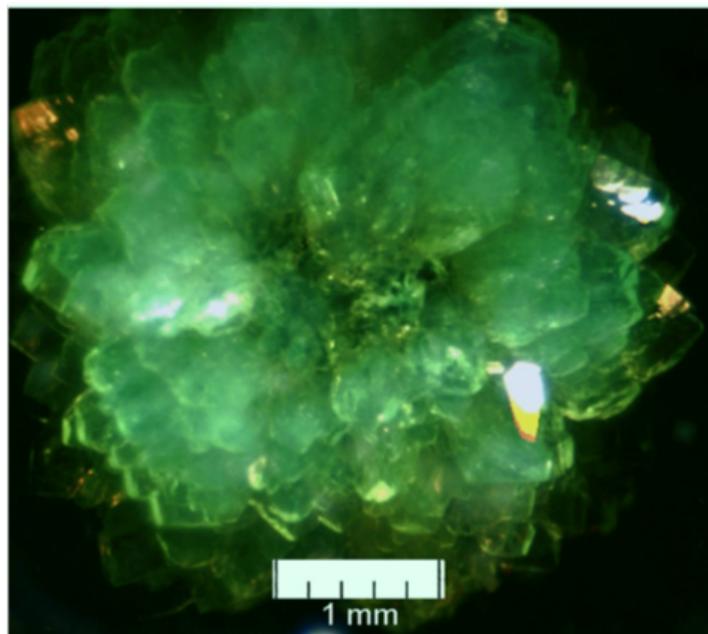


Figure 14 – Cristal de Ni-struvite produit par *Streptomyces acidiscabies* E13

D'après [184].

3.2.1 Exclusion du métal par l'imperméabilité membranaire

Les bactéries peuvent limiter l'entrée des métaux en empêchant ces derniers de pénétrer dans le cytoplasme. Ainsi, il a été montré par des études protéomiques portant sur *E. coli* qu'un stress par les ions Cd^{2+} provoquait une diminution de la synthèse de la porine OmpF [188]. Cette protéine étant supposée jouer un rôle majeur dans l'entrée des métaux dans le périplasme, la baisse de sa production aurait un impact sur l'accumulation intracellulaire des ions métalliques.

3.2.2 Séquestration intracellulaire des métaux par des protéines chélatrices

Ce mécanisme de défense repose sur la production de protéines chélatrices qui vont permettre de séquestrer l'excès d'ions métalliques et ainsi protéger les composants essentiels des cellules. L'exemple le mieux caractérisé est la production de métallothionéines par les cyanobactéries du genre *Synechococcus*. Cette famille de protéines est retrouvée en grand nombre chez les eucaryotes et a la particularité d'avoir une séquence primaire très courte et très riche en résidus cystéines¹ capable de chélater les ions métalliques en grande quantité, principalement les ions Zn^{2+} et Cd^{2+} et dans une moindre mesure les ions Cu^+ [189]. La métallothionéine des *Synechococcus* dénommée SmtA est plus pauvre en cystéines (9/56) et peut chélater quatre ions Zn^{2+} [190]. Des homologues de cette protéine existent chez d'autres organismes comme *P. aeruginosa* et *E. coli* mais avec des caractéristiques différentes² [191]. De plus, de petites protéines riches en résidus cystéines, apparentées à la famille des métallothionéines, ont été découvertes chez *P. putida* et leur rôle dans la résistance aux ions Cd^{2+} a été clairement établi [192]. Récemment, une nouvelle métallothionéine a été caractérisée chez la mycobactérie *Mycobacterium tuberculosis*. Celle-ci possède de nombreux résidus cystéines et histidines conservés chez d'autres homologues du genre *Mycobacterium* et protège les cellules contre la toxicité du cuivre en fixant six ions Cu^+ par monomère [193].

3.2.3 Séquestration extracellulaire des métaux

La résistance aux ions métalliques par séquestration extracellulaire est surtout répandue chez les levures et les champignons mais quelques exemples sont également recensés chez les bactéries. Ainsi, les couches exopolysaccharidiques de *K. aerogenes*, *P. putida* ou encore *Arthrobacter viscosus* sont capables de chélater certains métaux comme le cadmium, les empêchant ainsi de pénétrer dans le cytoplasme et augmentant significativement la résistance des bactéries à ces ions [194]. De façon plus originale, une souche de *Streptomyces acidiscabies* E13, isolée dans le sol d'une ancienne mine d'uranium allemande, est naturellement résistante à des niveaux élevés de nickel car ces bactéries sont capables de former des agrégats cristallins de nickel-struvite : $\text{Ni}(\text{NH}_4)(\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dans lesquels sont séquestrés les ions Ni^{2+} [Figure 14].

1. 60 acides aminés en moyenne dont le tiers sont des cystéines

2. un seul ion Zn^{2+} pour la protéine de *E. coli*

3.2.4 Détoxification enzymatique

Une autre voie de résistance à certains métaux est la transformation chimique d'un ion métallique toxique en une autre espèce moins nocive, en modifiant l'état d'oxydo-réduction par exemple. L'exemple le mieux caractérisé est celui de la résistance au mercure permise par l'opéron *mer* régulé par l'activateur MerR. Ce fut le premier système de résistance contre un métal découvert et il pourrait constituer le plus répandu dans tout le monde bactérien [195]. Il repose sur une protéine périplasmique soluble chez les bactéries à gram-négatif ou membranaire chez les bactéries à gram-positif dénommée MerP capable de lier les ions Hg^{2+} . Celle-ci peut ensuite transmettre ces ions au transporteur membranaire MerT qui peut prendre en charge les ions Hg^{2+} grâce notamment à des résidus cystéines conservés. D'autres protéines alternatives MerC et MerF sont également connues et fonctionnent sur le même principe que MerT [196]. Une fois dans le cytoplasme, les ions Hg^{2+} sont pris en charge par une réductase spécifique MerA qui va réduire ces ions en Hg^0 volatile [197]. Une autre enzyme, la lyase MerB est également présente chez certains organismes et permet de cliver les liaisons C-Hg retrouvés dans des composés formés naturellement. Des ions Hg^{2+} sont alors libérés qui pourront être pris en charge par MerA [195]. Un autre exemple de modification chimique est celle de la transformation des ions arseniate As(V) en ions arsénite As(III) par la réductase spécifique ArsC, ces derniers étant ensuite pris en charge par des systèmes d'efflux tels que ArsB [198].

3.2.5 Réduction de la sensibilité des cibles cellulaires

Certains microorganismes s'adaptent à la présence de quantités toxiques de métaux en atténuant la sensibilité de composants cellulaires essentiels [186]. Dans ce cas, des mutations ponctuelles peuvent diminuer la sensibilité des cibles sans altérer la fonction biologique. Un tel mécanisme d'adaptation a été identifié chez *E. coli* il y a de nombreuses années. Ainsi, des cellules exposées ponctuellement à un stress dû aux ions Cd^{2+} montrent un taux important de dommages à l'ADN [199]. Cependant, après plusieurs sous-cultures successives dans ces mêmes conditions, les bactéries acquièrent une certaine résistance. Les auteurs suggèrent que les mécanismes de réparation de l'ADN seraient plus efficaces chez les cellules adaptées, leur ADN étant donc devenu moins sensible aux ions Cd^{2+} [200].

3.3 Transport actif du métal vers le milieu extérieur : mécanisme d'efflux

L'efflux des cations métalliques vers l'extérieur est sans conteste la catégorie la plus large des mécanismes de résistance contre les métaux. Les systèmes d'efflux sont fréquemment codés par des gènes présents sur des plasmides. Il est supposé que ceci permette une mobilisation rapide et coopérative entre les organismes d'une même communauté en cas de stress ainsi qu'une réduction du nombre de gènes portés par les cellules, ceux-ci n'étant nécessaires que dans certaines conditions [202]. Les exemples de systèmes d'efflux

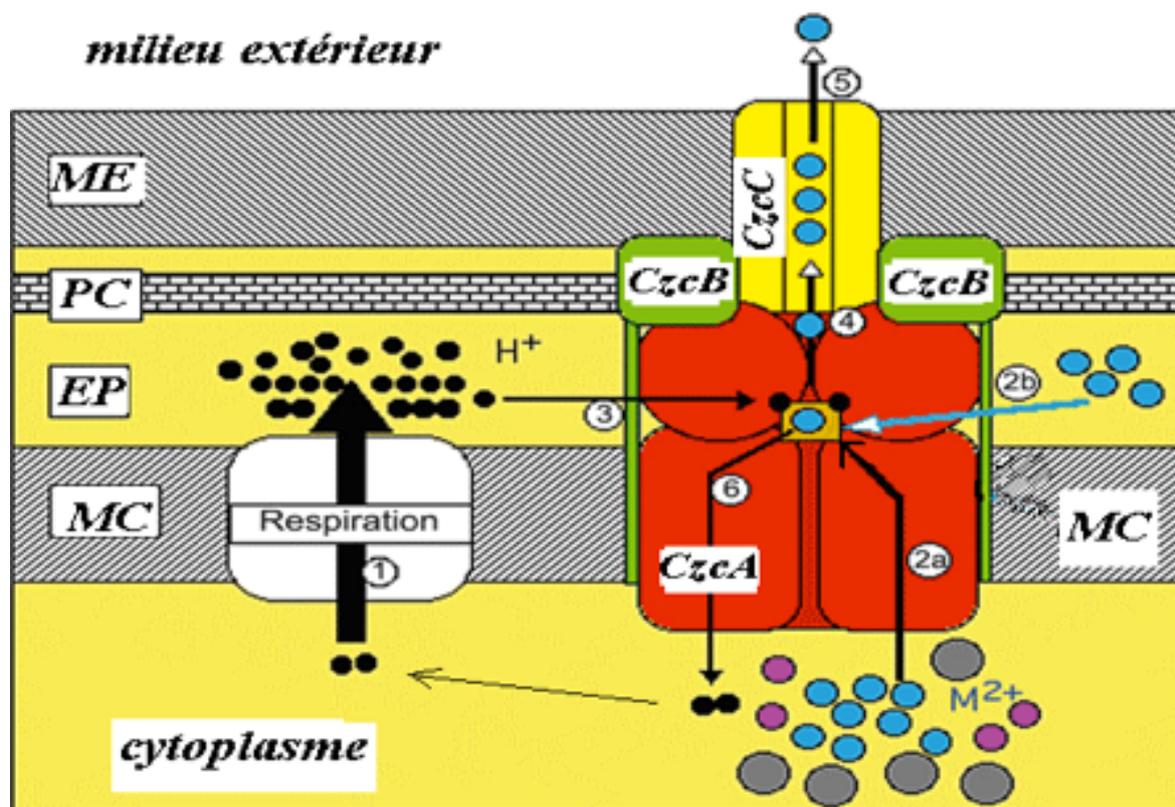


Figure 15 – Modèle de fonctionnement du système RND CzcCBA de *R. metallidurans* (2003)

La protéine RND (CzcA), ici en rouge, se présente sous forme de trimère avec un site de liaison du substrat (métal) au niveau central (carré orange). La protéine MFP (CzcB) est en vert et la protéine OMF (CzcC) en jaune. Les protons sont symbolisés par des points noirs et les métaux par des points bleus, violets ou gris selon leur nature. L'action des complexes d'efflux RND est de type antiport cations/protons, la force motrice provenant de la chaîne respiratoire (1). Les métaux sont pris en charge et acheminés vers une cavité centrale selon leur origine (2a et 2b). Puis, l'affinité du complexe est diminuée du fait de la protonation de ce site par les protons périplasmiques (3). Les ions métalliques migrent alors vers un microenvironnement aménagé par le trimère de CzcA (4) d'où ils seront évacués par simple diffusion au travers du canal formé par CzcC (5). Le métal est ainsi relargué dans l'environnement externe. Enfin, le site de liaison du métal est déprotoné afin de régénérer le système et les protons sont importés dans le cytoplasme (6). Grâce à ce complexe, un ion métallique présent en excès et pouvant donc présenter un danger pour le métabolisme peut franchir l'enveloppe complète des bactéries même celles très complexes de celles à Gram-négatives composées d'une membrane cytoplasmique (MC), d'un espace périplasmique (EP), d'une paroi cellulaire (PC) et d'une membrane externe (ME) [201].

de métaux sont très nombreux et peuvent être classés en trois catégories distinctes selon la source d'énergie utilisée et le nombre de protéines impliquées.

3.3.1 Les protéines de la famille RND

Les transporteurs RND³ appartiennent à une superfamille qui regroupe sept familles de protéines qui diffèrent du point de vue fonctionnel mais qui possèdent toutes des séquences voisines qui plaident en faveur d'un ancêtre commun [204]. La quantité de protéines RND varie beaucoup d'une espèce bactérienne à l'autre. Les archées ne possèdent pas de protéine RND tandis que les cyanobactéries et les protéobactéries ont généralement plusieurs exemplaires de cette famille [201]. Toutes les protéines RND sont impliquées dans le transport de composés divers allant des molécules amphiphiles aux molécules très hydrophobes. Ce sont des antiports cations/protons dirigés par la force protomotrice. La famille dédiée spécifiquement au transport des métaux a reçu le nom de famille HME-RND⁴. Bien qu'elles puissent exporter le métal seul *in vitro* [205], les protéines RND font partie d'un système tripartite *in vivo* et sont associées à des protéines auxiliaires. D'une part, des protéines périsplasmiques de jonction MFP⁵ qui permettent l'ancrage dans la membrane cytoplasmique ainsi que la jonction avec la membrane externe [206]. D'autre part, les protéines membranaires OMF⁶ [207]. Ces dernières sont des porines permettant le franchissement de la membrane externe par les métaux. Ces trois protéines forment un complexe d'efflux capable d'exporter les métaux vers l'extérieur de la bactérie.

Le premier membre de la famille RND impliqué dans la résistance aux métaux fut la protéine CzcA de *R. metallidurans* pour son rôle dans l'efflux des ions Co²⁺, Zn²⁺ et Cd²⁺ [208]. Celle-ci est une protéine de 115 kDa et l'analyse informatique de la séquence suggère la présence de douze domaines hydrophobes supposés être des hélices α trans-membranaires. Quelques résidus conservés ont été mis en évidence et notamment un motif DDE⁷. La mutation d'un seul de ces trois acides aminés hydrophiles et chargés négativement suffit pour entraîner un blocage du transit des protons et une perte de la résistance aux trois métaux Co²⁺, Zn²⁺ et Cd²⁺ [204]. Au niveau cinétique, le transport de Zn²⁺ par la protéine CzcA suit une courbe sigmoïde classique, c'est-à-dire avec une concentration-seuil en dessous de laquelle le métal n'est pas exclu, une gamme efficace pendant laquelle l'efflux du substrat augmente proportionnellement avec la quantité de celui-ci et une concentration saturante lorsque la quantité de métal dépasse les limites d'exclusion du système. Ces valeurs sont différentes en fonction du métal considéré. Cela s'explique par l'importance biologique différente de ces métaux. En effet, le zinc est beaucoup plus abondant que le cobalt et le cadmium, les bactéries possèdent donc plus de protéines à Zn²⁺ que de protéines à Co²⁺. La toxicité relative n'étant pas la même, les bactéries n'ont pas les mêmes seuils de tolérance pour des métaux différents.

3. Resistance-Nodulation-cell Division

4. Heavy Metal Efflux-RND

5. Membrane Fusion Protein

6. Outer Membrane Factor

7. Asp402-Asp408-Glu415

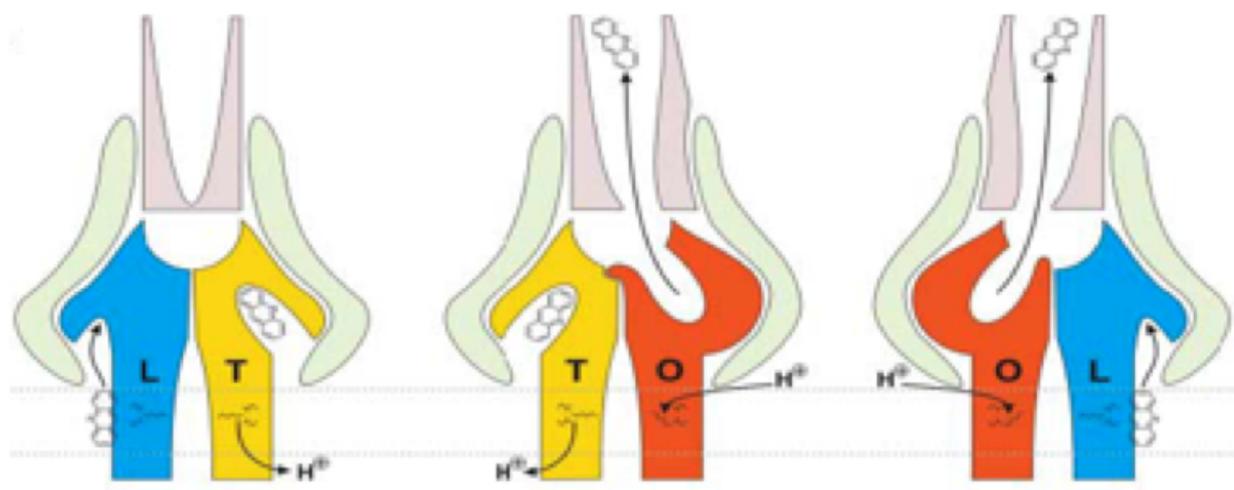


Figure 16 – Modèle de fonctionnement du système RND AcrAB-TolC de *E. coli* (2006)

Le substrat est représenté par une molécule tricyclique. Les trois monomères de AcrB sont représentés en bleu, jaune ou orange et les protéines AcrA et TolC respectivement en vert clair et violet clair. Chaque monomère de AcrB passe par trois états : L (loose = détendu), T (tight = bloqué) et O (open = ouvert) de manière cyclique. Le passage de l'état O à l'état L est celui qui réclame le plus d'énergie et donc la fixation d'un proton au niveau du site de fixation. Le passage de la forme T à la forme O s'accompagne du relargage d'un proton dans le cytoplasme. Les différentes formes de l'excavation représentent la faible (L), forte (T) ou l'absence (O) d'affinité pour le substrat. Le site de fixation du substrat se trouve ici être une poche située dans le périplasma bactérien [203].

L'identification des partenaires CzcB, la protéine MFP, et CzcC, la protéine OMF, a par la suite permis d'établir un premier modèle du système [Figure 15].

La région contenant le déterminant génétique *czc* se situe sur un mégaplasmide qui apporte un fort avantage évolutif puisqu'il démultiplie la résistance aux métaux⁸ [201]. Cette région contient les gènes pour l'OMF CzcC, la MFP CzcB et la protéine RND CzcA. Ces trois gènes forment l'opéron *czcCBA*. De plus, cet opéron est flanqué de nombreux gènes impliqués dans la régulation métal-dépendante de l'expression de *czcCBA* dont un système de régulation à deux composants senseur-régulateur [209]. Comme dans tous les systèmes de régulation de ce type, le détecteur de la membrane interne CzcS peut intégrer le signal environnemental⁹ et s'autophosphoryler sur un résidu histidine conservé grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Cette forme activée de CzcS pourra alors phosphoryler à son tour le régulateur cytoplasmique CzcR permettant ainsi son interaction avec l'ADN et donc la transcription de l'opéron *czcCBA* [210].

Le mécanisme d'action des systèmes RND a été affiné grâce à l'étude du système AcrAB-TolC d'*E. coli* [Figure 16]. Ce complexe transporte une large gamme de substrats¹⁰ et sa structure a ainsi été largement étudiée. La diffraction de cristaux à une résolution de 2,90 Å à trois états d'avancement différents du cycle de transport a mis à jour un mécanisme de type péristaltique pour le fonctionnement de cette pompe. Ainsi, la pompe est formée par un trimère de protéines AcrB dont chaque sous-partie monomérique se situe dans une conformation différente ce qui forme une structure asymétrique. Chaque monomère change d'état au cours de l'avancement du cycle ce qui crée la rotation fonctionnelle du trimère. De plus, la poche hydrophobe qui permet la liaison du substrat a pu être reconstituée ainsi que le trajet de ce substrat au sein du canal aménagé par la protéine AcrB [203]. Bien que le système AcrAB-TolC ne soit pour l'heure pas connu pour son rôle dans la résistance aux métaux chez *E. coli*, il a été montré qu'un mutant *tolC* de *Legionella pneumophila* avait une sensibilité accrue au nickel [211].

3.3.2 Les protéines de la famille CDF

A la différence des systèmes RND, les protéines CDF¹¹ sont exclusivement dédiées au transport des métaux et sont retrouvées dans les trois règnes du vivant, archées, bactéries et eucaryotes [213]. Toutes les protéines CDF ne possèdent pas la même efficacité de transport pour les ions métalliques. Cette efficacité varie en fonction du rayon atomique de l'ion considéré ainsi que de sa période de transition. Les CDF sont sélectives de cations de la première période de transition ayant un rayon de 74 pm (+/- 2 pm). Ceci inclut les ions Fe²⁺ (76 pm), Co²⁺ (74 pm), Zn²⁺ (72 pm) ou encore Ni²⁺ (74 pm) mais exclut des ions comme Mg²⁺ (65 pm) ou Cu²⁺ (69 pm) trop petits ou comme Hg²⁺ (110 pm) trop volumineux [9, 201]. Toutefois, il existe des exceptions comme les ions Cd²⁺ (97 pm) qui peuvent être pris en charge par les CDF, ceci s'expliquant par la proximité chimique des

8. $\times 50$ pour Zn²⁺ par exemple

9. ici la présence de métal

10. antibiotiques, détergents, colorants ou encore solvants

11. Cation Diffusion Facilitator

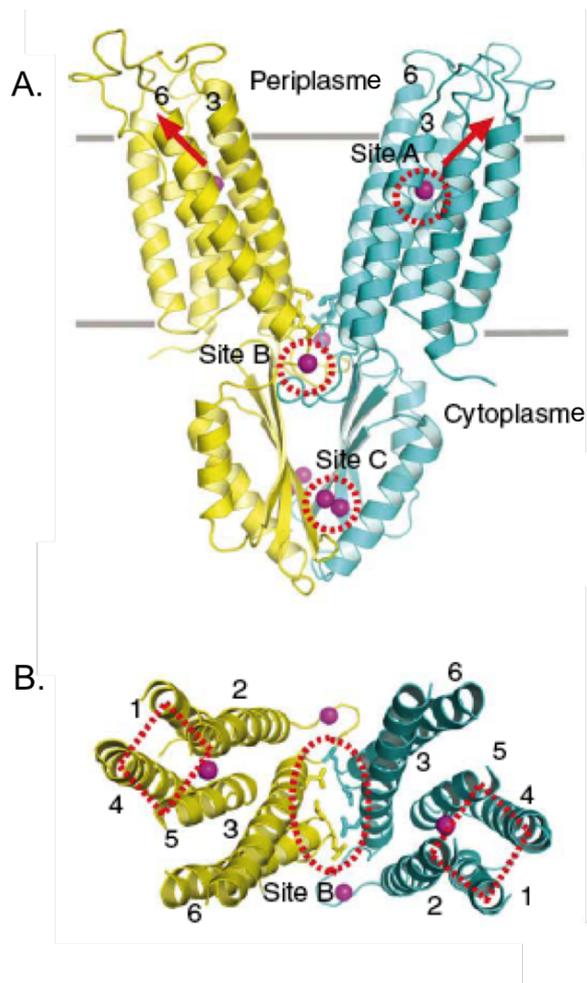


Figure 17 – Structure de la protéine YiiP de *E. coli*.

A. Vue longitudinale ou **B.** vue du périplasm d'un homodimère de YiiP. Chaque monomère est représenté en jaune ou cyan. Les sphères magenta entourées de rouge représentent les atomes de zinc liés. Les flèches rouges indiquent la sortie des ions Zn^{2+} des sites actifs. Pour la vue depuis le périplasm, les boucles ont été supprimées par souci de clarté. L'ovale rouge marque les interactions hydrophobes à l'interface des hélices membranaires du premier domaine qui permettent la dimérisation. Les losanges rouges indiquent le faisceau d'hélices α . Les chiffres font référence aux hélices du domaine hydrophobe [212].

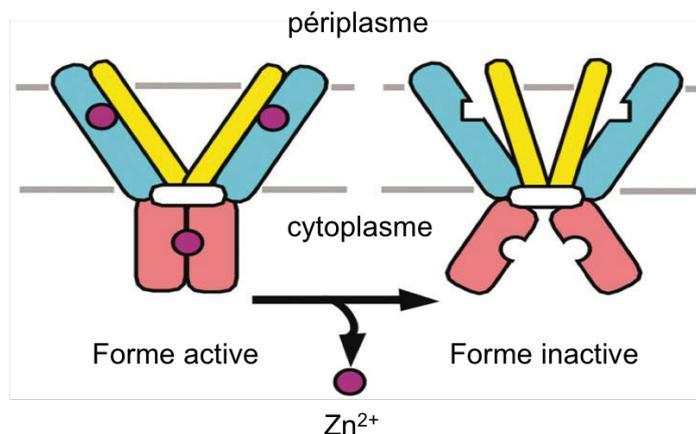


Figure 18 – Modèle de fonctionnement Zn-dépendant de la protéine YiiP de *E. coli*.

Le domaine cytoplasmique est indiqué en rose et le domaine membranaire est représenté en deux couleurs : le faisceau des hélices 1, 2, 4 et 5 statiques est en bleu tandis que les hélices 3 et 5 dynamiques sont en jaune. Les atomes de zinc sont en magenta et la boîte blanche figure les ponts salins qui stabilisent la structure [212].

ions Cd^{2+} avec les ions Zn^{2+} . Tout comme les protéines RND, les protéines CDF utilisent la force protomotrice. Toutefois, elles sont bien moins efficaces dans la fonction d'efflux que les systèmes RND et ne représentent donc qu'une faible partie de la résistance aux métaux.

La protéine CzcD de *R. metallidurans* est bien caractérisée à l'heure actuelle. Initialement supposée comme appartenant au système *czcCBA*, il a été montré que cette protéine pouvait en fait médier à elle seule une résistance aux ions Co^{2+} , Zn^{2+} et Cd^{2+} . La résistance est certes bien moins efficace que pour les bactéries dotées du système CzcCBA mais elle est indépendante de celui-ci [214]. Chez *R. metallidurans*, la protéine CzcD agit *in vivo* sous forme de dimère. Chaque monomère se compose de 316 acides aminés répartis en deux domaines. Le premier de ces domaines, hydrophobe, est constitué de six segments transmembranaires supposés être des hélices α et représente environ 200 acides aminés. Celui-ci contient de nombreux résidus aspartates qui ont probablement un rôle dans le transfert de charges des protons nécessaires pour énergiser le système. Ces aspartates sont essentiels puisque leur mutation inhibe le fonctionnement de CzcD. On retrouve également le motif DAXHMLTD dans l'hélice transmembranaire 2 caractéristique de tous les CDF et qui est nécessaire à la fonction biologique. Le second domaine, hydrophile, composé d'une partie N-terminale et d'une longue partie C-terminale s'étend dans le cytoplasme des bactéries. Il est particulièrement riche en histidines. Celles-ci sont impliquées dans la reconnaissance de l'ion métallique et sont nécessaires pour la fonction optimale de la protéine ainsi que pour son enchâssement correct dans la membrane. La mutation de chacun des résidus histidines de façon individuelle ou même la délétion d'un seul domaine N-terminal ou C-terminal ne supprime pas l'activité de CzcD mais la diminue. En revanche, une protéine privée des deux domaines riches en histidines voit son activité totalement abolie [215].

Des données structurales obtenues sur une autre protéine CDF, YiiP¹², transporteur du zinc chez *E. coli* ont permis de mieux comprendre le mécanisme de fonctionnement des membres de cette famille [212]. Ainsi, le dimère de YiiP forme un Y dans la membrane [Figure 17] [216]. Les six hélices α transmembranaires (HTM1–6) du domaine hydrophobe peuvent être groupés en deux sous-domaines : HTM1, HTM2, HTM4 et HTM5 qui forment un faisceau compact et les deux restantes HTM3 et HTM6 en dehors de ce faisceau. Chaque monomère de YiiP possède trois sites distincts pouvant fixer le zinc, deux mononucléaires (A et B) et un binucléaire (C). Parmi eux, le site B est spécifique de YiiP et n'est pas conservé dans d'autres protéines CDF. Le site A est localisé dans le domaine membranaire. Ce site est confiné entre les hélices 2 et 5 et est supposé être très labile, un léger changement de conformation des hélices permettant ou non la liaison du zinc [212]. Contrastant avec ce site A, le site C binucléaire est plus rigide en particulier à cause des liaisons hydrogènes figeant son environnement direct.

Le mécanisme de fonctionnement de YiiP proposé est de type allostérique [Figure 18]. Le domaine cytoplasmique peut détecter les ions Zn^{2+} via le site C ce qui va entraîner un changement localisé de conformation. Celui-ci va être transmis aux hélices HTM3 et

12. anciennement dénommée FieF

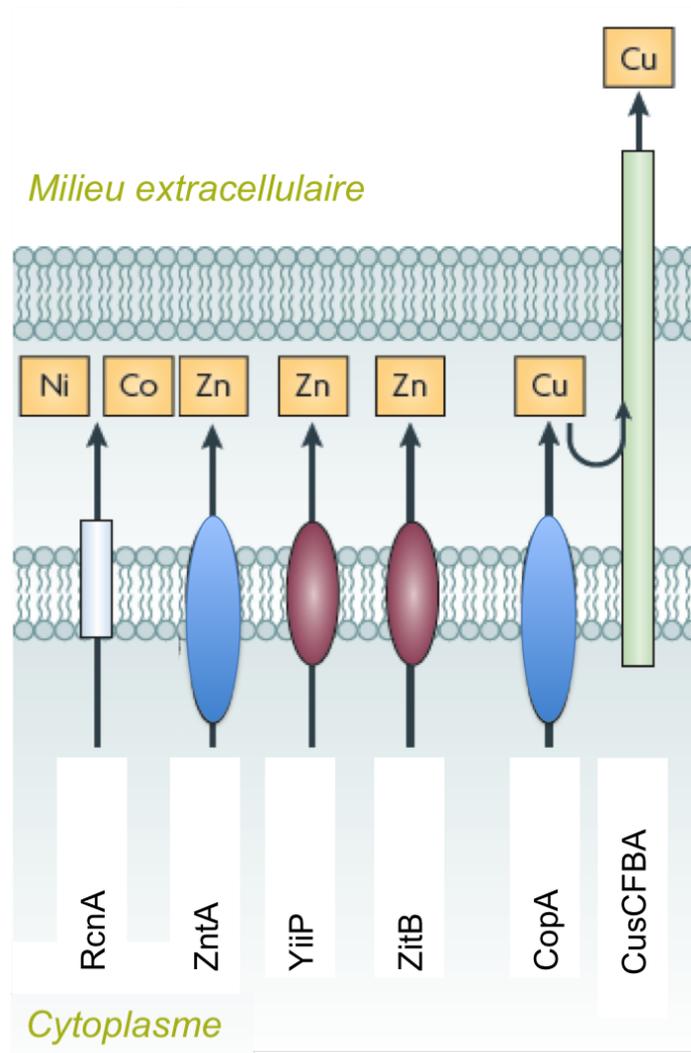


Figure 19 – Les systèmes d’efflux des métaux nickel, cobalt, zinc et cuivre chez *E. coli*.

Le système RND CusCFBA est représenté en vert, les CDF en rouge et les ATPases de type P en bleu. Le système RcnA n’appartient à aucune de ces 3 catégories et est donc représenté en blanc. Le substrat préférentiel est indiqué dans les rectangles jaunes mais ne traduit pas une spécificité absolue. Figure adaptée de [30].

HTM6. Or, celles-ci sont en contact avec les hélices HTM2 et HTM5 qui renferment le site A. Le changement de conformation de ce site est supposé être très faible, de l'ordre de 1 Å, mais suffisant pour augmenter grandement l'affinité pour le zinc. Ainsi, le site A va devenir actif et pourra autoriser l'efflux du zinc vers le milieu extérieur [212]. Ce type de régulation allostérique de la protéine effectrice par son substrat permet de répondre beaucoup plus rapidement à un stress provoqué par celui-ci car elle ne nécessite pas de passage par les étapes d'expression génétique et d'insertion dans la membrane de nouvelles pompes d'efflux.

3.3.3 Les ATPases de type P

Contrairement aux deux familles précédentes dont l'énergie est fournie par la force protomotrice, les protéines ATPases de type P appartiennent à la superfamille de transporteurs nécessitant l'hydrolyse de l'ATP comme fournisseur d'énergie. Cette superfamille se décompose en cinq branches [218] en fonction des molécules transportées et est présente dans tous les règnes de la vie [201]. L'une de ces branches contient les protéines transportant majoritairement les cations métalliques tels que les ions Na^+ , Ca^{2+} ou Mg^{2+} mais aussi les ions Zn^{2+} , Cd^{2+} et Cu^+ . Elle tire son nom d'un résidu proline très conservé, suivi et/ou précédé par un résidu cystéine¹³ [219]. Toujours en opposition avec les deux familles précédentes, certaines ATPases permettent l'import de métaux telle CopA de *Enterococcus hirae* alors que d'autres sont dédiées à l'efflux comme CopA de *E. coli* [220].

L'ATPase de type P la mieux caractérisée à ce jour est la protéine CadA provenant de *Staphylococcus aureus*. Elle permet la résistance aux ions Cd^{2+} mais également à d'autres tels les cations Co^{2+} et Zn^{2+} . Elle se compose de huit domaines transmembranaires probablement conformés en hélices α . En plus du motif CPC présent dans la sixième hélice membranaire, un autre motif CXXC est conservé dans la partie N-terminale cytoplasmique [221]. Ce motif est d'ailleurs capable de lier les ions Cd^{2+} mais ne semble pourtant pas essentiel pour leur transport. Un rôle dans la régulation du système est suspecté chez *Listeria monocytogenes* [222]. Au niveau du mécanisme d'action proprement dit, les ions Cd^{2+} et l'ATP se fixent tout d'abord sur la protéine. Celle-ci est alors phosphorylée sur un résidu aspartate très conservé. Cette phosphorylation provoque un changement de conformation de CadA ainsi qu'une baisse de l'affinité pour l'ion Cd^{2+} . Celui-ci est alors transféré de son site de liaison initial de forte affinité vers un site de plus faible affinité qui contient probablement le motif CPC. Enfin, l'ion Cd^{2+} est relâché dans le milieu extracellulaire. Ceci est suivi par le relargage du phosphate inorganique de Asp415 et le retour de CadA à sa conformation originale. Un nouveau cycle catalytique peut alors démarrer [221].

3.3.4 Les systèmes d'efflux de *E. coli*

Les bactéries possèdent bien souvent différents systèmes d'efflux des trois familles. Ainsi, chez *E. coli*, six systèmes d'efflux des métaux sont pour l'heure caractérisés [Figure

13. pour cette raison, ces protéines sont parfois appelées CPx-type ATPase

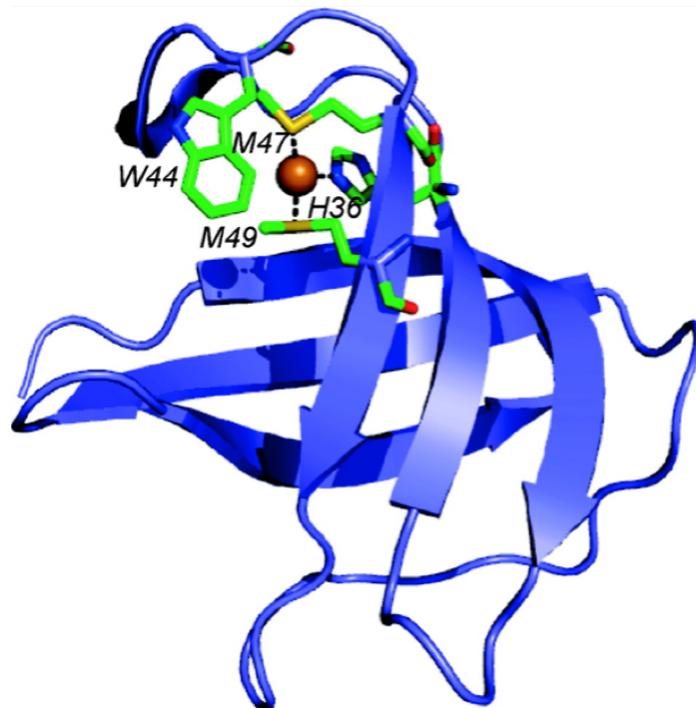


Figure 20 – Structure du site actif du métallochaperon CusF de *E. coli*

Les résidus impliqués dans la coordination du cuivre (sphère orange) sont indiqués en vert avec les atomes de soufre en jaune, ceux d'azote en bleu et ceux d'oxygène en rouge [217].

19].

Ainsi, cette bactérie possède un système RND dédié à la résistance aux ions Cu^+ et Ag^+ , le système *cusCFBA*. Ce système est surtout important en conditions anaérobies ou en cas de stress extrême provoqué par un très large excès de cuivre [223]. Les composants CusA, CusB et CusC sont tout à fait comparables aux composants CzcA, CzcB et CzcC décrits dans les paragraphes précédents. A ce titre, la délétion de la protéine CusB entraîne une perte totale de la résistance au cuivre conférée par le système Cus [224]. En revanche, le système Cus a la particularité de posséder une quatrième protéine codée par le gène *cusF* [224]. Cette dernière est une petite protéine de 10 kDa soluble dans le périplasme qui possède de l'affinité pour les ions Cu^+ et Ag^+ ($K_d \approx 10^{-6}$ M [225]). Le site d'interaction de l'ion Cu^+ avec la protéine a été caractérisé et constitue le premier exemple d'un nouveau type de sites. Ici, l'ion cuivreux est coordonné par deux méthionines et une histidine de façon relativement classique mais un quatrième ligand tryptophane est également important pour stabiliser ce site. Celui-ci provoque une distorsion de la géométrie trigonale via une interaction entre les électrons du cycle aromatique et l'ion métallique [Figure 20]. Le site adopte ainsi une géométrie tétraédrique qui lui confère des propriétés spectroscopiques atypiques avec un maximum d'absorption à 510 nm. Cela a conduit à classer CusF comme une protéine à cuivre rose en opposition à celles à cuivre bleue ($\lambda_{max} \approx 600$ nm) [226, 227]. CusF peut ensuite transférer directement les ions Cu^+ à CusB permettant ainsi la détoxification du périplasme [228].

En plus de ce système RND, *E. coli* possède une ATPase CopA dédiée à l'efflux cytoplasmique du cuivre et de l'argent. Cette ATPase est d'ailleurs le système de résistance au cuivre central chez cette bactérie [229]. Une autre ATPase ZntA est également présente chez *E. coli* et permet la résistance aux ions Zn^{2+} , Cd^{2+} et Pb^{2+} [230].

La famille des CDF est également représentée par les protéines YiiP prenant en charge les ions Zn^{2+} et Fe^{2+} [231] et ZitB pour les ions Zn^{2+} uniquement [232].

Enfin, *E. coli* possède une pompe d'efflux spécifique RcnA des ions Ni^{2+} et Co^{2+} qui n'appartient à aucune des trois familles précitées [233]. Celle-ci appartient au système Rcn qui fait l'objet de ce travail et sera décrite ultérieurement [voir Chapitre 5].

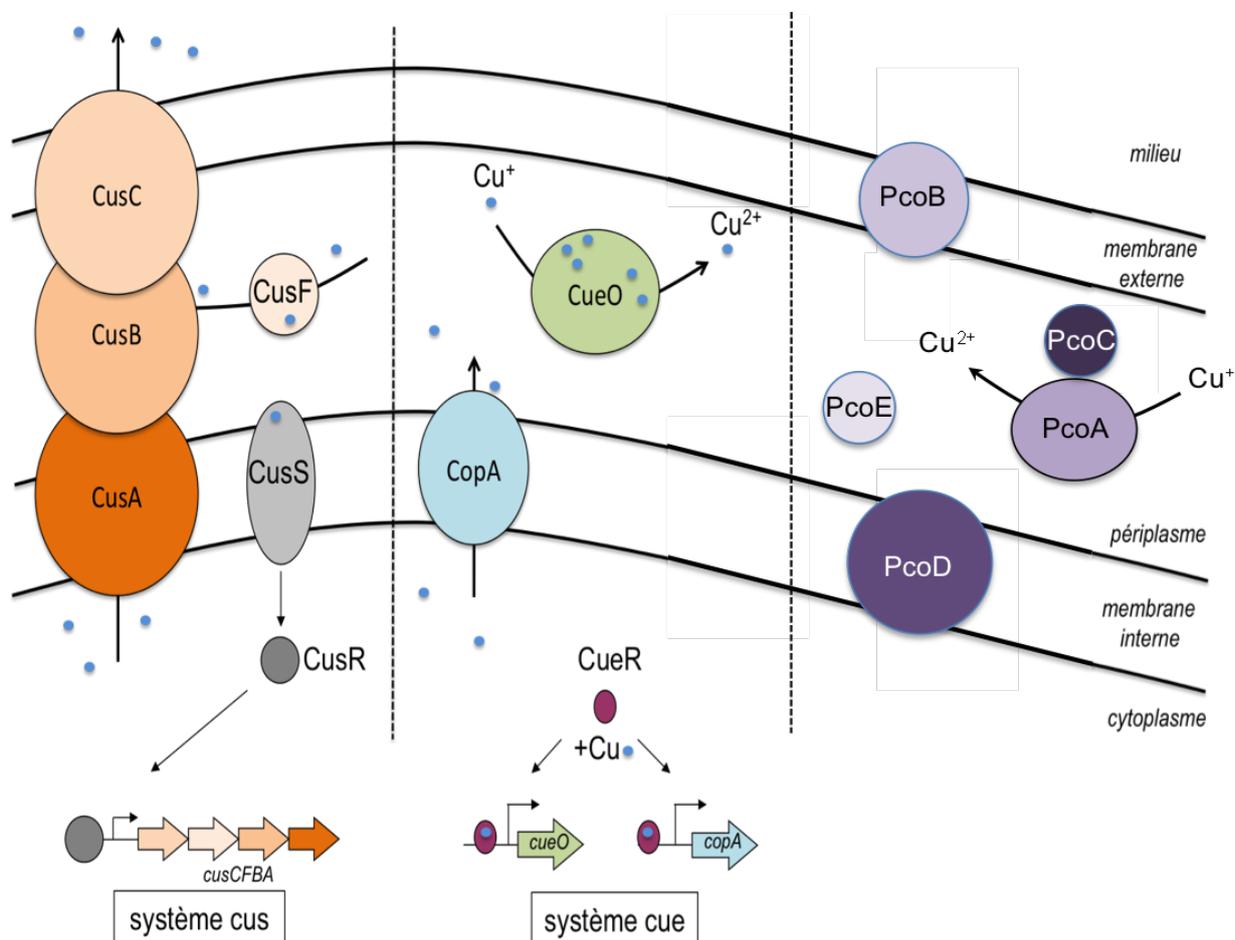
3.4 Les systèmes bactériens de résistance au nickel et au cobalt

Les ions Ni^{2+} et Co^{2+} sont voisins dans le tableau périodique et ont des caractéristiques physico-chimiques proches. De ce fait, les bactéries possèdent bien souvent des systèmes de résistance uniques pour ces deux ions. Les ions Co^{2+} ont été montrés comme perturbant l'assemblage des centres fer-soufre en entrant en compétition avec les atomes de fer [234]. Ainsi, un excès de cobalt provoque une hausse de la biosynthèse des centres fer-soufre couplée à une diminution de l'expression des protéines nécessitant ces centres [235].

Les systèmes RND CnrCBA de *R. metallidurans* [236] et Czn de *H. pylori* [237] ont été caractérisés comme permettant la résistance aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} pour CnrCBA ou aux ions Cd^{2+} , Zn^{2+} et Ni^{2+} mais pas Co^{2+} pour CznCBA. En plus de ces systèmes d'efflux classiques, il en existe d'autres plus originaux appartenant à la famille des MFS¹⁴. Ainsi, la protéine CnrT, constituée de 12 ou 14 segments transmembranaires, d'une partie C-terminale riche en histidines et provenant du locus *cnr* de *R. metallidurans*, permet la résistance aux ions Ni^{2+} . Une autre protéine, NreB, découverte chez *Achromobacter xylosoxidans*, a une structure très proche des protéines CnrT avec environ 400 acides aminés formant probablement dix ou douze hélices transmembranaires et une longue queue poly-histidine C-terminale. Ces protéines permettent la résistance aux ions Ni^{2+} uniquement et la délétion de la partie C-terminale n'altère pas cette résistance [238]. Ces deux protéines pourraient être proches des systèmes CDF d'un point de vue fonctionnel mais n'en possèdent ni les motifs caractéristiques, ni la structure en deux domaines. Elles pourraient peut-être constituer des filtres secondaires plus spécifiques de certains ions que ne le sont les CDF [201]. Il existe également un homologue de la protéine NreB chez *Serratia marcescens* appelé NcrA. Celui-ci fait partie d'un système codé par l'opéron *ncrABC* où NcrB pourrait avoir un rôle dans la régulation du système. De manière intéressante, NcrC, protéine apparentée aux NiCoT, est un homologue de la protéine RcnA d'efflux du nickel et du cobalt chez *E. coli*. Pourtant, chez *Serratia marcescens*, elle permet l'import des ions Ni^{2+} et Co^{2+} et conduit lorsqu'elle est surexprimée seule à une accumulation accrue de ces ions dans le cytoplasme bactérien et donc à une résistance diminuée. Toutefois, NcrC co-exprimée avec NcrA permet d'augmenter la résistance aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} par rapport à la protéine NcrA exprimée seule. La raison de ces phénotypes n'est pas clarifiée mais cela démontre clairement une interconnexion entre import et efflux des ions métalliques dans les phénomènes de résistance [239]. Récemment, un système d'efflux original a été mis à jour. Il s'agit de la protéine MdrH de *P. putida*. Cette protéine a une structure chimérique composée de domaines similaires à RcnA, notamment les hélices α transmembranaires et d'un autre domaine soluble propre au composant CzcB des systèmes RND. De ce fait, cette protéine permet la résistance aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} comme le fait RcnA mais également aux ions Cd^{2+} et Zn^{2+} comme le système CzcCBA [240].

Bien que le mécanisme d'efflux soit privilégié pour assurer la résistance au nickel et au cobalt, il ne s'agit pas de l'unique moyen de lutte contre ces métaux. Ainsi, certaines bactéries peuvent chélater les ions Ni^{2+} . C'est le cas de *Streptomyces acidiscabies* avec les cristaux extracellulaires de Ni-struvite déjà évoqués [voir 3.2.3]. Quant à *H. pylori*, cette bactérie est capable de produire une protéine intracellulaire Hpn en réponse à un stress provoqué par les ions Ni^{2+} [241]. Hpn est une petite protéine cytoplasmique de 60 acides aminés très riche en résidus histidines (28/60) et comportant également des résidus glutamates et cystéines très conservés. Il a été montré que cette protéine était sous forme d'icosamère *in vivo* avec chaque monomère capable de fixer cinq ions Ni^{2+} . Une souche de *H. pylori* ne produisant pas Hpn est plus sensible aux ions Ni^{2+} et la complémentation de *E. coli* par Hpn augmente significativement la résistance à ce métal

14. Major Facilitator Superfamily

Figure 21 – Systèmes de résistance au cuivre chez *E. coli*

Les deux systèmes de résistance Cus et Cue sont représentés aussi bien au niveau génétique que protéique. L'expression de l'opéron *cusCFBA* est activée par le régulateur cytoplasmique CusR lorsque celui-ci est phosphorylé par le senseur membranaire CusS en réponse au cuivre (en bleu). La protéine CusF, soluble dans le périplasma peut chélater le cuivre pour le transférer au système membranaire et ainsi permettre de détoxifier le périplasma. Le système Cue est composé par les deux gènes indépendants *cueO* et *copA* régulés par le métallo-régulateur CueR. Celui-ci peut, après fixation de cuivre, reconnaître la région promotrice et activer la transcription des gènes cibles. L'ATPase CopA pourra alors expulser les ions Cu^+ vers le périplasma où ils seront oxydés en Cu^{2+} par la laccase CueO. Le système plasmidique Pco est également représenté mais la régulation par PcoRS étant identique à celle exercée par CusRS, celle-ci est omise. PcoA a la même fonction que CueO et agit de concert avec le chaperon PcoC. En revanche, les fonctions des trois autres membres du système restent mal comprises.

[242]. Une autre protéine de *H. pylori* présente un fort taux de similarité avec Hpn dans sa partie N-terminale et a donc été nommée Hpn-like. Celle-ci est également induite par le nickel [241] et permet d'augmenter la résistance des bactéries à ce métal. *In vivo*, Hpn-like est sous forme d'oligomère et chaque monomère peut fixer deux ions Ni^{2+} [243].

3.5 Toxicité et résistance au cuivre

3.5.1 Mécanisme de la toxicité du cuivre

Le cuivre est le métal le plus affin selon la série d'Irving-Williams [4] déjà évoquée [voir 1.2]. Ce métal est donc capable d'interagir avec de nombreuses cibles cellulaires et possède un caractère toxique très prononcé. De ce fait, les cellules vivantes doivent maintenir un niveau de cuivre libre extrêmement bas. A titre d'exemple, dans le sérum humain, le cuivre est majoritairement complexé par trois protéines différentes, l'albumine, la céruloplasmine et la transcupréine. La concentration du cuivre libre est estimée à 10^{-13} M [245]. Chez les bactéries, l'absence de cuproprotéines cytoplasmiques ainsi que l'affinité extrêmement forte du métallorégulateur à cuivre CueR pour ce métal ($K_D \approx 10^{-21}$ M) permettent de supposer que la quantité de cuivre libre dans le cytoplasme est quasi-nulle [246]. De ce fait, la chimie de Fenton est irréalisable et l'hypothèse du cuivre générateur de stress oxydatif ne peut pas être validée. De plus, une étude récente montre que *E. coli* est plus résistante au stress oxydatif engendré par H_2O_2 en présence de cuivre que les mêmes cellules privées de ce métal [247]. Le cuivre semble ici jouer un rôle protecteur face au stress oxydatif qui se traduit notamment par une diminution de la vitesse des dommages à l'ADN. Le mécanisme de toxicité du cuivre a été caractérisé *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, les ions cuivreux se fixent au niveau des centres Fer/Soufre et entrent en compétition avec les atomes de fer. Les centres Cu/soufre résultant de cette substitution ne sont pas fonctionnels et les protéines les contenant sont inactives. Réciproquement, les systèmes d'efflux ou de chélation du cuivre ainsi que les systèmes de réparation des centres Fer/Soufre augmentent tous la résistance des bactéries au cuivre [248].

3.5.2 Systèmes chromosomiques de résistance au cuivre chez *E. coli*

A cause de sa grande toxicité, l'homéostasie du cuivre est très contrôlée. Ainsi, chez *E. coli*, il y a trois systèmes chromosomiques de résistance identifiés à ce jour [Figure 21].

En plus de l'ATPase CopA et du système RND CusCFBA déjà cités [voir 3.3.4], cette bactérie possède une enzyme CueO, oxydase périplasmique à multi-cuivre¹⁵, qui intervient dans l'homéostasie de ce métal [249]. Cette enzyme possède différents substrats tels que le phénol, l'entérobactine ou encore les ions ferreux et cuivreux. C'est d'ailleurs par sa capacité à oxyder ces derniers ions Cu^+ en Cu^{2+} moins toxiques que CueO exerce sa protection contre la toxicité du cuivre [250]. CueO appartient à la famille des laccases et, à ce titre, permet de coupler l'oxydation du substrat à la réduction de molécules de

15. également appelée laccase

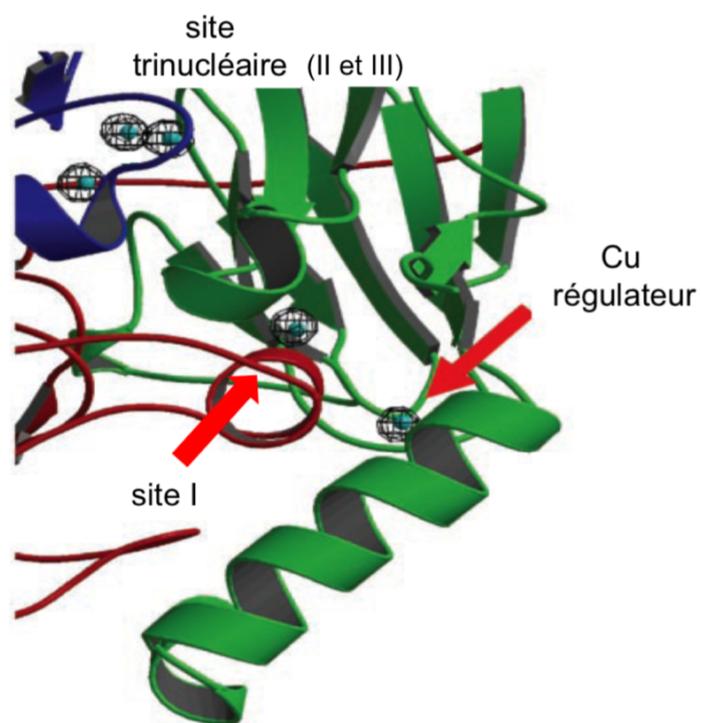


Figure 22 – Structure des sites actifs de l'oxydase à multi-cuivre CueO

Les différents atomes de cuivre constitutifs des sites I, II et III présents dans toutes les oxydases à multi-cuivre sont représentés. De plus, le cuivre régulateur et l'hélice α riche en méthionines sont figurés [244].

dioxygène pour former des molécules d'eau. Cette activité est donc uniquement possible en conditions aérobies [251].

Au niveau structural, la protéine CueO d' *E. coli* comporte 516 acides aminés pour une masse de ≈ 56 kDa. Comme tous les membres de la famille des oxydases à multi-cuivre, CueO possède quatre atomes de cuivre par monomère répartis sur les trois sites caractéristiques I (site bleu), II et III (site binucléaire) [Figure 22]. Dans le cas particulier de ces enzymes, les sites II et III sont très proches et forment un site trinucéaire [252]. CueO possède en plus de ses caractéristiques deux originalités propres. Tout d'abord, elle possède un cinquième atome de cuivre lié. Celui-ci, situé non loin du site I, est sous forme d'ion cuivrique et est coordonné par deux résidus méthionines, deux résidus aspartates et une molécule d'eau [244]. La présence de cet ion Cu^{2+} permet de stimuler l'activité oxydase vis-à-vis des ions cuivreux et a ainsi été nommé cuivre régulateur. De plus, CueO possède une hélice α riche en résidus méthionines dont deux de ses résidus sont impliqués dans la coordination du cuivre régulateur. Cette région est supposée avoir un rôle dans la reconnaissance et la fixation du substrat¹⁶ [244].

3.5.3 Régulation génétique de la résistance au cuivre chez *E. coli*

En ce qui concerne la régulation des systèmes de résistance au cuivre chez *E. coli*, deux mécanismes sont pour l'heure caractérisés. Le premier s'appuie sur CueR, un activateur qui permet la transcription des gènes *copA* et *cueO* en réponse à un stress provoqué par le cuivre, mais également l'argent et l'or [254, 255]. CueR est capable de détecter et de fixer les ions cuivreux avec une extraordinaire sensibilité ($K_D \approx 10^{-21}$ M) comme précédemment évoqué. Cette fixation induit un changement conformationnel permettant la liaison de CueR à l'ADN pour y activer la transcription du système. Les ions métalliques sont coordonnés par deux cystéines conservées, Cys112 et Cys120 selon une géométrie linéaire relativement inhabituelle. La mutation des résidus cystéines supprime toute réponse à ces métaux [256]. Le second mécanisme de régulation est un système à deux composants codés par l'opéron *cusRS* qui permet de stimuler l'expression de l'opéron divergent *cusCFBA* en réponse à la présence de cuivre. En se basant sur des homologies de séquence, CusS a été désigné comme l'histidine kinase membranaire et CusR comme le régulateur cytoplasmique [257]. Les systèmes Cue et Cus sont donc tous les deux dédiés à la résistance au stress provoqué par le cuivre. En réalité, il a été montré que les conditions d'expression différaient entre ces deux systèmes, Cue étant le système clé de la résistance en conditions aérobies et Cus intervenant quant à lui en conditions anaérobies ou lors d'un stress extrême [223]. Ce différentiel dans l'expression de ces deux systèmes illustre bien la nécessité d'une régulation très fine de l'expression des gènes régulant l'homéostasie des métaux en fonction des conditions environnementales.

16. les ions Cu^+ dans le cas de la résistance au cuivre

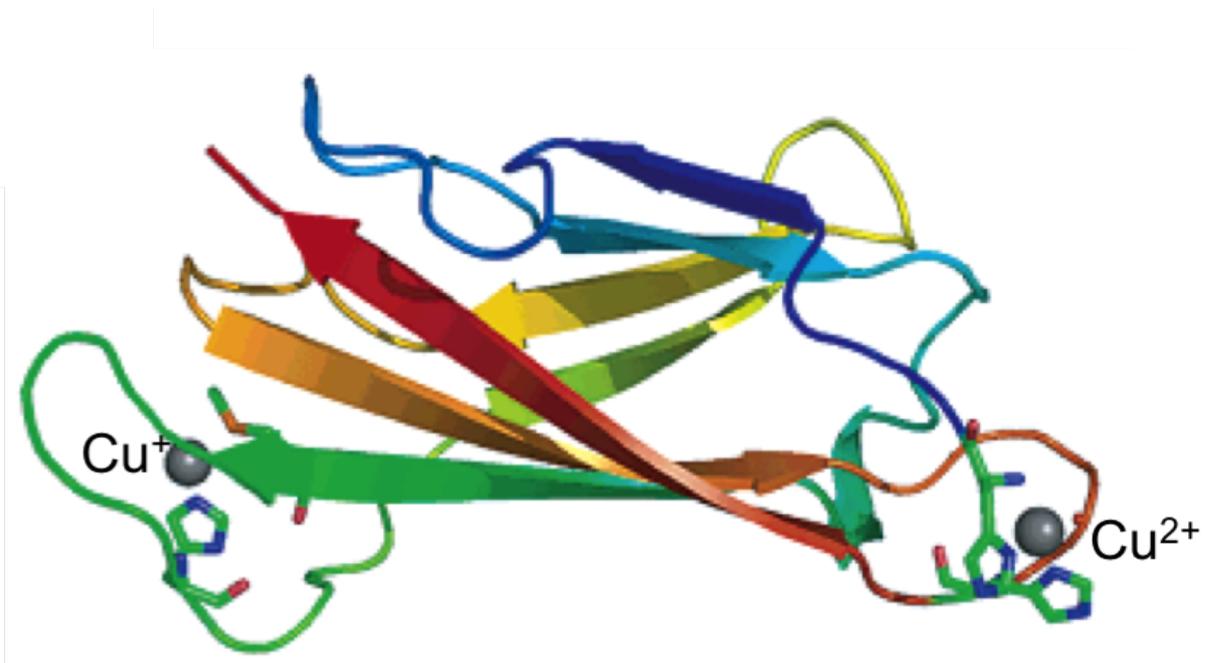


Figure 23 – Le métallochaperon CopC de *P. syringae*

La partie N-terminale est figurée en bleu alors que la partie C-terminale est rouge. Les brins β sont figurés sous forme de flèche en dégradé de couleur du bleu vers le rouge en fonction de leur position dans la séquence primaire [253].

3.5.4 Systèmes additionnels de résistance au cuivre

En plus de ces systèmes chromosomiques de résistance au cuivre, *E. coli* possède un déterminant supplémentaire appelé *pco* localisé sur le plasmide pRJ1004 [258, 259]. Celui-ci est homologue au système *cop* de *Pseudomonas syringae* et est retrouvé dans de nombreux microorganismes [260]. Il est composé d'un opéron *pcoABCDRS* et d'un autre gène *pcoE* transcrit à partir de son propre promoteur. Les protéines PcoR et PcoS forment un système régulateur à deux composants activant l'expression des deux opérons *pcoABCDRS* et *pcoE* en réponse à la présence de cuivre [261]. PcoA est une protéine de 66 kDa très similaire à CueO [262]. PcoB est une protéine de 33 kDa prédite comme étant localisée dans la membrane externe et, bien que son rôle dans la résistance au cuivre soit avéré, sa fonction exacte n'est pas connue. La protéine CopC de *P. syringae*, homologue de PcoC, est capable de fixer les ions cuivreux et cuivriques dans deux sites différents [Figure 23] avec une affinité estimée comparable ($10^{-13} \text{ M} < K_d < 10^{-7} \text{ M}$ pour Cu^+ et $K_d \approx 10^{-13} \text{ M}$ pour Cu^{2+}) [253]. En ce qui concerne le site du Cu^+ , les données obtenues indiquent une coordination par deux ou trois méthionines et une histidine comparable à celle observée pour CusF, le résidu tryptophane en moins. Pour le site du Cu^{2+} , il semble y avoir trois ligands N provenant de deux résidus histidines et de la partie N-terminale de la protéine. Le dernier ligand est un atome d'oxygène provenant d'une molécule d'eau liée par une liaison hydrogène à un résidu aspartate. CopC est la première protéine cristallisée où un ion métallique est lié au premier résidu de la partie N-terminale. Les deux sites de haute affinité pour les ions Cu^+ et Cu^{2+} sont interdépendants. Quand les deux sites sont occupés, la protéine $\text{Cu}^+\text{Cu}^{2+}\text{-CopC}$ est stable à l'air. En revanche, dès qu'un site est inoccupé, cela induit un transfert intermoléculaire, du site Cu^+ vers le site Cu^{2+} ou du site Cu^{2+} vers le site Cu^+ [253]. Cette capacité de fixation et de transfert des deux formes du cuivre permet à CopC d'assumer un rôle de chaperon du cuivre dans le périplasma où les conditions sont plus oxydantes que dans le cytoplasme et où il existe donc un équilibre entre les ions cuivreux et cuivriques [158, 159]. CopC est supposé pouvoir interagir avec tous les membres du système *cop*, la laccase CopA, les protéines membranaires CopB et CopD ou encore le senseur CopS. Il a par ailleurs été montré que la protéine PcoA permettait de catalyser l'oxydation de l'ion Cu^+ de PcoC en Cu^{2+} et les deux protéines agiraient ensemble pour lutter contre la toxicité du cuivre chez *E. coli* [263]. Il est supposé que cette protéine CopC serve de chaperon périplasmique. PcoD est quant à elle une protéine de la membrane interne de 34 kDa avec huit hélices α transmembranaires prédites mais de fonction inconnue. Enfin, PcoE est une petite protéine périplasmique de 16 kDa capable de lier le cuivre et pourrait être un autre chaperon à cuivre [229]. PcoE n'est pas retrouvée dans le système *cop* de *P. syringae*. Peu de données sont disponibles sur cette protéine mais il a été montré qu'elle était fortement inductible par le cuivre et qu'elle fixait ce métal même si elle ne peut à elle seule augmenter la résistance des bactéries contre ces ions [259]. PcoE partage 47 % de similarité de séquence avec la protéine SilE de *Salmonella typhimurium* et notamment les dix résidus histidines connus chez SilE pour fixer les ions Ag^+ [264].

L'hypothèse émise pour expliquer le rôle de ces protéines serait leur capacité à séquestrer les ions métalliques en excès avant que ceux-ci n'entrent dans le cytoplasme et que les autres systèmes de résistance soient induits.

Chez la bactérie à gram-positif *Enterococcus hirae*, l'homéostasie du cuivre est contrôlée par l'opéron *copZYAB* qui est différent de celui de *P. syringae*. Le gène *copY* code un répresseur de l'opéron *copZYAB* qui peut se décrocher de l'ADN pour permettre la transcription en présence de cuivre [265]. CopA et CopB sont deux ATPases. La fonction d'efflux des ions Cu^+ et Ag^+ de CopB a été clairement mise en évidence [266] mais le rôle de CopA semble plus ambigu. Bien que son activité ATPase ne fasse aucun doute, il semblerait que CopA permette l'import de cuivre dans le cytoplasme. En effet, un mutant délété du gène *copA* se développe très mal dans un milieu très pauvre en cuivre et ce même mutant est plus résistant à l'argent, probablement importé par ce transporteur [267]. Mais en absence de plus amples informations, sa fonction exacte dans l'homéostasie du cuivre reste obscure. Enfin, la protéine CopZ est un chaperon à cuivre qui permet de transférer les ions cuivreux aux autres composants du système Cop [268]. A la différence des trois autres chaperons à cuivre CusF, PcoC et PcoE précédemment détaillées chez *E. coli*, ce métallochaperon est localisé dans le cytoplasme des bactéries. La protéine CopZ est constituée de 69 acides aminés et fixe un ion Cu^+ avec un $K_d \approx 10^{-7}$ M [269]. Elle appartient à la vaste famille de chaperons à cuivre Atx1 largement retrouvée chez les eucaryotes et qui permettent le transit des ions Cu^+ dans le cytoplasme [158]. Des études ont montré que la protéine CopZ interagissait avec l'ATPase CopA et que cette interaction était modulée par le cuivre en étant seize fois plus forte en présence de ce métal [270]. De plus, CopZ a été montrée comme permettant le transfert de deux ions Cu^+ à un monomère du métallorégulateur CopY. Ce transfert permet le changement de conformation de CopY nécessaire à la levée d'inhibition de la transcription de l'opéron *cop* [265]. De manière intéressante, un stress extrême causé par de fortes concentrations de cuivre (> 3 mM) induit une dégradation protéolytique de CopZ. Il est supposé que la présence de Cu^+ -CopZ en quantité importante soit toxique. Il a ainsi été montré que des bactéries surexprimant la protéine CopZ étaient plus sensibles au cuivre que les bactéries sauvages. L'hypothèse avancée serait que le cuivre ainsi exposé pourrait générer du stress oxydatif par réaction de Fenton [269].

3.6 Résumé

Les métaux sont toxiques lorsque leur concentration intracellulaire est trop importante. Pour lutter contre ce phénomène, les bactéries possèdent différents mécanismes de résistance. Parmi eux, l'efflux des ions en excès vers le milieu extérieur est le plus couramment utilisé. Il met en jeu des pompes membranaires prenant en charge de manière relativement spécifique un ou plusieurs types d'ions métalliques. Chez *E. coli*, une seule pompe d'efflux RcnA est impliquée dans la résistance au nickel et au cobalt alors que trois systèmes sont identifiés pour lutter contre la toxicité du cuivre : les pompes d'efflux CopA et CusCFBA et la laccase CueO.

Famille	Membres significatifs	Métaux concernés
ArsR	ArsR, SmtB, CadC, CzcA, NmtR	As ³⁺ , Bi ³⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺
MerR	MerR, ZntR, CueR, PbrR	Hg ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ⁺ , Pb ²⁺
CsoR	CsoR, RcnR	Cu ⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺
CopY	CopY	Cu ⁺
Fur	Fur, Zur, Mur, Nur, PerR	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺
DtxR	DtxR, IdeR, MntR	Fe ²⁺ , Mn ²⁺
NikR	NikR	Ni ²⁺

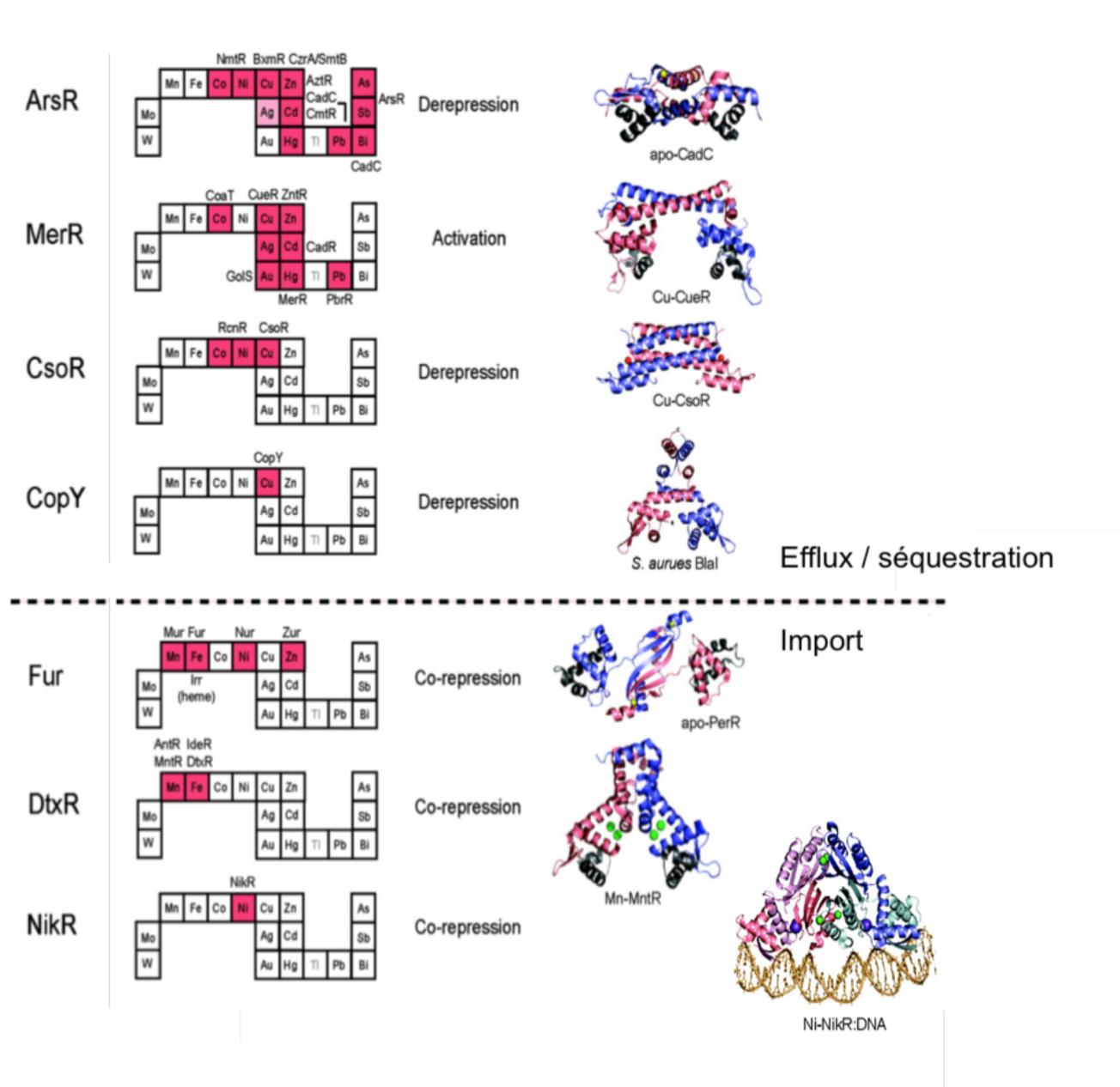


Figure 24 – Les sept familles de métallo-régulateurs

Les métaux figurés en magenta sont ceux pour lesquels un métallo-régulateur est formellement identifié. La couleur rose correspond à un métallo-régulateur hypothétique (BxmR). Chaque monomère est représenté en bleu ou rose et dans le cas de NikR en vert et violet [271, 217].

Chapitre 4

Dynamique de régulation de l'homéostasie des éléments-traces métalliques

Les bactéries possèdent donc de nombreux systèmes impliqués dans l'import et l'efflux des ions métalliques. Néanmoins, l'efficacité du maintien de la concentration intracellulaire biocompatible de tel ou tel métal tient à une bonne coordination de l'expression de ces systèmes en fonction des conditions environnementales. Pour illustrer cette notion, les systèmes de transport d'un métal doivent pouvoir être induits lorsque les bactéries évoluent dans un milieu limitant pour cet élément tandis que les dépenses d'énergie engendrées par la mise en place d'une machinerie d'efflux doivent être limitées. Les bactéries doivent également pouvoir inverser cette balance en cas de changement dans la biodisponibilité de ce métal. Le contrôle de l'homéostasie d'un métal peut se faire à différents niveaux. Ainsi, bien que la régulation se fasse majoritairement au niveau transcriptionnel, quelques exemples sont connus mettant en jeu la stabilité des ARNm, la traduction ou encore l'intervention de chaperons spécifiques modulant le trafic intracellulaire des métaux.

4.1 Les métallorégulateurs

Pour moduler la transcription de gènes cibles intervenant dans la régulation de l'homéostasie des métaux, les bactéries possèdent de nombreux métallorégulateurs regroupés en sept familles distinctes en fonction de leurs caractéristiques propres. Les noms de ces familles correspondent au premier membre qui fut découvert. La plupart des métallorégulateurs sont des co- ou dé-répresseurs à l'unique exception de la famille MerR qui regroupe des activateurs de la transcription. Les sept familles peuvent être classées en deux groupes selon qu'elles régulent des gènes impliqués soit dans l'import soit dans l'export ou la séquestration des ions métalliques [Figure 24].

Contrastant avec les cascades de régulation complexes des eucaryotes, le mécanisme d'action des métallorégulateurs bactériens est remarquablement simple. Bien souvent, une seule protéine régulatrice fixe un métal et agit sur un système de transport de ce même métal.

4.1.1 Les dérépresseurs

Trois familles de métallorégulateurs, ArsR/SmtB, CsoR/RcnR et CopY, appartiennent à cette catégorie. Ces protéines ont toutes en commun de se lier à l'ADN grâce à des hélices α . En absence de métal, le régulateur est fixé à l'ADN et réprime le ou les gènes de résistance aux métaux situés en aval comme l'opéron *arsRDABC* qui est réprimé par ArsR par exemple [272]. La fixation du métal sur la protéine induit un changement de conformation qui permet à celle-ci de se dissocier de l'ADN déclenchant ainsi la transcription des gènes de résistance. La protéine RcnR est également un dérépresseur. Celle-ci revêt une importance particulière dans ce travail et sa caractérisation sera donc développée plus loin [voir Chapitre 5]. Enfin, CopY, unique membre de la famille éponyme, a la particularité de fonctionner avec une protéine cytoplasmique CopZ fixant les ions Cu^+ [voir 3.5.4].

4.1.2 Les coactivateurs

Une seule famille de métallorégulateurs regroupe tous les activateurs de la transcription, la famille MerR du nom de l'un des premiers métallorégulateurs identifié sur le transposon Tn501 de *P. aeruginosa* [273]. Les membres de cette famille possèdent une partie N-terminale très semblable avec un motif hélice-tour-hélice nécessaire pour l'interaction avec l'ADN suivi d'une longue hélice intervenant dans la dimérisation de la protéine. La partie effectrice C-terminale est quant à elle bien moins conservée et permet la reconnaissance de nombreux métaux, chacun d'entre eux possédant un site de liaison différent. A titre d'exemple, l'ion Cu^+ est lié par deux résidus cystéines dans CueR d'*E. coli* selon une géométrie linéaire [246] alors que l'ion Hg^{2+} de MerR est lié à trois cystéines selon une géométrie trigonale planaire [274]. Les formes libres ou liées aux métaux des activateurs peuvent se fixer sur l'ADN avec une affinité comparable [275]. La fixation de la protéine activatrice sur l'ADN provoque une courbure qui empêche la progression de l'ARN polymérase bloquant ainsi la transcription des gènes cibles. La liaison du métal à cet activateur va entraîner un changement de conformation et le remodelage de l'ADN permettant un meilleur alignement des éléments -35 et -10 et donc une efficacité de transcription accrue [276]. Enfin, un aspect intéressant de MerR est sa capacité à ne fixer qu'un seul ion Hg^{2+} par dimère et donc de posséder une structure asymétrique où un résidu cystéine d'un monomère et deux autres du second coordonnent l'ion Hg^{2+} [277]. Cela soulève la question intéressante de l'allostérie de cette fixation qui pourra peut-être être résolue dans le futur avec la structure de MerR.

4.1.3 Les corépresseurs

A la différence des dérépresseurs et des activateurs impliqués dans la résistance aux ions métalliques, les corépresseurs sont des protéines permettant de réguler l'import des métaux dans le cytoplasme. Trois familles de métallorégulateurs sont des corépresseurs, les familles Fur, DtxR et NikR. Les co-répresseurs peuvent se fixer sur l'ADN lorsqu'ils ont lié l'ion métallique correspondant.

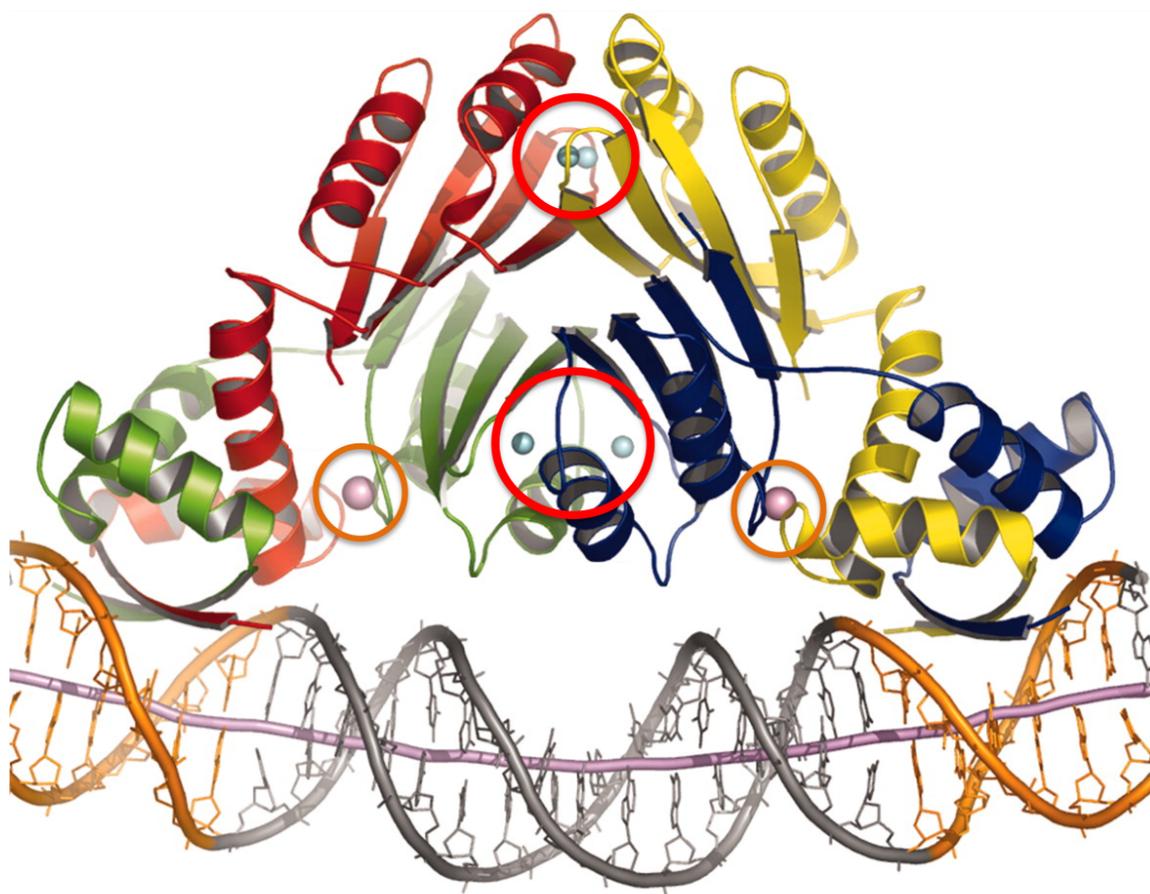


Figure 25 – Structure de la protéine NikR de *E. coli*

Les différents monomères de NikR sont figurés en vert, rouge, jaune et bleu. La double hélice d'ADN est représentée en gris et les séquences nucléotidiques d'interaction en orange. Les ions Ni²⁺ qui occupent les sites de haute affinité sont figurés en cyan et cerclés de rouge tandis que les ions des sites de faible affinité, ici des ions K⁺, sont en rose et cerclés de orange [278].

A l'inverse, la forme libre (apo) de la protéine n'a qu'une affinité négligeable pour l'ADN. Fur¹, régulateur transcriptionnel de plus de 190 gènes chez *E. coli* [279], est le membre le plus étudié de la famille. Des homologues existent et notamment Nur de *Streptomyces coelicolor* impliqué dans l'homéostasie du nickel [280]. Fur se fixe sur une séquence consensuelle de 19 paires de bases appelée boîte Fur [281]. Au niveau structural, les protéines de la famille Fur se composent de deux domaines, la partie N-terminale étant conformée en hélices α et permettant l'interaction avec l'ADN et la partie C-terminale permettant la dimérisation et la reconnaissance de l'ion métallique [282, 283]. *In vitro*, Fur de *E. coli* fixe les ions Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} et Cu^{2+} avec une affinité comparable ($K_D \approx 10^{-5}$ M) [284]. Pourtant, Fur est spécifique des ions Fe^{2+} *in vivo* et les ions Cu^{2+} sont supposés être en infime quantité dans le cytoplasme comme déjà évoqué [voir 3.5.1]. Ceci est un exemple supplémentaire du biais généré par les mesures *in vitro* qui doivent donc être prises avec beaucoup de précaution.

Concernant DtxR, les membres de cette famille sont très proches de Fur d'un point de vue fonctionnel et DtxR par exemple permet de réguler l'entrée du fer dans les actinobactéries où Fur n'est pas présent [285].

En ce qui concerne NikR, unique membre de la famille qui porte son nom, cette protéine a été initialement caractérisée au laboratoire chez *E. coli* comme le répresseur de l'expression de l'opéron *nikABCDE* permettant l'import de nickel [41, 286]. Tout comme les autres corépresseurs, NikR possède un domaine N-terminal majoritairement conformé en hélices α permettant la reconnaissance et la fixation de l'ADN grâce à un feuillet β et une partie C-terminale impliquée dans l'interaction avec les ions Ni^{2+} [287]. A la différence de la grande majorité des métallorégulateurs, NikR fonctionne comme un dimère de dimères avec deux fois deux domaines N-terminaux entrecroisés en périphérie d'un noyau tétramérique composé des domaines de liaison des ions Ni^{2+} [278] [Figure 25]. Ces sites de liaison sont bien caractérisés chez *E. coli*. Ainsi, les ions Ni^{2+} adoptent une symétrie planaire carrée et sont coordonnés par trois résidus histidines (His76, His87 et His89) et une cystéine (Cys95) appartenant à deux sous-unités adjacentes [288]. Ces sites dits de haute affinité ont été initialement décrits comme possédant un K_d apparent proche de 10^{-12} M [289] mais une réévaluation des propriétés de fixation du nickel par d'autres méthodes a montré que l'affinité pourrait être en fait beaucoup plus faible, $K_d \approx 10^{-7}$ M, se rapprochant ainsi des conditions physiologiques [290]. Il existe également des sites de plus faible affinité [290, 291]. Le modèle proposé est celui d'une régulation allostérique où la fixation des ions Ni^{2+} dans les sites de haute affinité permet un léger changement de conformation nécessaire mais pas suffisant pour lier l'ADN. En revanche, il permet aux sites de faible affinité, localisés à l'interface des domaines de tétramérisation et de liaison à l'ADN, de lier un ion Ni^{2+} ce qui permet de stabiliser le tétramère NikR dans une conformation dite *cis* où les deux dimères de dimères liant l'ADN sont dans la même direction [Figure 25]. Sous cette forme, la protéine peut interagir avec l'ADN et bloquer la transcription de l'opéron *nikABCDE* [278, 292].

1. Ferric uptake regulator

Chez *H. pylori*, le mécanisme d'action de NikR est supposé être légèrement différent de celui de *E. coli*. L'affinité pour le nickel des sites de haute affinité est du même ordre de grandeur que celle déterminée pour NikR de *E. coli* [293] mais la liaison à l'ADN est permise lorsque ces seuls sites sont occupés par le nickel. Mais il existe des sites secondaires externes qui, lorsqu'ils ont fixé le nickel², permettent une modification de la conformation de la protéine et notamment de résidus interagissant avec l'ADN. NikR peut ainsi réguler d'autres promoteurs secondaires ce qui explique la plus grande variété de gènes régulés chez *H. pylori* que chez *E. coli* [294].

4.1.4 La place des métallorégulateurs dans l'homéostasie des ions métalliques

Grâce à leur passage de la forme libre à la forme liée, les métallorégulateurs ont donc un rôle crucial dans la régulation de l'expression des protéines qui acquièrent, expulsent ou séquestrent les ions métalliques et permettent ainsi l'ajustement des quantités intracellulaires de métaux. Les affinités de ces différents senseurs/régulateurs cytoplasmiques permettent d'estimer la quantité intracellulaire d'ions métalliques libres [22]. En effet, ces protéines sont en échange continu avec les pools de métaux cytoplasmiques. La concentration des ions métalliques libres peut être estimée par le K_d des métallorégulateurs. Ainsi, l'affinité des régulateurs pour les métaux augmente globalement dans le même sens que la série de Irving-Williams [voir 1.2] ce qui implique que les métaux les plus « collants » sont titrés aux concentrations les plus faibles. Ainsi, chez *E. coli*, le senseur du cuivre CueR a un K_d estimé à 10^{-21} M et les deux senseurs à Zn^{2+} , Zur et ZntR, ont un K_d d'environ 10^{-15} M. Pour ces deux métaux, des concentrations aussi faibles correspondent à moins d'un ion métallique libre par cellule bactérienne. En revanche, NikR et RcnR, senseurs à Ni^{2+} et/ou Co^{2+} ont des affinités plus faibles ce qui n'exclut pas complètement la présence de ces métaux libres dans le cytoplasme.

4.2 Régulation post-transcriptionnelle de l'homéostasie des métaux - le cas du fer

En plus des métallorégulateurs qui se fixent à l'ADN, un exemple de régulation post-transcriptionnelle de l'homéostasie du fer a été décrit chez les bactéries. Celui-ci repose sur la protéine AcnA codant une enzyme, l'aconitase chez *E. coli*. AcnA est un homologue de la protéine eucaryote IRP1. Cette dernière contient un centre Fer-Soufre [4Fe-4S] et intervient dans la production d'énergie. Lorsque la quantité de fer est limitante, l'activité enzymatique est perdue mais la protéine gagne alors de l'affinité pour certains ARNm et modifie leur stabilité. IRP1 peut se fixer sur la région 5' non traduite de l'ARNm de la ferritine et ainsi bloquer la traduction de cette protéine qui permet normalement le stockage du fer en présence de ce métal. Inversement, IRP1 peut se fixer sur la région 3' non traduite de l'ARNm du récepteur du sidérophore transferrine, stabilisant ce dernier et

2. ou éventuellement d'autres ions métalliques comme Mn^{2+} par exemple

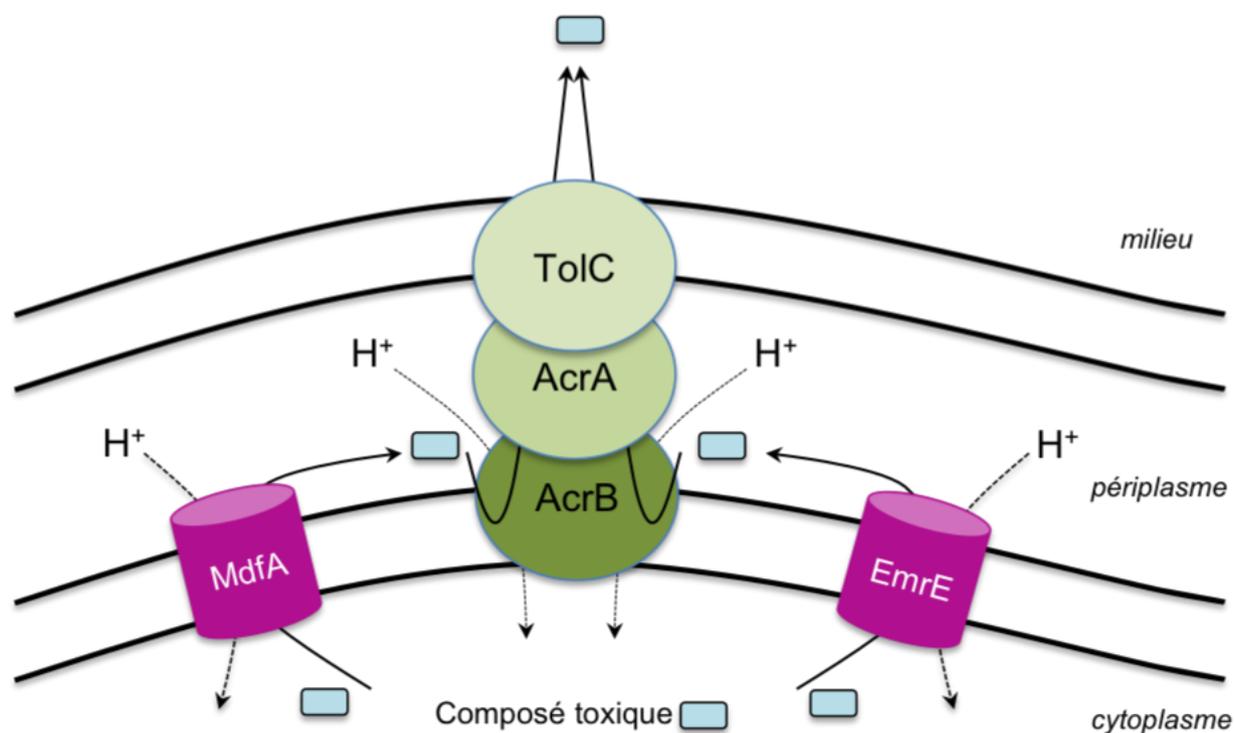


Figure 26 – Modèle de détoxification du périplasma par les systèmes RND

Chez *E. coli*, les transporteurs EmrE et MdfA en magenta expulsent les composés toxiques (acriflavine et éthidium) du cytoplasme vers le périplasma. Ceux-ci peuvent ensuite être pris en charge par la protéine AcrB du système RND AcrAB-TolC et expulsés vers le milieu extérieur. D'après [295].

augmentant ainsi la production de la protéine qui favorise l'import de fer dans les cellules [296]. Les études portant sur les aconitases à centre fer-soufre AcnA d'*E. coli* [297] et CitB de *B. subtilis* [298] ont pu montrer que les gènes codant ces protéines à centre fer-soufre sont induits par le fer. Or, ces protéines peuvent se fixer sur la région 3' non traduite de leur propre ARNm. Ceci stabilise l'ARN et favorise ainsi la production des protéines correspondantes. Ces aconitases constituent donc un exemple d'auto-régulation par le fer. Ces résultats suggèrent que le mécanisme de régulation post-transcriptionnel identifié chez les eucaryotes existe également chez les procaryotes.

Chez *E. coli*, la régulation de l'homéostasie du fer peut également passer par l'ARN antisens *rhyB*. L'expression de celui-ci est réprimée par Fur lorsque les ions Fe^{2+} sont présents en quantité suffisante dans la cellule. En conditions limitantes, l'ARN *rhyB* de 90 nucléotides est exprimé et peut aller se fixer par complémentarité de séquence sur différents ARNm codant des protéines de stockage du fer ou nécessitant les ions Fe^{2+} pour fonctionner [299]. Les ARN double brins ainsi formés seront dégradés par les RNases E ou III ce qui limitera la production de telles protéines [300]. Ceci permet d'expliquer que Fur régule de manière indirecte certains gènes qui ne possèdent pas nécessairement de boîtes Fur dans leur région régulatrice.

4.3 Dynamique de transport des ions métalliques

4.3.1 Les différents flux cellulaires

Tous les complexes formés par un métal donné dans un compartiment cellulaire peuvent être désignés comme le pool de ce métal. Ce pool est en équilibre permanent en réponse à l'entrée et à la sortie du métal. Le pool périplasmique est central puisqu'en échange continu avec le cytoplasme et le milieu extérieur. Les systèmes permettant les échanges entre cytoplasme et périplasmique sont bien connus et ont déjà été largement évoqués. En revanche, le passage des ions métalliques du milieu extérieur vers le périplasmique et inversement sont moins bien compris. En effet, il est communément admis que des porines de la membrane externe sont impliquées dans le transport des cations métalliques. Celles-ci possèdent un très large spectre d'ions pris en charge et ne possèderaient donc aucune spécificité pour un métal donné. Toutefois, une telle hypothèse laisserait supposer des cycles futiles entre export et import puisqu'un ion métallique expulsé pourrait immédiatement rentrer dans le périplasmique. Des études portant sur les protéines RND semblent montrer que l'efflux orchestré par ces systèmes tripartites ne concernerait que les produits toxiques du périplasmique. En effet, les chemins d'accès au système RND des composés cibles ont été identifiés dans le périplasmique et non dans le cytoplasme [203, 301]. Un modèle a d'ailleurs été proposé [295] dans lequel différentes pompes de la membrane interne seraient chargées d'extraire les composés toxiques du cytoplasme vers le périplasmique où ils pourraient ensuite être pris en charge par les systèmes RND [Figure 26]. Les systèmes RND permettraient ainsi d'accentuer l'efflux par rapport à l'entrée. Ces résultats ont toutefois été obtenus pour des molécules de plusieurs centaines de Daltons et non pour des métaux.

4.3.2 Les métallochaperons

Un autre aspect intéressant de l'étude de l'homéostasie des métaux réside dans l'intervention de protéines auxiliaires permettant l'approvisionnement des métalloenzymes et des métallorégulateurs. En effet, les métaux sous forme libre étant toxiques, les cellules doivent utiliser ces métallochaperons pour le transport intracellulaire des ions métalliques. Des exemples de telles protéines sont particulièrement bien décrits pour le nickel et surtout pour le cuivre.

4.3.3 Les chaperons à nickel

Bien que la quantité d'ions Ni^{2+} libres dans le cytoplasme soit inconnue, il est supposé, à l'instar du cuivre, que celle-ci soit très faible. Ainsi, le nickel est lié à des chaperons qui assurent son transit dans les cellules. C'est notamment le cas des protéines HypA/HybF, HypB et SlyD qui, pour rappel, interviennent dans la maturation des hydrogénases [voir 2.2.5] et de la protéine UreE vouée à la maturation des uréases [voir 2.2.6]. L'addition de fortes quantités de nickel dans le milieu de culture de mutants ne possédant pas ces différentes protéines HypA/HybF, HypB et SlyD permet d'obtenir des hydrogénases mûries et actives ce qui n'est pas le cas en absence de nickel [90]. Ceci indique que ces protéines ont pour but d'optimiser le trafic intracellulaire du nickel en améliorant la cinétique et/ou l'efficacité de l'insertion du métal dans les enzymes³ mais qu'elles ne sont pas rigoureusement nécessaires en cas d'excès d'ions Ni^{2+} .

4.3.4 Les chaperons à cuivre

Les protéines chaperons à cuivre sont au nombre de trois identifiées à l'heure actuelle chez *E. coli* et sont toutes localisées dans le périplasma. Comme déjà évoqué, CusF, protéine de l'opéron chromosomique *cusCFBA* est impliquée dans la résistance au cuivre et peut fixer un ion Cu^+ avec un K_d de l'ordre de 10^{-6} M [225] pour le transférer à la protéine CusB du système RND [228] [voir 3.3.4]. Les deux autres chaperons à cuivre de *E. coli* appartiennent au système *pco* du plasmide pRJ1004 de *E. coli* et assurent également le trafic périplasmique du cuivre [258].

Mise à part la protéine CopZ de *Enterococcus hirae*, bactérie à gram-positif, aucun chaperon cytoplasmique à cuivre n'est donc identifié chez les bactéries à gram-négatif alors que celles-ci sont absolument essentielles chez les eucaryotes [302]. Une notion importante reflétée par cette observation est que la compartimentation des métaux est absolument essentielle et le maintien de l'homéostasie des métaux dans chaque compartiment obéit à des règles différentes.

4.3.5 Exemple de compartimentation d'un métal : le cas du cuivre

L'homéostasie du cuivre chez *E. coli* fournit un excellent exemple de la notion de compartimentation. Au moins 95 % du cuivre total est localisé dans le périplasma princi-

3. ce qui répond parfaitement à la définition d'un métallochaperon

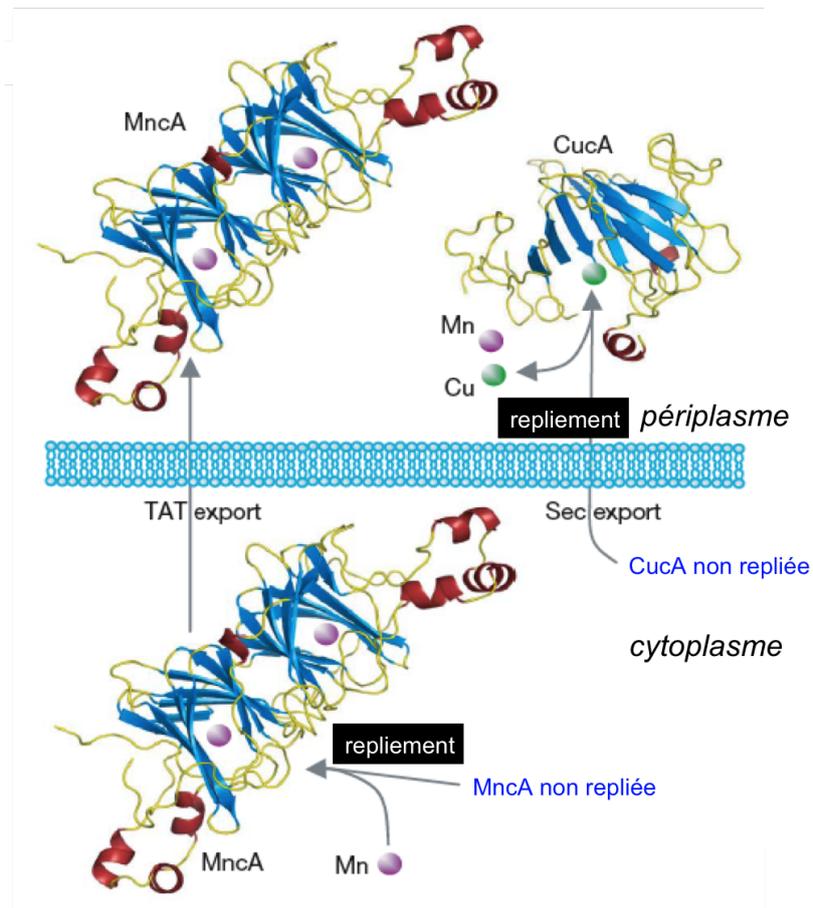


Figure 27 – Mécanisme d'acquisition du manganèse et du cuivre par CucA et MncA chez *Synechocystis* PCC 6803

Les hélices α sont figurés en rouge, les brins β en bleu et les boucles en jaune. Les atomes Mn et Cu sont respectivement en violet et vert [303].

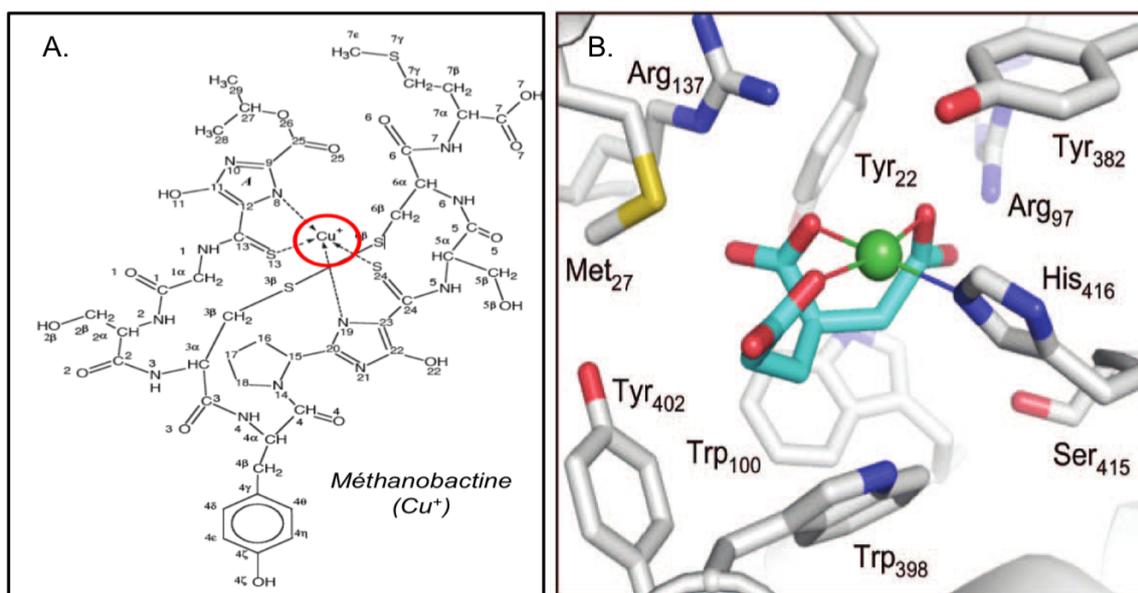


Figure 28 – Structure des nouveaux métallobactines identifiés

A. La méthano-bactine est représentée à gauche et l'ion cuivre fixé est cerclé de rouge [304]. **B.** Site actif de NikA. Les résidus du site de NikA permettant la fixation de l'ion Ni^{2+} sont figurés avec l'atome Ni en vert et le BTC en cyan. Le nickel est coordonné par 3 atomes d'oxygène du BTC en rouge et 1 atome d'azote d'une histidine de NikA en bleu [72].

palement dans la protéine CueO (65 %) et dans le site CuB de l'oxydase hème-cuivre du cytochrome C (25 %) [246, 305]. Inversement, aucune cuproenzyme n'est identifiée dans le cytoplasme et seuls le régulateur CueR et l'ATPase CopA impliqués dans l'efflux de ce métal semblent fixer des ions Cu^+ . La très grosse majorité du cuivre n'a donc pas besoin de rentrer dans le cytoplasme. De plus, le glutathion est présent en quantité millimolaire dans le cytoplasme ce qui représente environ 10^7 molécules. Or, la fonction thiol de ce composé peut chélater le cuivre et ainsi tamponner complètement le cytoplasme.

La cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 fournit une autre illustration intéressante de ce concept de compartimentation du pool de métaux [303]. Dans cet organisme, CucA et MncA sont respectivement les principales protéines à cuivre et à manganèse du périplasma. Or, leur site de fixation du métal est très proche d'un point de vue structural avec trois histidines et un glutamate et d'après la série de Irving-Williams, elles devraient donc chélater très majoritairement du cuivre. En effet, *in vitro*, les deux protéines chélatent du cuivre. La spécificité de MncA pour le manganèse *in vivo* s'explique en fait par son mode de sécrétion. Celle-ci est prise en charge par le système Tat qui exporte vers le périplasma les protéines déjà correctement repliées. Ainsi, MncA acquiert le manganèse dans le cytoplasme là où le cuivre est absent et ne peut entrer en compétition. Elle est ensuite exportée vers le périplasma avec le métal chargé et son repliement empêche les échanges entre ions métalliques dans le site actif. A l'inverse, la protéine CucA est exportée par le système Sec sous forme non repliée et le cuivre se fixe à elle dans le périplasma [Figure 27].

4.3.6 Intervention de molécules porteuses des ions métalliques : métalophores

Dans la même idée que les métallochaperons qui assurent le transit intracellulaire des ions métalliques, des composés impliqués dans la reconnaissance et la fixation des métaux dans le milieu extracellulaire pourraient potentiellement avoir une grande importance pour l'import des ions métalliques dans le cytoplasme. Ainsi, les sidérophores, composés permettant de chélater les ions ferriques très peu solubles en milieu aqueux sont bien connus chez les bactéries à gram négatif [16, 17]. Plus récemment, un composé sécrété par la protéobactérie méthanotrophe *Methylosinus trichosporium* OB3b et dénommé méthanobactine a été décrit [304] [Figure 28 A.]. Celui-ci est sécrété lorsque les bactéries évoluent dans un milieu pauvre en cuivre et a la particularité de fixer un ion Cu^+ pour permettre son import dans les bactéries [304]. La méthanobactine constitue le premier exemple d'une molécule analogue aux sidérophores spécialisée dans l'import du cuivre et, à ce titre, a été désignée comme chalkophore.

Pour le nickel, les récents résultats portant sur les cristaux de la protéine NikA ont montré l'existence d'un composé intermédiaire dont la distribution électronique correspondrait à du BTC^4 comme possible ligand du métal [45, 46] [voir 2.2.2, Figure 28 B.]. Le métal se fixerait donc à la protéine NikA grâce à ce composé.

4. Pour rappel : Butane-1,2,4-TriCarboxylate

Des études *in vivo* sont nécessaires pour étudier la synthèse, le mode d'action et les partenaires éventuels de ce composé mais il pourrait alors constituer le premier exemple de nickélophore. Ce concept de métallophore est émergent à l'heure actuelle mais pourrait regrouper de nombreux composés qui interviennent dans le contrôle de l'homéostasie des métaux.

4.3.7 Interconnexion des homéostasies des différents métaux

Bien que les systèmes dédiés au maintien de leur homéostasie soient relativement spécifiques, les pools de chaque métal et principalement les éléments-traces [Tableau 5] ne peuvent être considérés comme isolés dans les cellules et des connexions existent entre eux. Ceci est bien visible dans les phénomènes de toxicité puisqu'il a été montré par exemple que le cuivre et le cobalt étaient toxiques en excès du fait de leur entrée en compétition avec les atomes de fer [234, 248]. De même, le nickel et le cobalt, voisins dans le tableau périodique, sont bien souvent pris en charge par les mêmes systèmes d'efflux. Les éléments traces ont en effet tous un rayon atomique comparable autour de 75 pm et sont bien souvent des cations divalents. Les différences sont relativement faibles entre ces divers éléments ce qui explique que l'évolution ait privilégié des systèmes de résistance croisée entre eux. De plus, *in vitro*, les protéines purifiées interagissent bien souvent avec de multiples ions métalliques alors qu'elles sont beaucoup plus sélectives *in vivo*.

Mais les connexions entre métaux peuvent également être plus complexes comme l'illustrent encore les cas du cuivre et du fer. En effet, *E. coli* sécrète des sidérophores lorsqu'elle évolue dans des milieux pauvres en fer pour acquérir ce métal plus aisément. Or, il a été montré que l'un de ces composés, l'entérobactine, pouvait réduire les ions cuivriques en ions cuivreux plus toxiques [306]. Un mélange entérobactine/cuivre est à ce titre plus toxique que le cuivre seul. L'absence de fer conduirait donc à une hausse de la sensibilité au cuivre sans système de défense spécifique. Ces résultats ont été corroborés par le fait qu'un mutant *fur* qui surproduit l'entérobactine est très sensible au cuivre [307]. Pour pallier à cette toxicité, la protéine CueO, impliquée dans la résistance au cuivre par sa capacité à oxyder les ions Cu^+ en Cu^{2+} [voir 3.5.2], est également capable d'oxyder l'entérobactine. Sous cette forme, ce composé n'est plus capable de réduire les ions cuivriques. De plus, la forme oxydée de l'entérobactine peut séquestrer le cuivre et ainsi apporter un niveau supplémentaire de protection des cellules [307]. CueO apporte donc un double niveau de résistance au cuivre.

4.4 Résumé

Les pools intracellulaires de chaque métal sont en équilibre permanent et peuvent varier en fonction des conditions environnementales. Les bactéries doivent réguler les flux d'entrée, de sortie et de stockage pour maintenir l'homéostasie. Le plus important niveau de régulation s'effectue au niveau transcriptionnel grâce à l'intervention de métallo-régulateurs qui détectent les ions métalliques et modulent l'expression de certains gènes clés en conséquence. La spéciation des ions métalliques dans la cellule est encore très mal connue mais il semble que des protéines spécialisées, les métallochaperons assurent le transit des métaux vers leurs cibles cellulaires.

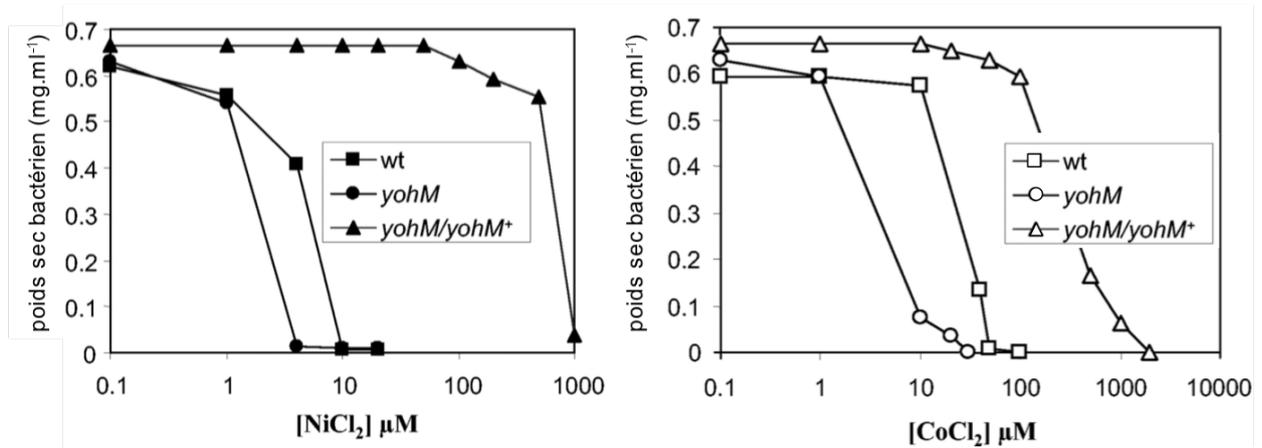


Figure 29 – Implication de *yohM* dans la résistance aux ions Ni²⁺ et Co²⁺

Les concentrations de métaux sont indiquées pour le milieu de culture utilisé, ici du milieu minimum M63 + glucose 0,4 %. Les résultats sont exprimés en concentration massique de bactéries de la souche MC4100 dans le milieu après 12 h de culture à 37 °C en conditions aérobies [233].

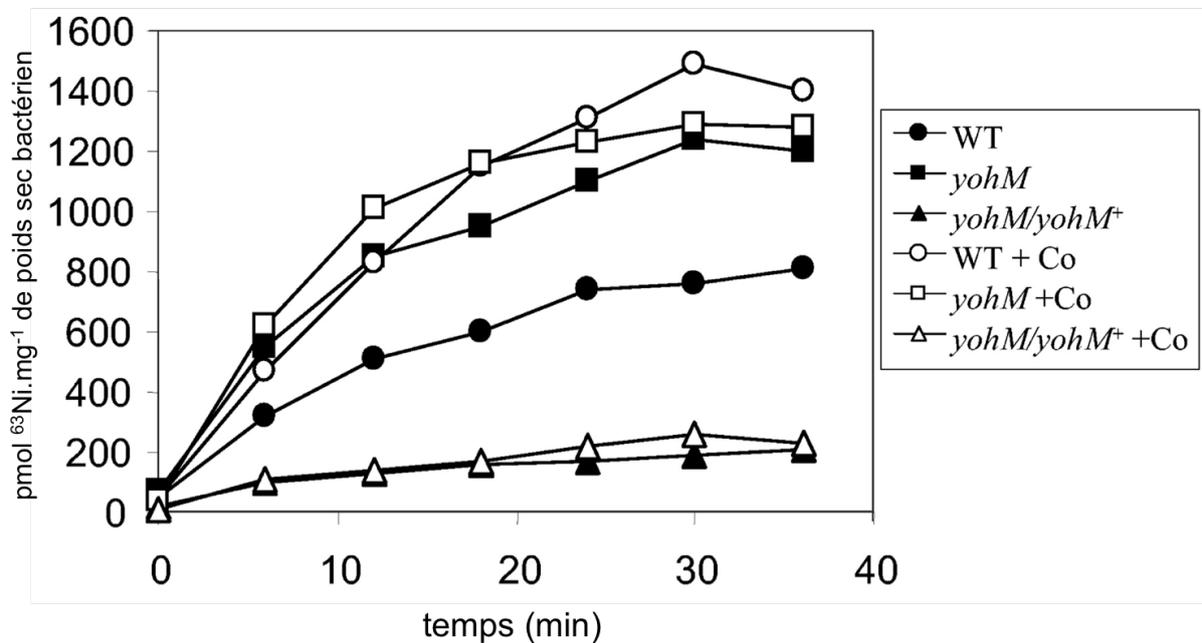


Figure 30 – Implication de *yohM* dans l'accumulation des ions Ni²⁺ et Co²⁺

L'accumulation de nickel radioactif au cours du temps est suivie en filtrant à intervalles réguliers un aliquot d'une suspension bactérienne de la souche MC4100 ayant subi l'ajout de 5 µM ⁶³Ni (symboles pleins) ou de 5 µM ⁶³Ni + 50 µM CoCl₂ (symboles vides) [233].

Chapitre 5

Le système Rcn, prototype d'une nouvelle famille de systèmes d'efflux

Tous les mécanismes de résistance aux métaux ne sont bien sûr pas connus à l'heure actuelle. En marge des trois grands types de systèmes d'efflux spécifiques des ions métalliques que sont les protéines RND, CDF et ATPase de type P, d'autres systèmes minoritaires sont caractérisés. Par exemple, le système NreAB qui permet la résistance aux ions Ni^{2+} où NreB est une protéine membranaire appartenant à la catégorie des protéines MFS¹ dont aucun représentant n'était précédemment connu comme permettant l'efflux de métaux, et où NreA est probablement le régulateur dépendant du métal de l'expression de *nreB* [238].

5.1 Découverte et caractérisation de la protéine RcnA

Pour découvrir de nouveaux systèmes d'efflux, notre équipe *Bactéries et Métaux* a initié une étude il y a quelques années par une approche bioinformatique visant à identifier des protéines possédant une étiquette histidine naturelle [233]. En effet, ces résidus étant connus pour leur interaction avec les ions Ni^{2+} , l'idée était d'interroger les bases de données de protéines de *E. coli* pour détecter des protéines potentiellement impliquées dans l'homéostasie de ce métal. Le meilleur retour de cette requête fut la protéine YohM, composée de 274 acides aminés pour une masse moléculaire d'approximativement 30 kDa, qui contenait un domaine riche en résidus histidines² en position centrale. Une souche mutante délétée du gène *yohM* fut alors construite et sa résistance à différents métaux put être testée. La mutation de *yohM* accentua significativement la sensibilité aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} des bactéries [Figure 29]. De plus, des expériences d'accumulation de nickel radioactif montrèrent que ce mutant accumulait presque deux fois plus de nickel que la souche sauvage et qu'une complémentation par un plasmide en fort nombre de copies contenant le gène *yohM* diminuait fortement cette accumulation [Figure 30]. Le même type d'expérience réalisé en compétition avec un excès de cobalt montra que la souche sauvage accumulait plus de nickel. Cela peut s'expliquer par une saturation du système

1. Major Facilitator Superfamily
2. 17 résidus sur 26 sont des histidines

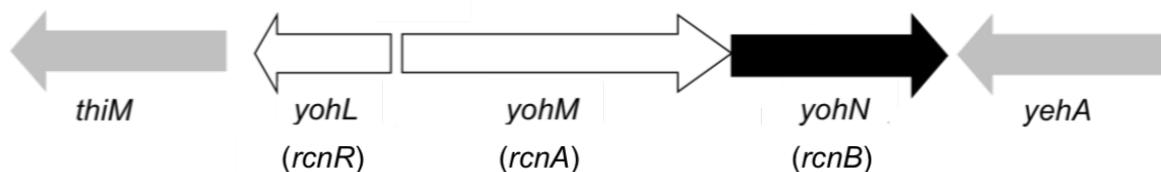


Figure 31 – Représentation schématique du locus *yoh* de *E. coli*

Les gènes sont représentés selon leur orientation transcriptionnelle. *thiM* code pour une protéine impliquée dans la biosynthèse de la thiamine et la fonction de la protéine codée par *yehA* est inconnue même si elle est prédite comme adhésine de type fimbriae [233].

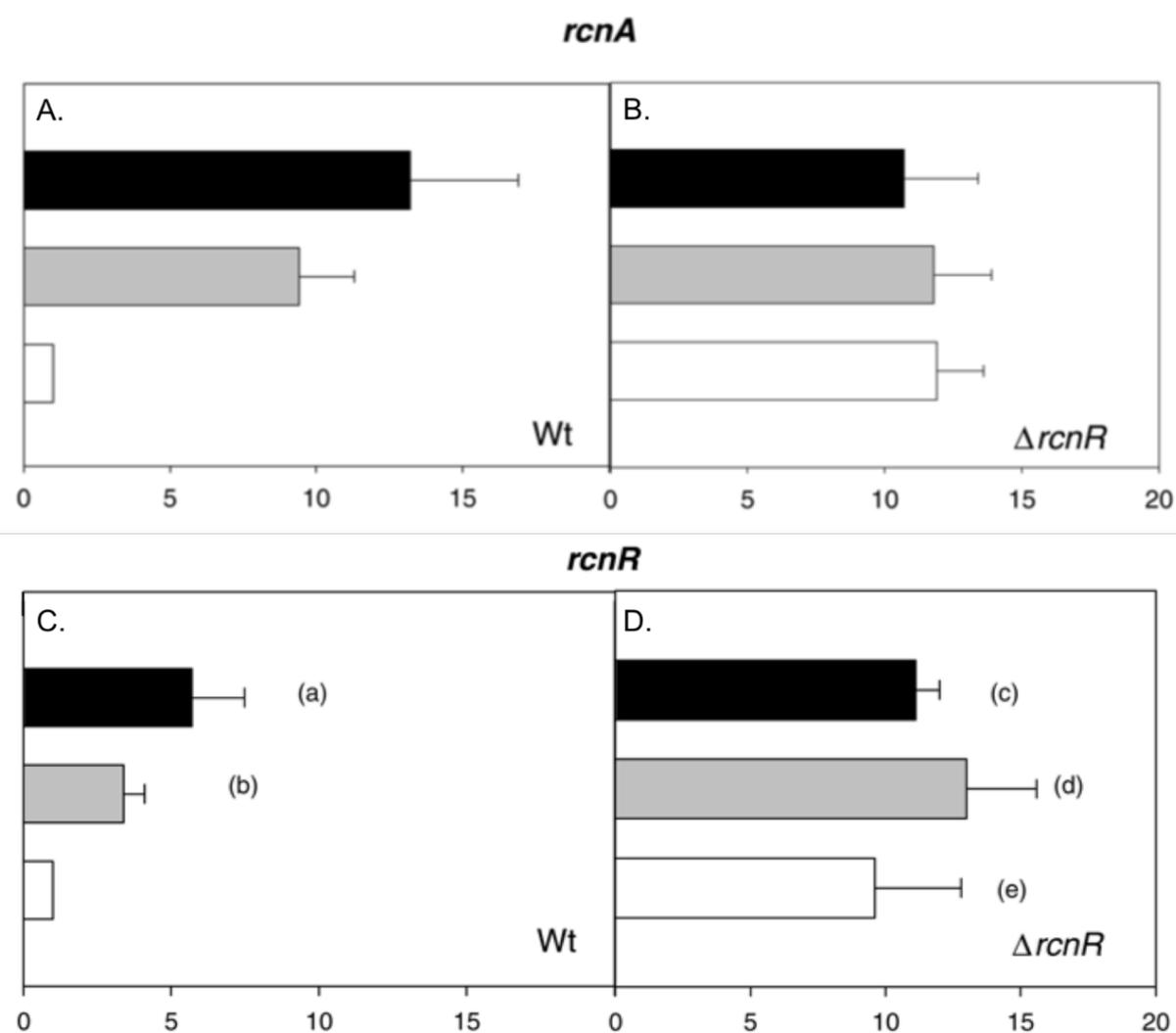


Figure 32 – Induction des gènes *rcnA* et *rcnR* par les ions Ni^{2+} et Co^{2+}

La qRT-PCR a été réalisée sur l'ARN extrait de la souche NM522 d'*E. coli* (A. et C.) et sa dérivée $\Delta rcnR$ (B. et D.) cultivée en présence ou non (barres blanches) de métaux : $Ni^{2+} = 1$ mM (barres grises) et $Co^{2+} = 0,1$ mM (barres noires). Les amorces utilisées permettent d'amplifier sélectivement l'ADNc provenant du transcrite *rcnA* (A. et B.) ou *rcnR* (C. et D.). Les résultats sont présentés sous forme de rapport de fluorescence, la référence étant la souche sauvage cultivée sans métaux.

par les ions Co^{2+} et cette expérience apporte donc une preuve de la prise en charge de ces ions Co^{2+} par RcnA [Figure 30]. Enfin, un marquage par du soufre radioactif permet de localiser YohM dans la membrane conformément aux prédictions informatiques. Toutes ces données ont permis d'attribuer la fonction de système d'efflux des ions Ni^{2+} et Co^{2+} à la protéine YohM qui fut alors rebaptisée RcnA³ [233].

5.2 Etude de la régulation du gène *rcnA*

5.2.1 Caractéristiques de la régulation de *rcnA*

Le gène *rcnA* appartient au locus *yoh* de *E. coli* contenant les trois gènes *yohL*, *yohM* et *yohN* [Figure 31]. Des expériences de qRT-PCR effectuées au laboratoire ont montré que l'expression du gène *rcnA* était induite par le nickel et le cobalt [Figure 32 A.] [308]. Le produit du gène *rcnR* situé juste en amont de *rcnA* et orienté en sens inverse de celui-ci, code une protéine impliquée dans la régulation de *rcnA* [309]. Chez un mutant de ce gène, l'expression de *rcnA* est dérégulée et le gène s'exprime même en absence de métal [Figure 32 B.] [308]. Des expériences d'empreinte à la DNase effectuées au laboratoire ont montré que le dérépresseur RcnR agit en se fixant directement à l'ADN. En absence ou en quantité limitante de métaux, RcnR est fixé à l'ADN et empêche l'expression du gène *rcnA*. Lorsque la concentration en ces métaux s'élève, RcnR se décroche de l'ADN et *rcnA* et *rcnR* peuvent s'exprimer [Figure 33].

5.2.2 Régulation différentielle de *rcnA* et *rcnR*

Le niveau de régulation des deux gènes *rcnA* et *rcnR* n'est pas tout à fait identique. Ainsi, en présence d'ions Ni^{2+} ou Co^{2+} , *rcnA* s'exprime chez la souche sauvage à un fort niveau qui est identique à celui obtenu chez un mutant privé de *rcnR* [Figure 32 A. et B.]. En revanche, chez la souche sauvage, *rcnR* est induit par les métaux mais à très faible niveau et le niveau maximal ne peut être atteint que chez le mutant n'exprimant pas RcnR [Figure 32 C. et D.] [308]. Cela montre que d'autres facteurs que les ions Ni^{2+} et Co^{2+} interviennent dans la régulation de *rcnR*. Une autre étude a montré que le fer avait également un impact sur le système Rcn. Ainsi, une séquence ressemblant à une boîte Fur est présente dans la région intergénique entre *rcnR* et *rcnA*. La transcription du gène *rcnR* augmente en présence de fer ce qui n'est pas le cas pour *rcnA*. En effet, la protéine RcnR surexprimée réprime d'autant plus *rcnA*. En absence de RcnR, la transcription de *rcnA* est effectivement stimulée par le fer. Ces résultats sont surprenants puisque Fur est un répresseur et l'activation par le fer doit donc se faire de manière indirecte. Cela est confirmé par le fait que la transcription des gènes *rcnA* et *rcnR* augmente en présence de fer et en absence de la protéine Fur [310]. Le lien entre l'homéostasie du fer et le système Rcn est intéressant et doit donc encore être clarifié.

3. Resistance to cobalt and nickel

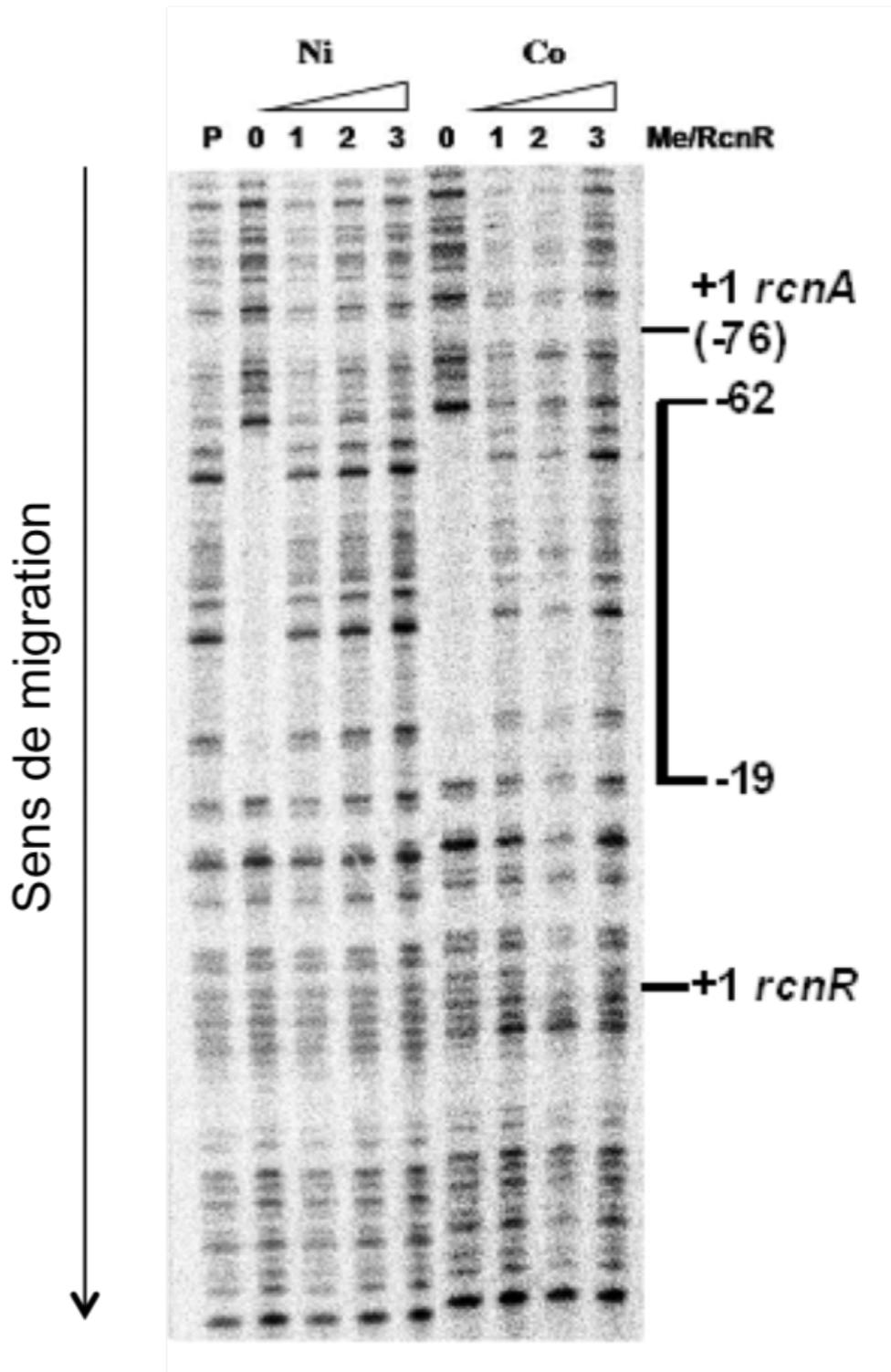


Figure 33 – Empreinte à la DNase de la région intergénique *rcnR* - *rcnA* en présence de nickel ou cobalt

La piste P représente le témoin de digestion positif où seul l'ADN de la région promotrice de *rcnAB* est mis en contact avec la DNase. Les pistes 0 correspondent aux échantillons ADN + protéine RcnR. Ensuite, des quantités croissantes de métal sont ajoutées et exprimées en équivalent de protéine RcnR (Ni et Co 1 à 3 et Co 1 à 3). La région protégée de 43 paires de base est indiquée en prenant comme référence le site d'initiation de la traduction de *rcnR*.

D'autres caractéristiques relatives à la régulation du gène *rcnA* ont été établies au cours de ce travail de thèse et seront relatées dans le chapitre 6.

5.2.3 Mécanisme d'action de RcnR

Les gènes homologues de *rcnR* jouxtent des gènes codant des protéines d'efflux des métaux (51 %), des métalloenzymes (23 %) ou encore des chaperons à cuivre (13 %) indiquant que sa fonction de métallorégulateur est conservée. La protéine RcnR se compose de 90 acides aminés pour une masse d'environ 10 kDa. Elle est supposée contenir trois hélices α comme CsoR et son spectre de dichroïsme circulaire montre que la protéine est bien repliée avec ce type de structures secondaires [311]. Son état d'oligomérisation est supposé être tétramérique. RcnR fixe les ions Ni^{2+} et Co^{2+} à raison de 1 ion par monomère avec un K_d estimé de l'ordre de 10^{-9} M [311]. RcnR possède de nombreux acides aminés chargés susceptibles d'interagir avec les métaux mais en absence de données structurales très poussées, les résidus fixant les ions métalliques ne sont pas formellement identifiés. Ainsi, le site actif est supposé être composé de six ligands. La partie N-terminale, les résidus histidines en position 3 et 64 ainsi que le résidu cystéine Cys35 sont très conservés et sont de bons candidats pour un rôle dans la fixation des ions Ni^{2+} et Co^{2+} . De manière intéressante, les sites pour les deux métaux semblent similaires mais pas identiques et un ou plusieurs ligands pourraient être différents. Ainsi, l'histidine His60 semble impliquée dans la coordination des ions Co^{2+} mais pas dans celle des ions Ni^{2+} [311]. Sur l'ADN, RcnR reconnaît deux boîtes pseudopalindromiques de séquence TACT-G₆-N-AGTA comme le révèlent des expériences d'empreinte à la DNase [312]. La protéine se fixe sur une région d'une quarantaine de paires de bases englobant ces deux boîtes. De plus, il semble qu'elle interagisse par des interactions aspécifiques avec une cinquantaine de paires de bases supplémentaires de chaque côté de cette région ce qui suggère que l'ADN serait courbé lors de cette fixation. Il est supposé que deux tétramères de RcnR se fixent sur l'ADN, chacun occupant une boîte TACT-G₆-N-AGTA [312]. Les sites d'initiation de la transcription ont été déterminés au laboratoire. Ainsi, les boîtes TACT-G₆-N-AGTA sont situées entre ces sites et le site d'initiation de la traduction (ATG) de chacun des deux gènes [Figure 34]. RcnR se fixe donc en aval du site d'initiation de la transcription de chacun des gènes *rcnA* et *rcnR* ce qui suggère que RcnR bloque la transcription des gènes *rcnR* et *rcnA* en empêchant la progression de l'ARN polymérase sur l'ADN. Enfin, les boîtes de fixation de RcnR sont retrouvées dans tous les homologues de *rcnR* mais pas lorsque le gène *rcnA* est présent seul [308]. Cela suggère que *rcnA* pourrait être sous le contrôle d'un autre régulateur dans certains organismes dépourvus de *rcnR*.

5.3 Mise en évidence de l'opéron *rcnAB*

En plus des gènes *rcnR* et *rcnA* le locus *yoh* de *E. coli* contient un troisième gène appelé *yohN* [Figure 31]. Une expérience de RT-PCR réalisée au laboratoire a permis de montrer qu'un seul ARN messager était transcrit à partir des gènes *rcnA* et *yohN* et

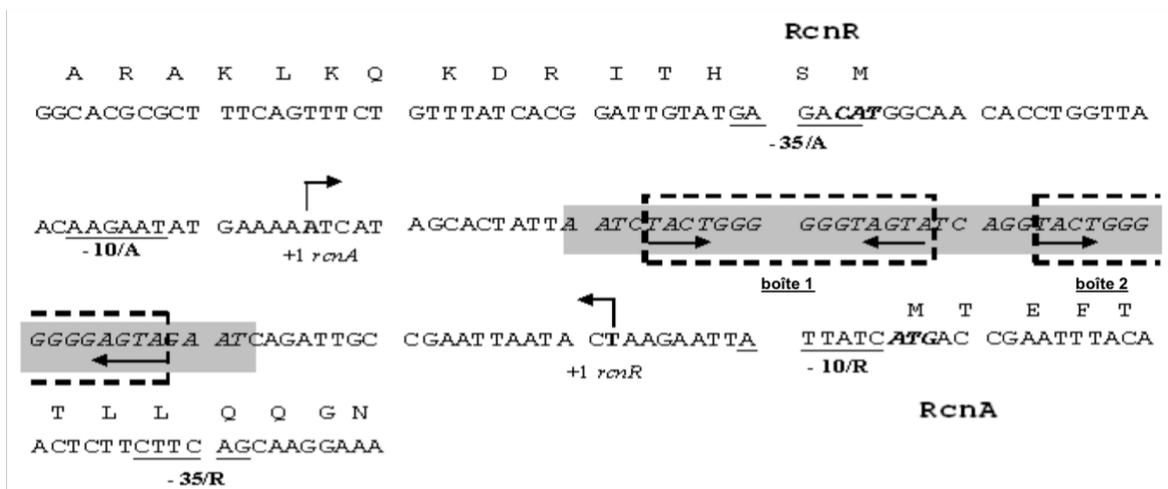


Figure 34 – Structure de la région intergénique *rcnR* - *rcnA*

La séquence nucléotidique et protéique de la région intergénique *rcnR-rcnA* est montrée et la région protégée par RcnR est grisée. Les deux boîtes TACTG₆NAGTA sont encadrées en pointillés avec des flèches soulignant les séquences palindromiques. Les sites d'initiation de la transcription sont également signalés par des flèches coudées et les sites d'initiation de la traduction sont en gras ainsi que les boîtes -35 et -10.

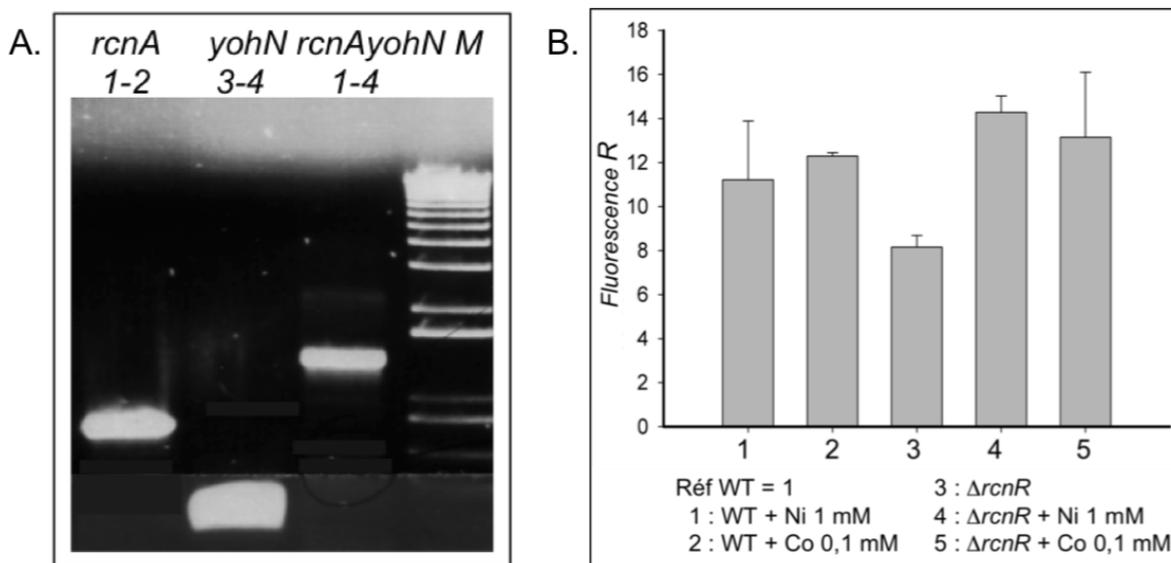


Figure 35 – Mise en évidence de l'opéron *rcnA-yohN* par RT-PCR

A. La RT-PCR a été réalisée sur l'ARN extrait de la souche NM522 d'*E. coli*. Les amorces utilisées permettent d'amplifier sélectivement l'ADNc provenant du transcrit *rcnA* seul (piste 1, ≈ 900 pb), du transcrit *yohN* seul (piste 2, ≈ 400 pb) ou du transcrit *rcnA-yohN* (piste 3, ≈ 1300 pb). **B.** La qRT-PCR a été réalisée sur l'ARN extrait de la souche NM522 d'*E. coli* ou sa dérivée $\Delta rcnR$ cultivée en présence ou non de métaux. Les amorces utilisées permettent d'amplifier sélectivement l'ADNc provenant du transcrit *yohN*. Les résultats sont présentés sous forme de rapport de fluorescence, la référence étant la souche sauvage cultivée sans métaux.

que ces deux gènes formaient donc un opéron [Figure 35 A.]. De plus, une expérience de qRT-PCR a montré que, tout comme *rcnA*, le gène *yohN* est induit par le nickel et le cobalt d'un facteur 10. Cette forte induction n'est pas observée chez un mutant *rcnR* ce qui montre que *yohN* est également sous la dépendance de RcnR [Figure 35 B.]. Cela suggère fortement que ce gène soit également impliqué dans l'homéostasie des ions Ni^{2+} et Co^{2+} chez *E. coli*. *yohN* a donc été rebaptisé *rcnB*. Aucune étude ne porte sur ce gène et la caractérisation de celui-ci était l'enjeu principal de ce travail de thèse et fera l'objet des chapitres 7, 8 et 9 de ce manuscrit. Ainsi, le chapitre 7 porte sur l'implication du gène *rcnB* dans l'homéostasie du nickel et du cobalt. Le chapitre 8 détaille quelques caractéristiques biochimiques de la protéine RcnB. Enfin, le chapitre 9 donne des éléments d'information sur le lien de la protéine RcnB avec l'homéostasie du cuivre.

Deuxième partie

Résultats

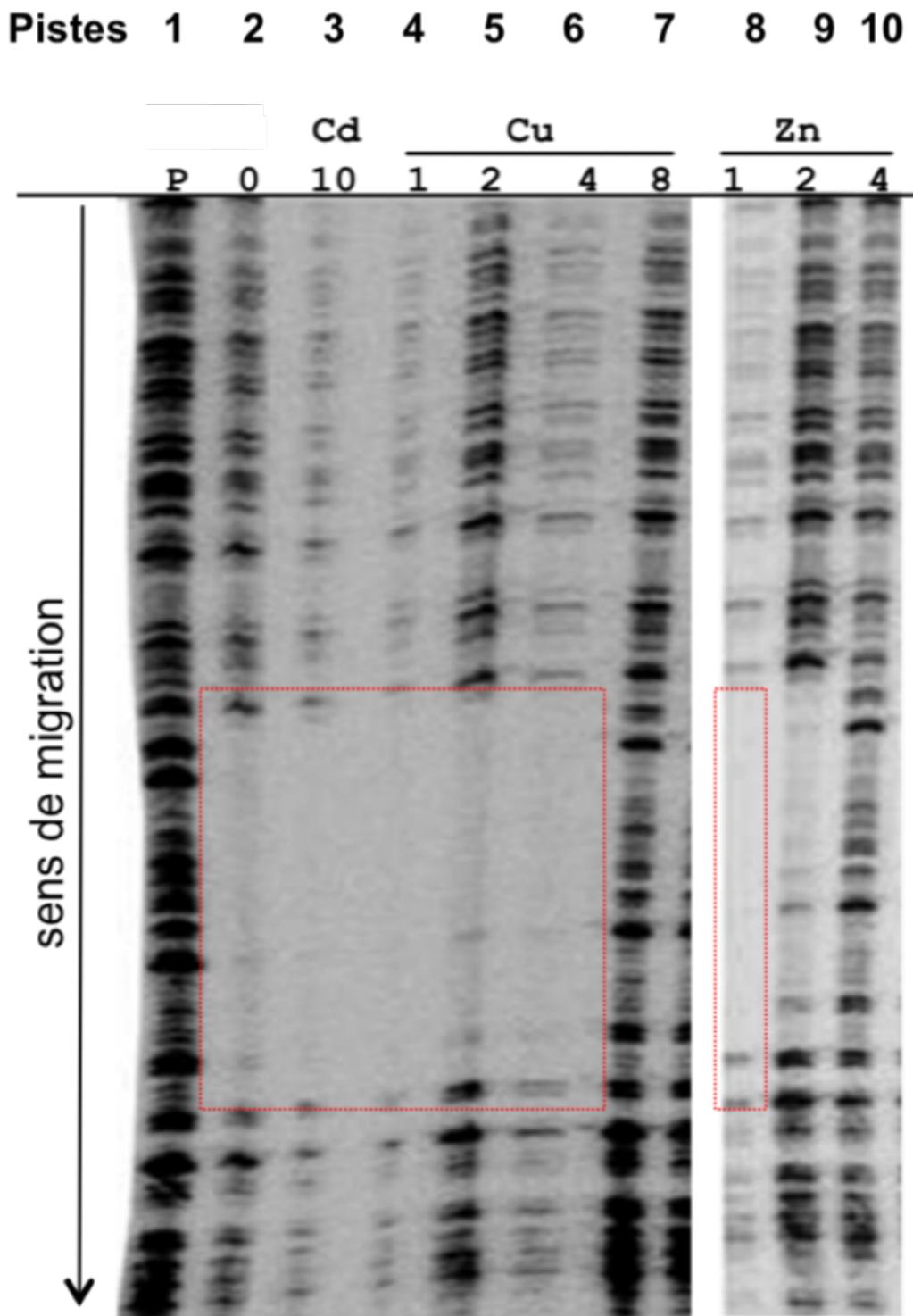


Figure 36 – Empreintes à la DNase sur la région intergénique *rcnR-rcnA* en présence de métaux et de RcnR

La protéine RcnR est utilisée à une concentration allant de 20 à 200 nM (1 à 10 équivalents ADN). La piste 1 est celle du témoin négatif où seule la région promotrice (P) est mise en contact avec la DNase. La piste 2 est celle du témoin positif avec la région promotrice et la protéine RcnR sans métal ajouté (0). Pour les pistes 3-10, la nature du métal ainsi que la quantité en équivalent RcnR est indiquée. La migration s'effectue dans le sens de la flèche et le gel est autoradiographé. Les empreintes sont visualisées par des cadres rouges.

Chapitre 6

Régulation transcriptionnelle du système RcnRAB

6.1 Etude de la spécificité d'expression de l'opéron *rcnAB*

6.1.1 Effet de différents métaux sur l'interaction entre RcnR et le promoteur de *rcnAB* *in vitro*

L'impact de différents métaux sur l'interaction ADN/protéine entre RcnR et P_{*rcnAB*}¹ a été étudié par une approche d'empreinte à la DNase. La fixation de la protéine RcnR sur la séquence de P_{*rcnAB*} sauvage a été suivie lors de l'ajout de quantités croissantes de métaux. Comme précédemment évoqué, *in vitro*, les ions Ni²⁺ et Co²⁺ peuvent empêcher l'interaction RcnR/P_{*rcnAB*} lorsqu'ils sont apportés avec une stœchiométrie d'au moins 1 pour 1 par rapport à la protéine RcnR [Figure 33]. L'effet des ions Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ a été testé et les résultats sont représentés dans la figure 36.

Les pistes 1 et 2 représentent les témoins sans métaux en absence (piste 1 = P) ou en présence (piste 2 = 0) de RcnR. Pour le témoin négatif (piste 1), l'ADN est entièrement digéré et aucune empreinte n'est visible. En revanche, pour le témoin positif (piste 2), la protéine RcnR, en se fixant à l'ADN, le protège de la digestion par la DNase et une empreinte est bien visible correspondante à la zone de 43 paires de bases située entre -19 et -62 par rapport au site d'initiation de la transcription de *rcnR* [Figures 33 et 34]. La piste 3 représente l'effet obtenu pour les ions Cd²⁺ ajoutés avec une stœchiométrie de 10 pour 1. L'empreinte est visible et ces ions métalliques n'ont donc pas le pouvoir de dissocier les complexes ADN/protéine même en excès de 10 fois. Une autre expérience non relatée ici avait montré qu'il en était de même avec les ions Mn²⁺. Un gradient a été réalisé avec des quantités de plus en plus importantes d'ions Cu²⁺ et Zn²⁺. Pour le cuivre, une empreinte est visible pour 1, 2 et 4 équivalents (pistes 4, 5 et 6) mais pas pour 8 équivalents (piste 7). Pour le zinc, l'empreinte est clairement visible pour 1 équivalent (piste 8) mais disparaît complètement pour 4 équivalents (piste 10), la situation intermédiaire à 2 équivalents (piste 9) traduit une affinité de RcnR pour l'ADN affectée mais pas complètement abolie.

1. désigne la région promotrice de l'opéron *rcnAB*

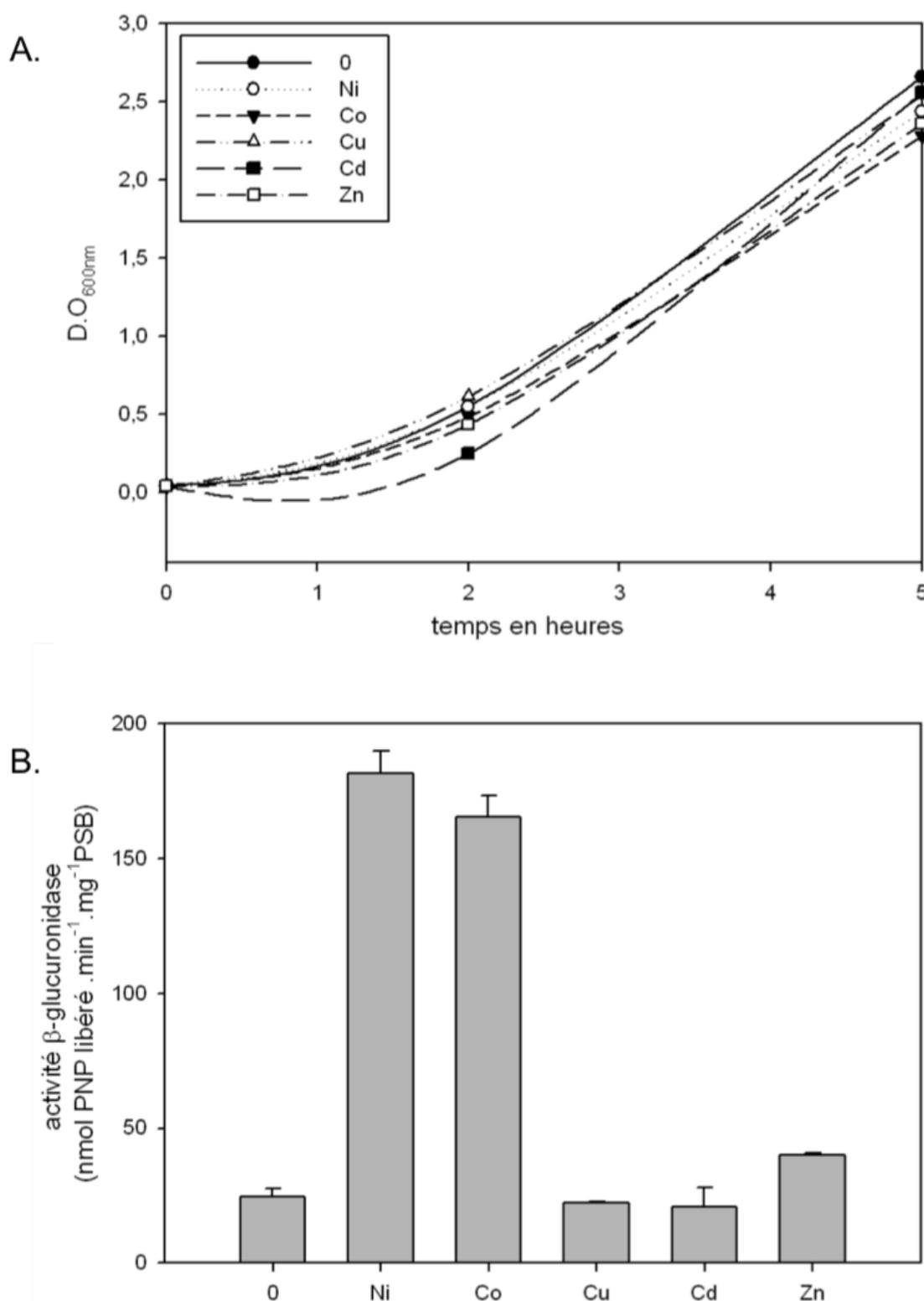


Figure 37 – Activité du gène rapporteur *rcnA-uidA* en fonction de la nature des ions métalliques

A. Profil de croissance. Les cultures sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C. La croissance bactérienne de la souche NMYO est estimée par mesure de la $D.O_{600nm}$ prise sur un aliquot à 2 et 5 h après inoculation. Les métaux sont ajoutés en début de culture aux concentrations suivantes : $Ni^{2+} = 0,75$ mM, $Co^{2+} = 0,1$ mM, $Cu^{2+} = 0,5$ mM, $Cd^{2+} = 0,1$ mM et $Zn^{2+} = 0,5$ mM. **B.** Dosage de l'activité de la fusion *rcnA-uidA*. Les résultats sont exprimés en nmol de PNP libéré .min⁻¹ .mg⁻¹ PSB. Les activités enzymatiques sont dosées après 2 h de croissance. La moyenne ainsi que l'écart-type d'au moins 3 manipulations distinctes sont représentés.

Ces résultats montrent donc clairement que des ions métalliques autres que les ions Ni^{2+} et Co^{2+} ici les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} , peuvent modifier l'interaction RcnR / P_{rcnAB} *in vitro*. Cependant, la quantité requise pour observer l'effet est plus importante que dans le cas des ions Ni^{2+} et Co^{2+} et la dissociation observée ne correspond donc peut être pas à un effet physiologique.

6.1.2 Effet de différents métaux sur l'induction de l'opéron *rcnAB* *in vivo*

Pour vérifier si l'effet des ions Cu^{2+} et Zn^{2+} observé par les expériences d'empreintes à la DNase peut avoir un sens *in vivo*, l'activité du gène *rcnA*, situé en amont dans l'opéron *rcnAB*, a été étudiée en présence de ces différents métaux. Pour cela, la souche NMYO dérivant de la souche parentale NM522 a été utilisée car elle contient une fusion transcriptionnelle du gène *rcnA* avec le gène rapporteur *uidA* codant la β -glucuronidase (*rcnA-uidA*) [313]. L'activité de *uidA* est facilement quantifiable par dosage enzymatique et reflète l'activité de P_{rcnAB} en réponse aux différentes conditions. Les métaux utilisés l'ont été dans des concentrations variables qui ont toutes en commun d'être sub-inhibitrices, c'est à dire qu'elles ne perturbent pas significativement la croissance des bactéries. La même densité optique D_{600nm} est en effet atteinte après 2 et 5 h de croissance dans les différentes conditions [Figure 37 A.]. Le dosage de l'activité de P_{rcnAB} a été effectué 2 h après l'inoculation lorsque les bactéries se trouvent en début de phase exponentielle de croissance pour une raison qui sera expliquée plus loin. Les résultats sont présentés sur la Figure 37 B. Les ions Ni^{2+} et Co^{2+} induisent presque dix fois l'expression du gène rapporteur. Par contre, aucun effet significatif n'est obtenu pour les ions Cu^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} . Les résultats présentés ici sont ceux obtenus dans du milieu riche LB mais les résultats obtenus en milieu minimum sont tout à fait comparables au niveau de la spécificité de l'induction.

Bien que les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} aient un effet *in vitro* sur la dissociation de RcnR du promoteur P_{rcnAB} , il semble qu'ils soient incapables d'induire l'expression de *rcnAB* dans le contexte cellulaire. La quantité d'ions Cu^{2+} et Zn^{2+} libres dans la cellule nécessaire pour observer l'induction doit vraisemblablement être trop importante et entraîner un effet toxique prononcé. Dans ce cas, la croissance des cellules est inhibée avant que l'opéron *rcnAB* ne soit induit.

6.2 Importance de la quantité d'ions métalliques pour l'expression de l'opéron *rcnAB*

Afin d'approfondir le rôle des ions Ni^{2+} et Co^{2+} sur l'expression de P_{rcnAB} , l'effet de différentes quantités de métal a été testé. Cela a pu être réalisé grâce à deux constructions. En plus de la souche NMYO portant la fusion *rcnA-uidA* sur le chromosome bactérien, le plasmide p157 contenant la fusion *rcnA-gfp* a été utilisé. Grâce à ce plasmide, l'expression du gène peut être suivie directement par spectrofluorescence sans passer par un dosage enzymatique. De plus, cette construction peut être introduite dans différentes souches afin

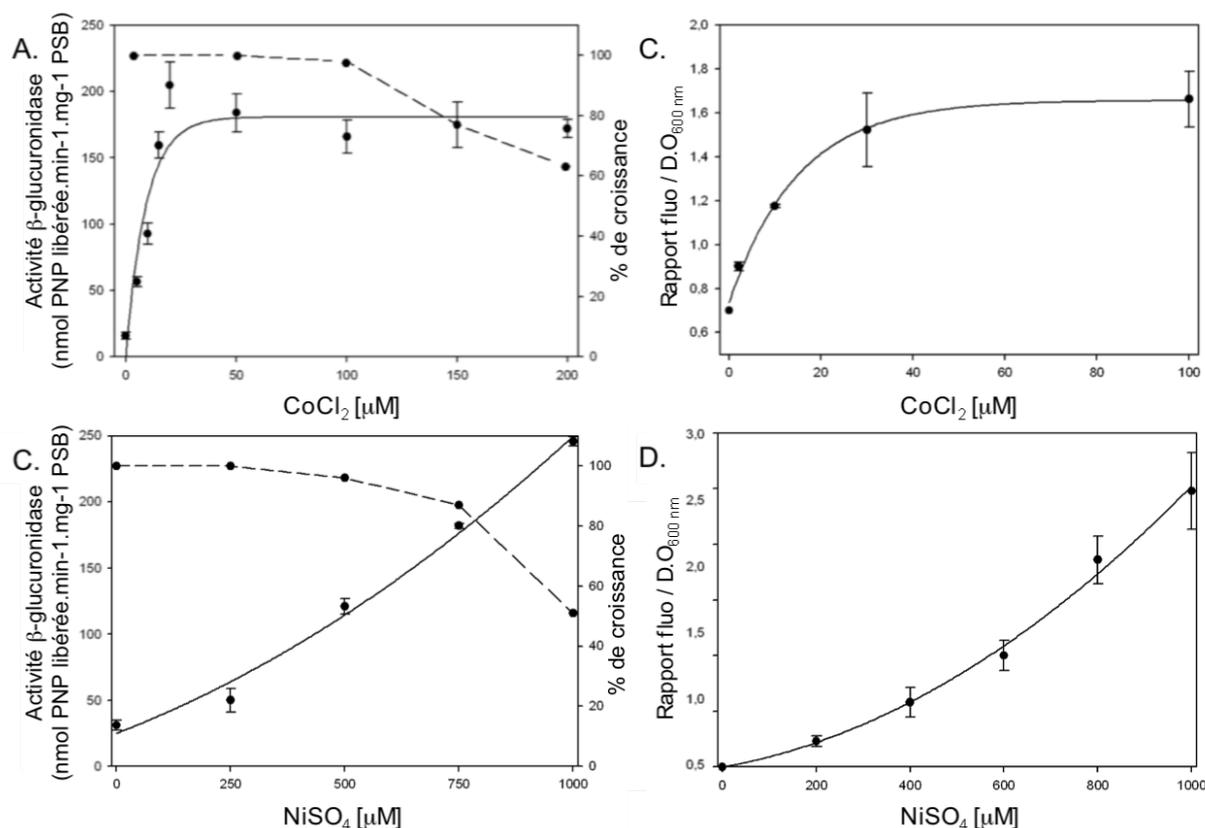


Figure 38 – Expression du gène *rcnA* en fonction de la quantité de Co^{2+} et de Ni^{2+}

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C avec des concentrations croissantes d'ions Co^{2+} et Ni^{2+} . Les résultats sont exprimés en nmol PNP libéré. min $^{-1}$. mg $^{-1}$ PSB (A. et C.) ou en rapport fluorescence / $D.O_{600\text{nm}}$ (B. et D.). Les activités enzymatiques sont dosées après 2 h de croissance. La fluorescence est mesurée à $\lambda_{510\text{nm}}$ après excitation à $\lambda_{490\text{nm}}$ puis rapportée à la $D.O_{600\text{nm}}$. La fluorescence est mesurée après 4 h de croissance. La moyenne ainsi que l'écart-type d'au moins 3 manipulations distinctes sont représentés. Le trait plein représente le profil d'expression de la fusion *rcnA-gène rapporteur* tandis que les pointillés montrent le pourcentage de croissance bactérienne par rapport à la condition sans métal ajouté.

Tableau 8 – Expression de la construction *rcnA-uidA* en fonction du temps de croissance

Temps de croissance (en h)	2	5
$D.O_{600\text{nm}}$	$\approx 0,5$	> 3
Activité β -glucuronidase + Ni^{2+}	181 (+/- 8)	52
Activité β -glucuronidase + Co^{2+}	165 (+/- 8)	66 (+/- 6)

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C avec des concentrations d'ions Ni^{2+} et Co^{2+} de respectivement 0,75 mM et 0,1 mM. Les métaux sont ajoutés à t_0 . Les résultats sont exprimés en nmol PNP libéré. min $^{-1}$. mg $^{-1}$ PSB. Le temps 2 h après inoculation correspond à la phase exponentielle de croissance des bactéries et après 5 h, les bactéries entrent en phase stationnaire. La moyenne ainsi que l'écart-type d'au moins 3 manipulations distinctes sont représentés.

d'évaluer l'importance du contexte génétique sur l'expression de l'opéron *rcnAB* alors que la fusion chromosomique modifie par définition le locus *rcnAB*. Les résultats pour la souche NMYO cultivée en milieu LB avec des concentrations croissantes en cobalt ou nickel sont représentés sur les figures 38 A. et C. tandis que ceux pour la construction plasmidique contenant la fusion *rcnA-gfp* sont donnés dans les figures 38 B. et D. Pour le cobalt, l'expression du gène rapporteur peut être représenté par une courbe exponentielle qui tend vers un maximum. Ainsi, une augmentation relativement linéaire est observée entre 0 et 25 μM puis l'expression se stabilise au-delà de cette concentration pour atteindre un plateau. En ce qui concerne le nickel, la réponse peut être modélisée par une courbe polynomiale de second degré entre 0 et 1 mM. Le coefficient de détermination R^2 est supérieur à 0,99 pour les deux métaux. Les deux constructions donnent des résultats comparables et peuvent donc être indifféremment utilisées pour l'étude de l'activité de P_{rcnAB} .

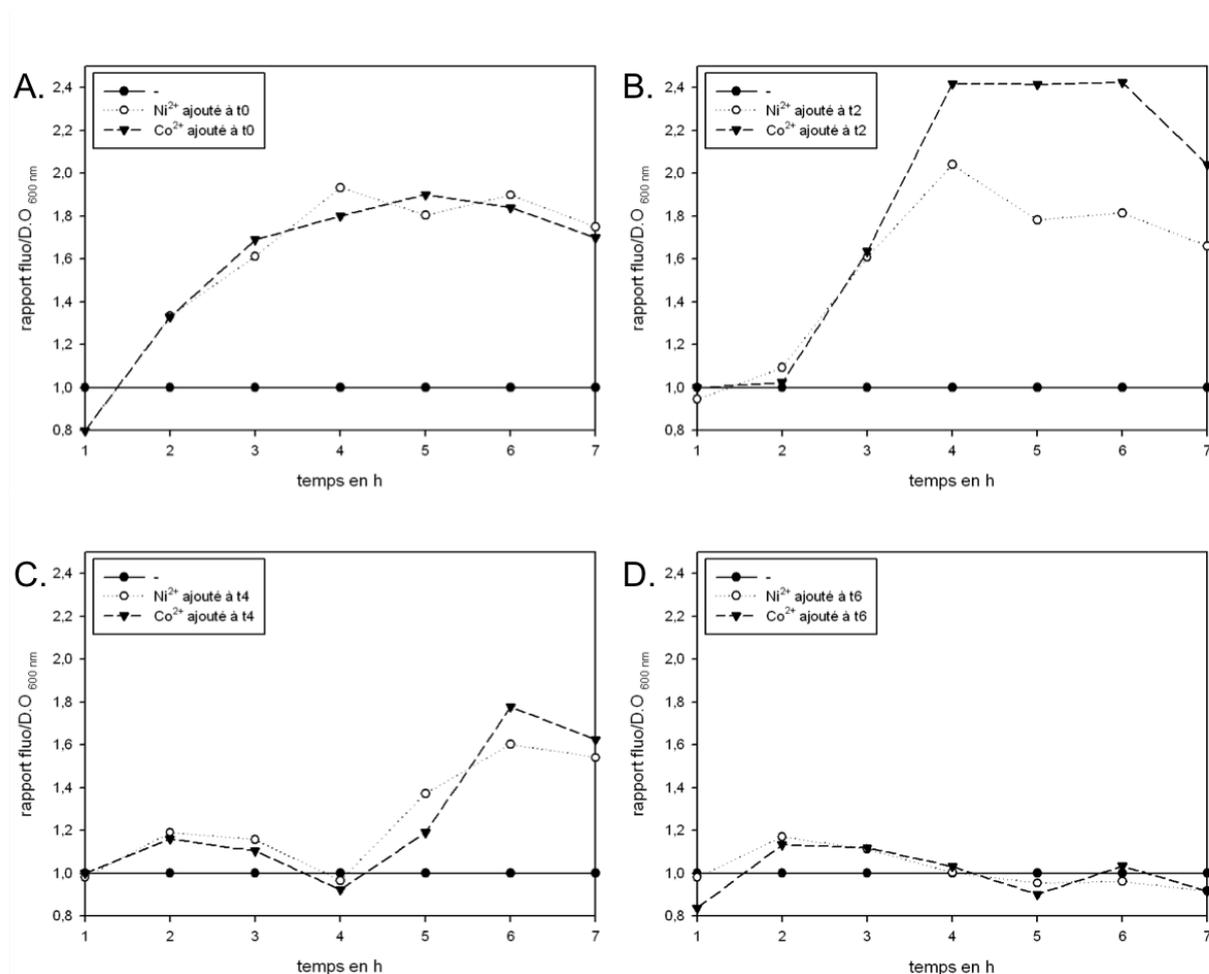
6.3 Régulation de l'expression de l'opéron *rcnAB* au cours de la croissance

6.3.1 Importance de la phase de croissance bactérienne

Pour poursuivre la caractérisation de P_{rcnAB} , la régulation temporelle de l'expression du système Rcn a été étudiée. En effet, en fonction de leur phase de croissance, les bactéries expriment différenciellement leur génome. Ainsi, pour étudier l'expression du système Rcn, des dosages d'activité de la fusion *rcnA-uidA* en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance ont été réalisés. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 8. Pour le nickel, l'activité de P_{rcnAB} est plus de 3 fois plus forte en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance et plus de 2 fois supérieure pour le cobalt. Ces résultats montrent clairement que l'expression du système Rcn varie en fonction de la croissance bactérienne et que celle-ci est plus forte en phase exponentielle de croissance qu'en phase stationnaire.

6.3.2 Cinétique de réponse du système Rcn aux ions Ni^{2+} et Co^{2+}

Pour mesurer l'adaptation des bactéries à des fluctuations du niveau d'ions métalliques dans leur environnement, une autre série d'expériences a été faite. Les bactéries possédant le plasmide p157 ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment décrit en milieu LB dans lequel des ions Ni^{2+} ou Co^{2+} ont été ajoutés après différents temps de croissance. La fluorescence qui reflète l'activité de la fusion *rcnA-gfp* a été suivie au cours du temps. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 39. Lorsque les métaux sont ajoutés à t_0 , c'est à dire au moment de l'inoculation, la production de GFP est visible après 1 h de culture. Puis, au cours du temps, la protéine GFP s'accumule et la fluorescence augmente [Figure 39 A.]. Lorsque les métaux sont ajoutés après deux ou quatre heures de culture, c'est à dire en début ou en fin de phase exponentielle de croissance,

Figure 39 – Cinétique d'expression de la construction *rcnA-gfp*

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C avec des concentrations de 500 μM d'ions Ni^{2+} et 50 μM d'ions Co^{2+} . La fluorescence est mesurée à $\lambda_{510 \text{ nm}}$ après excitation à $\lambda_{490 \text{ nm}}$. Les métaux sont ajoutés au moment de l'inoculation (A.) ou après 2 (B.), 4 (C.) ou 6 h (D.). La valeur de fluorescence est rapportée à la $\text{D.O}_{600 \text{ nm}}$ puis exprimée par rapport à la condition sans métal prise pour référence (= 1). La fluorescence est mesurée toutes les heures sur un aliquot de la culture.

le phénomène d'induction est visible et ce, après une heure de contact entre les bactéries et les métaux [Figure 39 B. et C.]. L'induction de l'opéron *rcnAB* est d'ailleurs plus prononcée après deux heures qu'après quatre heures. En revanche, lorsque les ions Ni^{2+} ou Co^{2+} sont apportés en phase stationnaire de croissance, après six heures de culture, aucune induction n'est visible une heure après [Figure 39 D.]. Le système *Rcn* ne semble donc répondre au stress provoqué par les ions Ni^{2+} et Co^{2+} que pendant la phase de croissance exponentielle. L'efficacité de l'induction décroît au fur et à mesure de l'avancement de la phase exponentielle.

6.4 Conclusion

L'opéron *rcnAB* est inductible par les ions Ni^{2+} et Co^{2+} via le métallorépresseur *RcnR*. Cette régulation est spécifique et n'est pas observée avec d'autres ions métalliques même si des interactions *in vitro* sont possibles. L'induction est proportionnelle à la quantité de métal présente dans le milieu mais un phénomène de saturation de la réponse est visible avec le cobalt. Enfin, l'induction est maximale pendant la phase exponentielle de croissance.

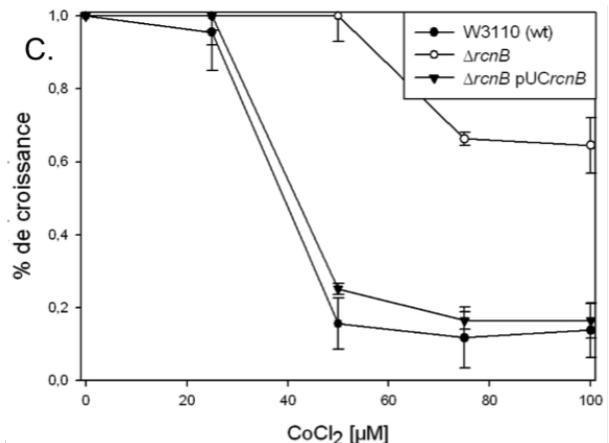
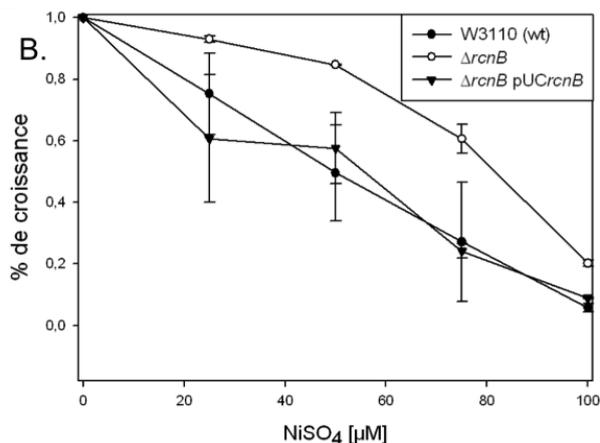
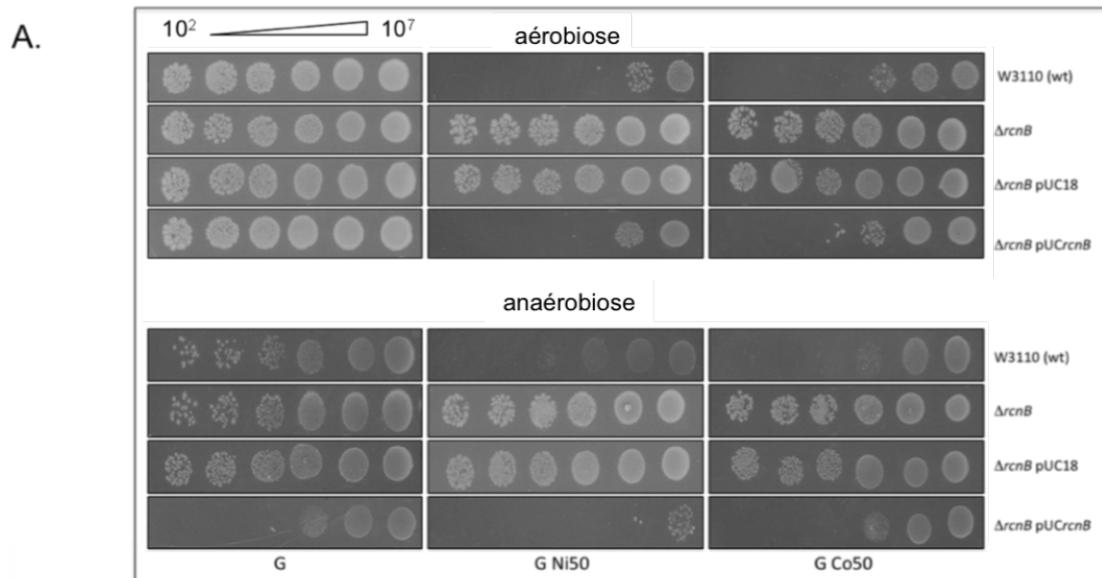


Figure 40 – Influence de la mutation de *rcnB* sur la résistance des bactéries aux ions nickel et cobalt

A. Méthode des gouttes. Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobie à 37°C jusqu'en phase stationnaire de croissance. Puis un aliquot de culture est dilué en cascades de 10⁻¹ en 10⁻¹. 5 μl des dilutions contenant de 10² (gauche) à 10⁷ (droite) bactéries sont déposés sur milieu minimum M63 + 0,4 % glucose (G) supplémenté le cas échéant par 50 μM de NiSO₄ ou CoCl₂. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C en conditions aérobie (haut) ou anaérobie (bas) pendant 24 à 48 h. Une expérience significative est présentée. **B.** et **C.** Résistance en milieu liquide. Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu M63 + 0,4 % glucose avec des concentrations croissantes en ions métalliques en conditions aérobie à 37°C pendant 16 h. La D.O_{600nm} est ensuite mesurée sur un aliquot. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métaux. La moyenne ainsi que l'écart-type de 2 manipulations distinctes sont représentées.

Chapitre 7

Rôle de RcnB dans l'homéostasie des ions nickel et cobalt

7.1 Implication du gène *rcnB* dans la résistance aux ions nickel et cobalt

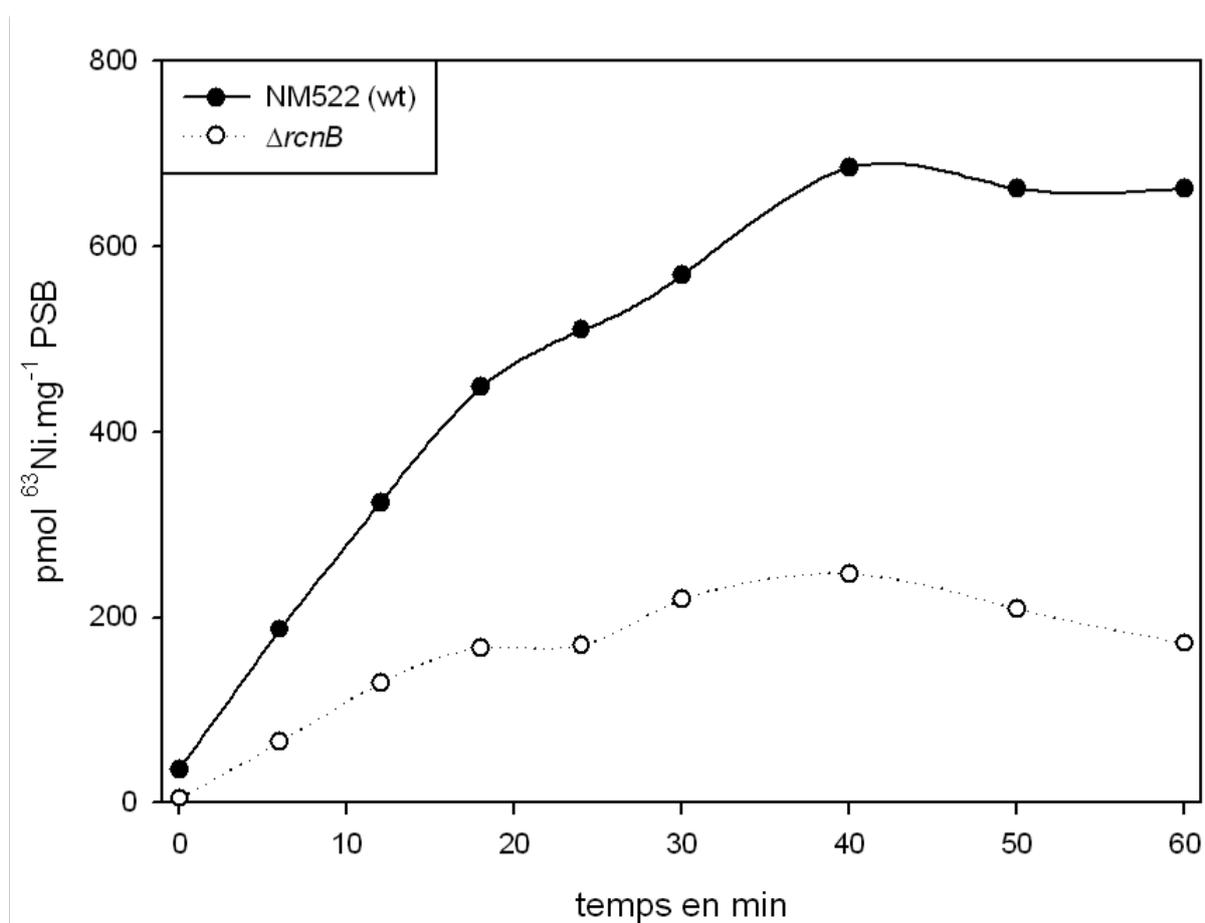
Le gène *rcnB* fait partie de l'opéron *rcnAB* ce qui suggère très fortement que les fonctions des deux gènes sont liées. Pour étudier la fonction du gène *rcnB*, un mutant ayant subi l'échange d'une cassette de résistance au chloramphénicol avec le gène *rcnB* a été construit. Le profil de résistance aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} de ce mutant par rapport à la souche sauvage W3110 a ensuite été déterminé ainsi que l'effet de la complémentation de ce mutant par un plasmide portant le gène *rcnB*. Sur milieu minimum gélosé tout d'abord, la souche sauvage est sensible aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} ($50 \mu\text{M}$) puisque des colonies sont observées seulement pour les plus faibles dilutions, entre 10^5 et 10^7 bactéries déposées pour les deux métaux [Figure 40 A.]. En revanche, le mutant *rcnB* ne montre aucune sensibilité à ces mêmes quantités d'ions Ni^{2+} et Co^{2+} puisque des colonies sont visibles même pour les dilutions les plus fortes. Ces résultats sont en opposition avec ceux observés pour le mutant *rcnA* puisque ce dernier est plus sensible au nickel et au cobalt que ne l'est la souche sauvage.

La complémentation du mutant *rcnB* par le gène *rcnB* sauvage porté sur un plasmide multi-copies permet de restaurer une sensibilité aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} comparable au phénotype sauvage. Cet effet est bien spécifique du gène *rcnB* puisque l'apport du plasmide vide n'a pas d'effet. Ces observations sont valables aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies ce qui signifie que RcnB a un rôle dans les deux cas. Toutefois, une différence intéressante est observée en anaérobiose. En effet, même en absence de métaux, l'apport du gène *rcnB* sur plasmide, qui entraîne une production importante de la protéine RcnB, a un effet délétère. Ainsi, seules les trois dilutions les plus faibles permettent de visualiser des colonies dans ces conditions alors que la croissance n'est pas affectée en aérobiose. Cela laisse supposer qu'une quantité trop importante de RcnB perturbe le métabolisme cellulaire anaérobie et ce, même en absence de nickel ou de cobalt ajouté dans le milieu. L'effet toxique observé est renforcé en présence de nickel ce qui n'est pas le cas pour le

Tableau 9 – Détermination par ICP-OES de l'accumulation des ions nickel et cobalt par les bactéries

souches	W3110 (wt)	$\Delta rcnB$	$\Delta rcnB$ pUCrcnB
Ni (ppm)	14,3 (+/- 0,2)	11,8 (+/- 0,2)	18,6 (+/- 0,1)
Co (ppm)	11,9 (+/- 0,5)	6,9 (+/- 0,1)	16,2 (+/- 0,1)

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB supplémenté par 500 μM de Ni^{2+} ou 50 μM de Co^{2+} en conditions aérobies à 37°C. Les bactéries sont récoltées à $\text{D.O}_{600nm} \approx 0,6$. Les résultats sont exprimés en ppm ($\mu\text{g métal.g}^{-1}$ PSB). La moyenne ainsi que l'écart-type de 2 cultures indépendantes sont présentés.

Figure 41 – Influence de la mutation de *rcnB* sur l'accumulation d'ions nickel

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB supplémenté par 500 μM de NiSO_4 en conditions aérobies à 37°C et les bactéries sont récoltées à $\text{D.O}_{600nm} \approx 0,6$ puis concentrées. 5 μM de ^{63}Ni sont ajoutés et un aliquot de cellules est filtré (0,45 μm) à intervalles de temps réguliers. Les résultats sont exprimés en $\text{pmol } ^{63}\text{Ni.mg}^{-1}$ PSB). Une expérience significative est présentée.

cobalt.

En milieu liquide et en présence de dioxygène, les résultats sont tout à fait comparables, le mutant *rcnB* est plus résistant et la complémentation par le gène *rcnB* restaure le profil sauvage que ce soit pour le nickel [Figure 40 B.] ou le cobalt [Figure 40 C.].

7.2 Effet de la mutation de *rcnB* sur la quantité cellulaire totale d'ions Ni^{2+} et Co^{2+}

7.2.1 Détermination de la quantité d'ions Ni^{2+} et Co^{2+} dans les bactéries

Afin de comprendre la raison de cette augmentation de résistance du mutant *rcnB*, un dosage de la quantité totale des métaux nickel et cobalt dans les cellules bactériennes a été réalisé. Pour cela, la méthode bio-physique de l'ICP-OES a été utilisée car elle permet de doser très précisément la teneur en métal d'un échantillon en s'affranchissant des contraintes physiologiques puisque les bactéries sont minéralisées au préalable. Cette manipulation a été effectuée en collaboration avec Florence Lagarde du laboratoire des sciences analytiques de l'école CPE¹ de Lyon. La détermination du contenu en nickel et cobalt des souches sauvages, $\Delta rcnB$ et $\Delta rcnB$ complétement par *rcnB* a été effectuée [Tableau 9]. Il est à noter que les cellules ont été cultivées dans du milieu supplémenté en métal car les niveaux de métaux dans le milieu de base sont trop faibles pour accorder une réelle signification aux valeurs mesurées². Le mutant *rcnB* accumule moins de nickel et de cobalt que la souche sauvage et la complémentation permet d'inverser le phénotype, les quantités de métaux accumulées étant même dans ce cas supérieures à celles observées pour la souche sauvage [Tableau 9].

7.2.2 Etude cinétique de l'accumulation des ions Ni^{2+}

Pour compléter cette observation, l'accumulation de ^{63}Ni par les souches sauvages et mutées a été suivie au cours du temps [Figure 41]. La vitesse d'accumulation du nickel radioactif est beaucoup moins importante pour la souche délétée de *rcnB* que pour la souche sauvage. Ainsi, après 40 minutes de contact entre les bactéries et les ions $^{63}\text{Ni}^{2+}$, l'accumulation de métal radioactif par les cellules mutantes est environ trois fois moins importante que pour la souche sauvage. A titre de comparaison, le mutant *rcnA* accumule environ deux fois plus de nickel radioactif que la souche sauvage.

De ces deux manipulations, dosage ICP-OES et étude cinétique, il ressort donc que la résistance aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} accrue chez le mutant *rcnB* peut être corrélée à une moindre accumulation de ces métaux par les bactéries.

1. Chime Physique Electronique

2. quantité de métal en deçà des limites de détection de la machine

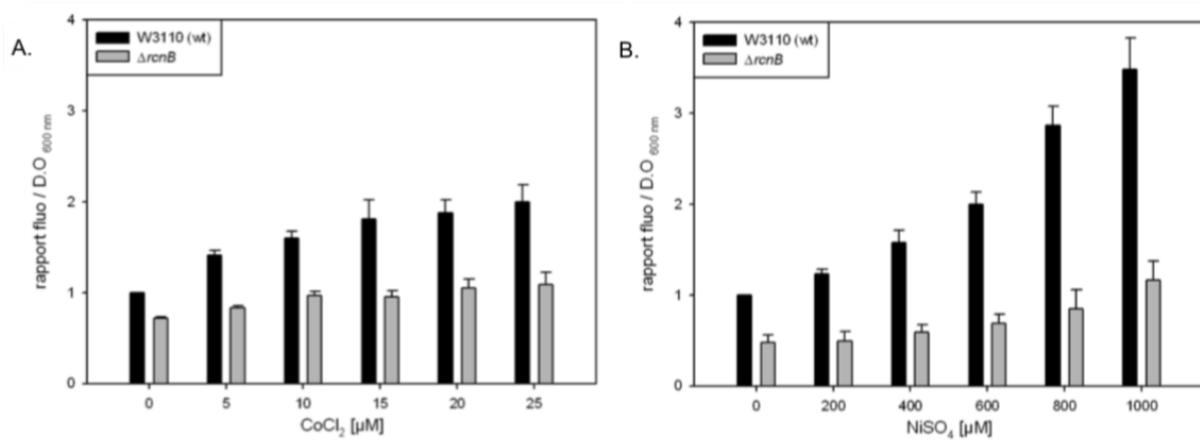


Figure 42 – Influence de la mutation de *rcnB* sur la réponse de la fusion *rcnA-gfp* aux ions Ni^{2+} et Co^{2+}

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB pour des concentrations croissantes d'ions Co^{2+} (A.) et Ni^{2+} (B.) en conditions aérobies à 37°C. La fluorescence est mesurée à $\lambda_{510\text{ nm}}$ après excitation à $\lambda_{490\text{ nm}}$. La valeur de fluorescence est rapportée à la $D.O_{600\text{ nm}}$ puis exprimée par rapport à celle de la souche sauvage dans la condition sans métal prise pour référence (= 1). La fluorescence est mesurée après 4 h de croissance. La moyenne ainsi que l'écart-type d'au moins 3 manipulations distinctes sont représentés.

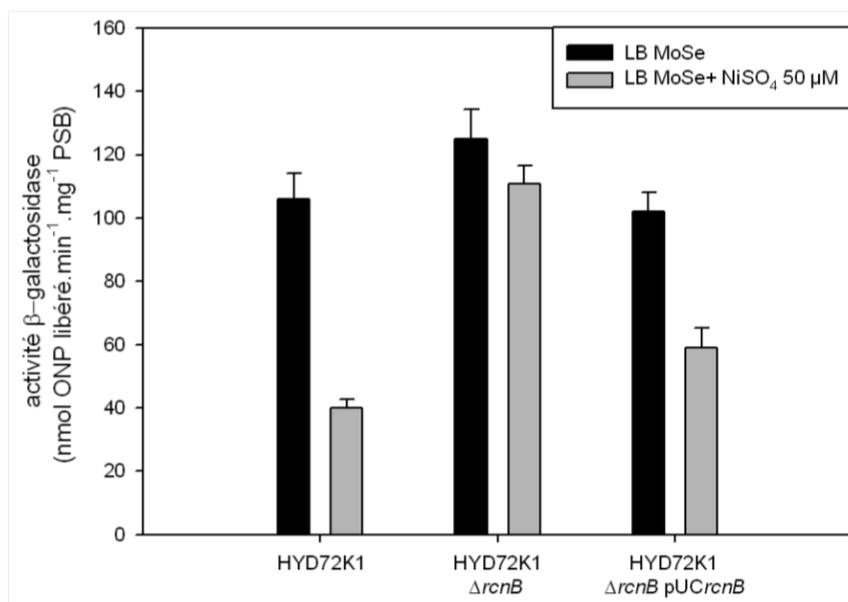


Figure 43 – Influence de la mutation de *rcnB* sur la réponse de la fusion *nika : lacZ* au nickel

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB MoSe supplémenté (barres grises) ou non (barres noires) par 50 μM de $NiSO_4$ en conditions anaérobies à 37°C. Les résultats sont exprimés en nmol ONP libéré. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ PSB. Les activités enzymatiques sont dosées après 16 h de croissance. La moyenne ainsi que l'écart-type d'au moins 3 manipulations distinctes sont représentés.

7.3 Effet de la mutation de *rcnB* sur la quantité cytoplasmique d'ions Ni^{2+} et Co^{2+}

7.3.1 Modulation de l'expression de l'opéron *rcnAB*

Afin de mieux comprendre la baisse de l'accumulation des ions Ni^{2+} et Co^{2+} chez le mutant *rcnB*, des expériences portant sur l'induction de l'opéron *rcnAB* ont été réalisées. En effet, cet opéron est inductible par les ions Ni^{2+} et Co^{2+} de manière dépendante de la dose comme montré précédemment [voir 6.2] et son expression reflète la quantité de métaux présents dans le cytoplasme. La fusion d'un gène rapporteur au gène *rcnA* permet donc d'avoir un biodétecteur dont l'activité est modulée par les ions Ni^{2+} et Co^{2+} . Pour cette expérience, le plasmide portant la fusion transcriptionnelle *rcnA-gfp* a été employé pour transformer la souche sauvage mais également la souche mutante privée du gène *rcnB*. La fluorescence des bactéries a ensuite été mesurée en présence des ions Co^{2+} [Figure 42 A.] et Ni^{2+} [Figure 42 B.]. Pour le cobalt comme pour le nickel, la fluorescence mesurée est plus faible dans le mutant *rcnB* que dans la souche sauvage quelle que soit la concentration de métal ajouté. L'opéron *rcnAB* est donc moins induit chez ce mutant ce qui confirme que la quantité cytoplasmique de ces métaux est plus faible chez un mutant *rcnB* que chez une souche sauvage.

7.3.2 Modulation de l'expression de l'opéron *nikABCDE*

Les résultats précédents ont été corroborés en utilisant un autre système rapporteur basé sur l'opéron *nikABCDE*. Pour cela, la souche HYD72K1 qui possède la fusion transcriptionnelle *nikA-lacZ* a été utilisée. Comme évoqué en introduction, l'expression de l'opéron *nikABCDE* est réprimée par le nickel et l'activité enzymatique de la β -galactosidase codée par *lacZ* permet donc de refléter la concentration cytoplasmique des ions Ni^{2+} [314]. Cette activité a été dosée pour la souche HYD72K1, sa souche dérivée privée de *rcnB* ainsi que cette même souche complémentée par *rcnB* [Figure 43]. Lorsque les cultures sont effectuées en milieu LB MoSe (barres noires sur la figure), aucune différence significative entre les trois souches n'est observée, l'opéron *nikABCDE* s'exprime fortement. En revanche, lorsque 50 μM de NiSO_4 sont ajoutés (barres grises), une répression partielle de l'expression de la fusion est observée pour la souche sauvage. Or, pour cette même concentration, aucun effet n'est observé pour le mutant *rcnB* qui dérive de cette souche alors que la complémentation par le gène *rcnB* restaure bien le phénotype sauvage. L'opéron *nikABCDE* n'est donc pas réprimé, même partiellement, chez un mutant *rcnB* dans ces conditions alors qu'il l'est chez la souche sauvage. Les mêmes dosages ont été effectués pour une concentration supérieure de nickel (500 μM) et dans ce cas, l'expression de *nikABCDE* est complètement abolie pour la souche sauvage comme pour la souche mutée³.

Chez un mutant délété du gène *rcnB*, l'opéron *rcnAB* est moins induit alors que l'ex-

3. données non présentées

pression de l'opéron *nikABCDE* est moins réprimée. Ces deux manipulations portant sur des systèmes rapporteurs de la concentration des ions Ni^{2+} et Co^{2+} du cytoplasme aboutissent donc à la même conclusion : la quantité cytoplasmique d'ions Ni^{2+} et Co^{2+} bio-disponible est plus faible chez un mutant *rcnB*. Deux hypothèses sont donc envisageables. *RcnB* peut soit favoriser l'entrée des ions Ni^{2+} et Co^{2+} dans la cellule, via le système Nik par exemple, soit limiter l'efflux en interagissant probablement avec la protéine *RcnA*.

7.3.3 Etude de l'impact de la mutation de *rcnB* sur la physiologie du nickel par suivi de l'activité hydrogénase

Les hydrogénases sont des enzymes qui nécessitent la fixation du nickel pour exercer leur fonction biologique bien qu'elles soient synthétisées même en absence de ce métal [106]. Ainsi, une modulation de la quantité cytoplasmique de nickel via le système *Rcn* peut se répercuter sur l'activité hydrogénase des bactéries. Pour tester cette hypothèse, l'activité hydrogénase totale des bactéries a été dosée chez les mutants des deux composants *RcnA* et *RcnB* du système [Figure 44 A.]. La souche HYD720 dont l'opéron *nikABCDE* est inactivé sert de témoin car son activité hydrogénase, totalement abolie en LB MoSe, peut être entièrement restaurée par l'ajout de nickel dans le milieu, le nickel pénétrant alors dans les cellules par des transporteurs aspécifiques [314]. Les deux simples mutants délétés de *rcnA* ou *rcnB* ont une activité comparable à celle de la souche sauvage. En revanche, la complémentation par le gène *rcnA* seul, provoquant une surproduction de la protéine *RcnA*, diminue de façon significative l'activité hydrogénase alors que la surproduction de la protéine *RcnB* seule n'a aucun effet.

L'activité des hydrogénases est strictement dépendante de leur maturation. Lorsque le nickel est limitant, la forme précurseur de la grande sous-unité ne peut pas être maturée. L'incorporation du nickel dans le site actif s'accompagne du clivage protéolytique de la partie C-terminale de la grande sous-unité et la protéine ainsi maturée aura alors une taille légèrement inférieure [voir 2.2.5]. L'immuno-détection de la sous-unité HybC de l'hydrogénase 2 a donc été réalisée [Figure 44 B.]. Pour la souche HYD720 dépourvue de toute activité hydrogénase, seule la forme précurseur est visible (piste 6). Mais lorsque le milieu est supplémenté en nickel, HybC est correctement maturée (piste 7). Pour la souche surproduisant la protéine *RcnA*, un mélange des formes précurseur et mature est observé (piste 3) ce qui explique l'activité hydrogénase diminuée. Pour toutes les autres souches, HybC est correctement maturée ce qui peut être relié à une activité hydrogénase normale.

Ces manipulations indiquent donc que la surproduction de *RcnA* provoque un efflux massif des ions Ni^{2+} qui a des répercussions sur l'activité hydrogénase des bactéries. En revanche, la diminution de nickel intracellulaire observée préalablement chez le mutant *rcnB* n'a pas une incidence directe sur l'activité hydrogénase globale.

Les hydrogénases sont exprimées en conditions anaérobies et sont dépendantes du nickel qui pénètre dans la cellule grâce au transporteur *nikABCDE*. La présence de ce transporteur est donc susceptible de masquer l'effet provoqué par l'absence de la protéine

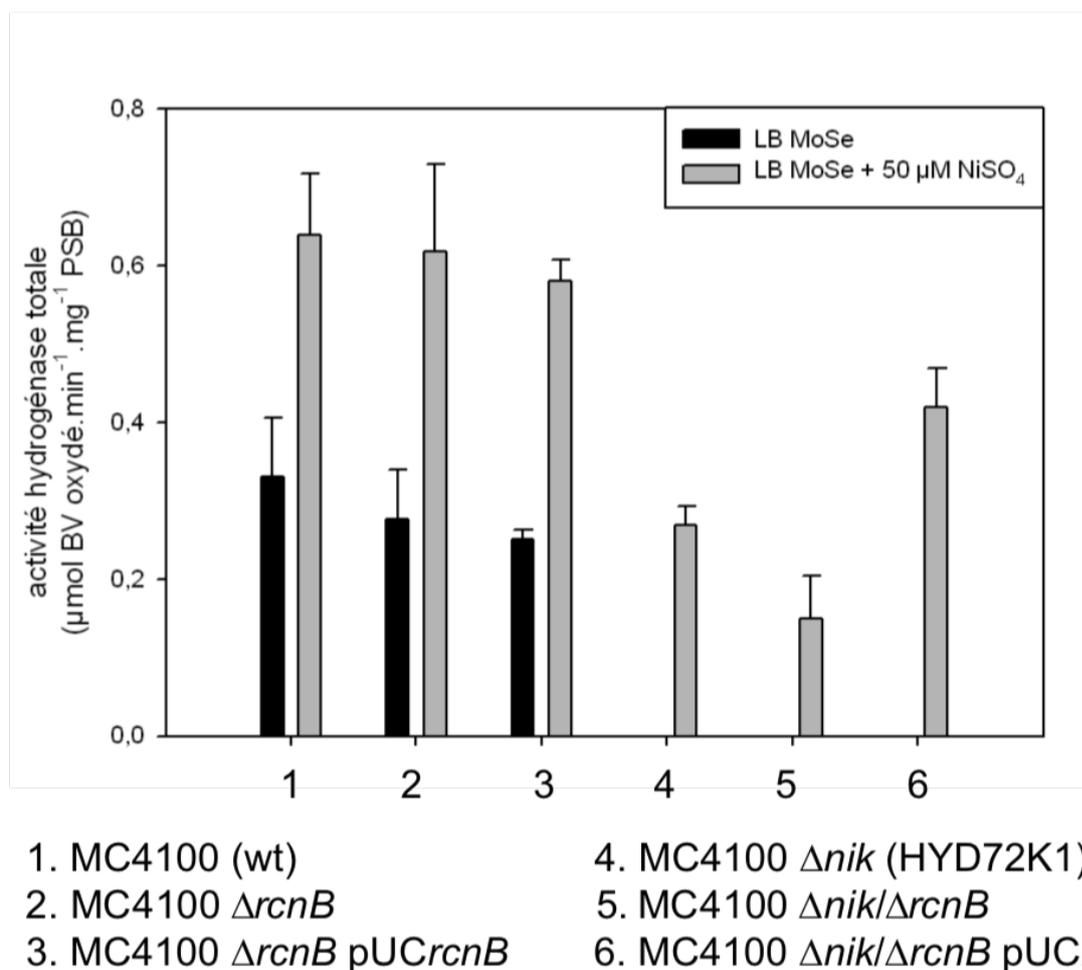


Figure 45 – Effets relatifs de NikABCDE et *RcnB* sur l'activité hydrogénase des bactéries

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB MoSe en présence (barres grises) ou non (barres noires) de 50 μM de NiSO_4 en conditions anaérobies à 37°C. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol BV oxyd. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ PSB}$. Les activités enzymatiques sont dosées après 4 h de croissance. La moyenne ainsi que l'écart-type d'au moins 3 manipulations distinctes sont représentés.

RcnB. Pour tester cette hypothèse, la souche HYD72K1 qui contient la fusion *nikA-lacZ*, et donc ne peut pas exprimer le transporteur NikABCDE, a été utilisée ainsi que sa dérivée privée de *rcnB*. L'activité hydrogénase de ces souches a pu ensuite être comparée au simple mutant $\Delta rcnB$ ainsi qu'à la souche sauvage [Figure 45]. La première série de dosages a été réalisée sur des bactéries cultivées en milieu LB MoSe et donc en conditions limitantes de nickel (barres noires sur la figure). Dans ces conditions, le mutant $\Delta rcnB$, comme la souche complémentée par le plasmide portant *rcnB*, possèdent une activité hydrogénase comparable à celle de la souche sauvage MC4100. Pour les trois autres souches pour lesquelles le système Nik est absent, aucune activité hydrogénase n'est observée confirmant bien l'absolue nécessité de ce système d'import spécifique du nickel dans ces conditions. Cette série confirme bien les observations réalisées pour la souche NM522⁴ à savoir l'absence d'influence du gène *rcnB* sur l'activité hydrogénase [Figure 44 A.]. Une deuxième série de dosages a alors été faite sur des cellules cultivées en milieu LB MoSe + 50 μM NiSO₄ (barres grises). Cette concentration de nickel permet d'une part de stimuler l'activité hydrogénase de la souche sauvage mais également de restaurer partiellement celle de la souche HYD72K1. Dans ces conditions, la simple mutation du gène *rcnB* ainsi que la complémentation de ce mutant par le gène *rcnB* sauvage n'ont toujours aucun effet (souches 1, 2 et 3). En revanche, une différence est observée pour les souches ne possédant pas le système Nik. En effet, le double mutant $\Delta nik/\Delta rcnB$ (piste 5) a une activité hydrogénase significativement diminuée par rapport au simple mutant Δnik (piste 4). De plus, la complémentation de ce double mutant par le plasmide portant *rcnB* inverse le phénotype en augmentant cette activité (piste 6). Or, l'activité hydrogénase étant corrélée à la quantité de nickel intracellulaire, cela signifie que le double mutant $\Delta nik/\Delta rcnB$ accumule moins de nickel que le simple mutant Δnik et qu'au contraire, la présence de RcnB surproduite stimule la teneur intracellulaire en nickel. En absence du transporteur NikABCDE, l'effet de *rcnB* sur l'activité hydrogénase des bactéries est donc bien visible. Cela montre que la fonction de *rcnB* est indépendante du système Nik qui permet l'entrée du nickel dans la cellule. De plus, en présence de nickel, l'activité hydrogénase d'un double mutant *nik-rcnB* est certes très réduite mais elle n'est pas complètement abolie. Cela montre qu'il existe au moins un autre système impliqué dans l'entrée du nickel indépendant de *rcnB*.

7.4 Rôle de *rcnB* dans le système Rcn

7.4.1 Apports respectifs de RcnA et RcnB au phénomène de résistance aux ions Ni²⁺ et Co²⁺.

La première hypothèse de l'implication de RcnB dans l'import des ions Ni²⁺ paraissant inexacte, la possibilité d'un rôle en relation avec RcnA a été étudiée. Les deux gènes *rcnA* et *rcnB* étant d'ailleurs organisés en opéron chez *E. coli*, cette fonction est plus probable. L'étude de la fonction de chacun des 2 gènes *rcnA* et *rcnB* dans la résistance aux ions Ni²⁺

4. même si l'activité basale est plus faible pour la souche MC4100 que pour la souche NM522

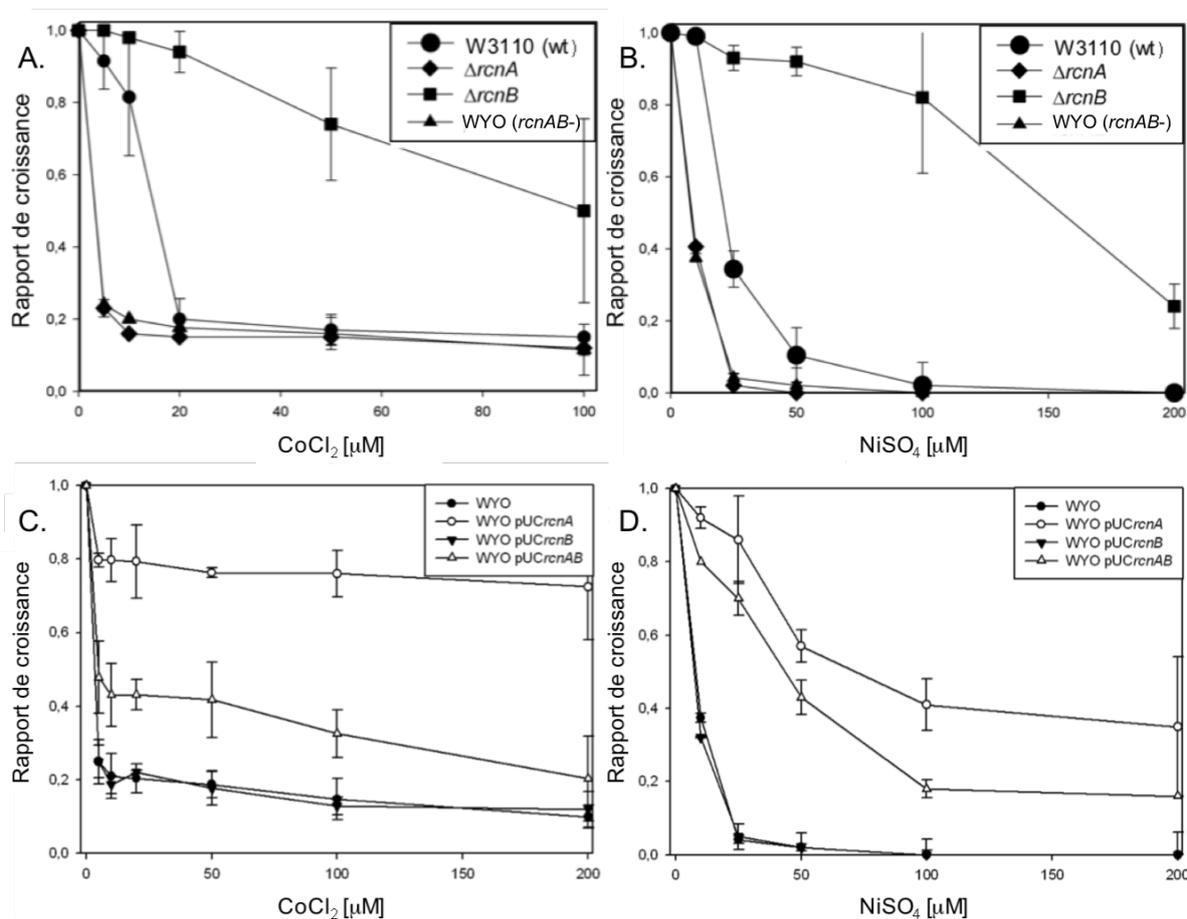


Figure 46 – Effet des différents composants du système Rcn sur la résistance au nickel et au cobalt.

Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu M63 + 0.4 % glucose avec des concentrations croissantes en ions Co^{2+} (A. et C.) ou Ni^{2+} (B. et D.) en conditions aérobies à 37°C pendant 16 h. La $D.O_{600nm}$ est ensuite mesurée sur un aliquot. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métaux. La moyenne ainsi que l'écart-type de 3 manipulations distinctes sont représentées.

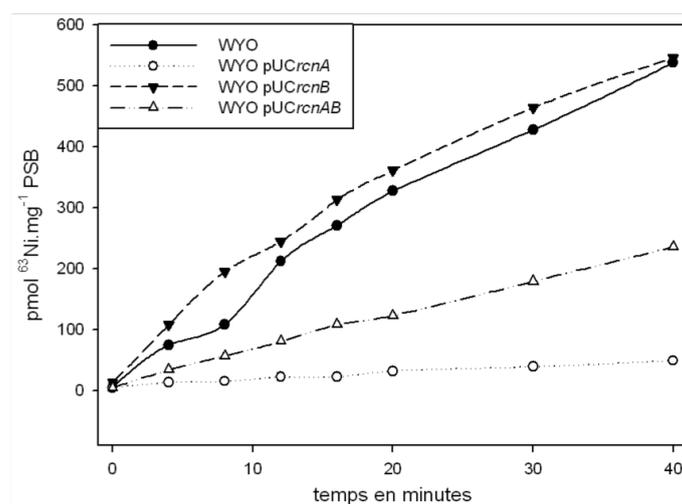


Figure 47 – Effet des différents composants du système Rcn sur l'accumulation d'ions nickel

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB supplémenté par 500 μM de NiSO_4 en conditions aérobies à 37°C et les bactéries sont récoltées à $D.O_{600nm} \approx 0,6$ puis concentrées. 4 μM de ^{63}Ni sont ajoutés et un aliquot de cellules est filtré (0,45 μm) à intervalles de temps réguliers. Les résultats sont exprimés en pmol $^{63}\text{Ni} \cdot \text{mg}^{-1}$ PSB).

et Co^{2+} a été menée. Pour cela, la souche WYO dérivant de la souche parentale W3110 et contenant la fusion *rcnA-widA* a été employée. En effet, il a été montré par des expériences de qRT-PCR que l'insertion de la cassette *widA* dans le cadre de lecture de *rcnA* a un effet polaire sur le gène *rcnB* et abolit complètement l'expression de celui-ci⁵. La souche WYO peut donc être considérée comme un double mutant *rcnAB*⁻. Cette souche présente une sensibilité plus marquée que la souche sauvage par rapport au cobalt et au nickel [Figures 46 A. et B.]. Or, la souche simplement délétée du gène *rcnA* présente un phénotype tout à fait comparable, les courbes étant parfaitement superposées. La présence ou non de *rcnB* n'affecte donc pas le profil de résistance aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} dès lors que *rcnA* est absent.

L'effet de la complémentation du double mutant WYO par le gène *rcnA* seul, le gène *rcnB* seul ou l'opéron complet *rcnAB* a été étudié par la suite. Les résultats pour le cobalt [Figure 46 C.] et le nickel [Figure 46 D.] sont tout à fait comparables. Le double mutant WYO présente une très grande sensibilité aux métaux. La complémentation par *rcnA* seul démultiplie la résistance aux deux types d'ions par rapport à la souche WYO comme précédemment observé pour la souche MC4100 [233]. En revanche, la complémentation par *rcnB* seul n'a aucun effet, qu'il soit positif ou négatif, sur la résistance de cette souche. Lorsque l'opéron complet *rcnAB* est apporté, la résistance observée se situe à un niveau intermédiaire entre la souche WYO et la souche complétementée par *rcnA* seul.

Ces données permettent d'avancer l'hypothèse que RcnB fonctionne en interaction avec RcnA puisque, en absence de RcnA, la protéine RcnB n'a pas d'effet. En revanche, en présence de RcnA, l'importance de RcnB est bien visible.

7.4.2 Apports respectifs de RcnA et RcnB au phénomène d'accumulation des ions Ni^{2+} et Co^{2+} .

Les profils de résistance de la souche WYO complétementée par les différents plasmides ont été parfaitement confirmés par la cinétique d'accumulation de ^{63}Ni par ces mêmes souches [Figure 47]. La complémentation par *rcnB* seul n'a aucun effet significatif sur l'accumulation du nickel alors que la complémentation par *rcnA* seul diminue celle-ci de façon très importante. Lorsque les deux gènes sont apportés sur le même plasmide, l'accumulation de $^{63}\text{Ni}^{2+}$ est intermédiaire entre le double mutant et cette même souche complétementée par *rcnA* seul. De plus, la souche délétée du gène *rcnA* seul a un profil d'accumulation du nickel tout à fait comparable à celle du double mutant WYO⁶ ce qui confirme que RcnB n'influence pas l'accumulation de nickel en absence de *rcnA*.

Ces données indiquent donc que le gène *rcnB* joue un rôle dans la résistance aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} . Les résultats suggèrent que RcnB module l'efflux effectué par RcnA. La nature exacte des interactions entre RcnA et RcnB reste toutefois inconnue et des investigations supplémentaires sont requises pour comprendre le mécanisme d'action du système Rcn.

5. données non présentées

6. données non présentées

7.5 Conclusion

Comme suggéré par le fait que *rcnB* soit co-transcrit avec *rcnA*, le gène *rcnB* a un rôle dans l'homéostasie des ions Ni^{2+} et Co^{2+} chez *E. coli*. Mais de façon surprenante, son absence provoque une hausse de la résistance à ces métaux. Cet effet est directement corrélé à une baisse de la teneur globale en ions Ni^{2+} et Co^{2+} dans les cellules. Cette carence en nickel a un effet physiologique car l'activité des hydrogénases, métalloenzymes à nickel, est diminuée chez un mutant *rcnB* toutefois uniquement dans le cas de l'absence du système *nikABCDE*. L'effet de *rcnB* est visible uniquement en présence de *rcnA* ce qui suggère que RcnB pourrait agir en inhibant partiellement l'efflux de la pompe membranaire RcnA afin d'assurer l'homéostasie des ions Ni^{2+} et Co^{2+} dans la cellule. Pour tenter de mieux comprendre la fonction de RcnB, la caractérisation biochimique de la protéine a été effectuée.

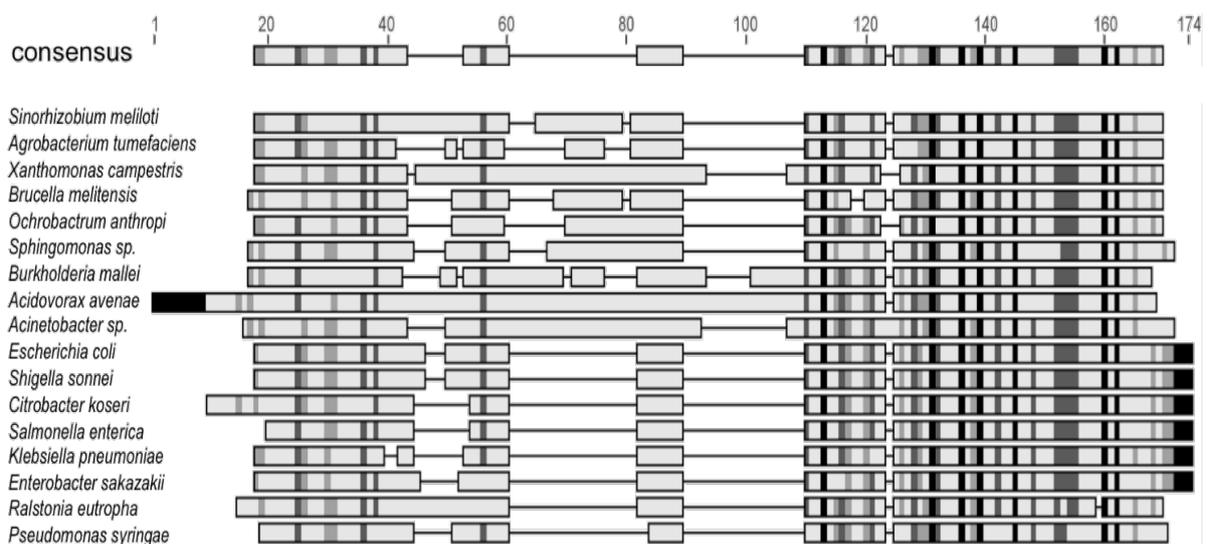


Figure 48 – Alignement graphique de la protéine RcnB de différents organismes

Les noms des genres d'où sont issues les séquences sont indiqués. Le niveau de gris représente la conservation des résidus du moins conservé en blanc au plus conservé en noir. Pour le consensus, le niveau de conservation va du moins conservé en rouge au plus conservé en vert. Les séquences sont alignés avec l'outil Clustal et visualisés grace au logiciel CLC viewer.

Chapitre 8

Caractérisation biochimique de la protéine RcnB

8.1 Etude bioinformatique de la protéine RcnB

E. coli est probablement l'un des organismes vivants les plus étudiés au monde et beaucoup de données le concernant sont disponibles grâce à cela. Ainsi, son génome est entièrement séquencé et annoté depuis 1997 [315] même si certains gènes restent de fonction inconnue. Ceci est le cas pour le gène *rcnB* encore appelé *yohN* dans les bases de données. Ici, la base SwissProt a été utilisée pour la caractérisation de la protéine RcnB. La séquence primaire de celle-ci se compose de 112 acides aminés avec une masse totale de 12466 Da pour un pI = 6,82. La séquence primaire est :

```
MTIKNKMLLGALLLVTSAAWAAPATAGSTNTSGISKYELSSFIADFKHFKPGDTPPEMYR-  
TDEYNIKQWQLRNLPA PDAGTHW TYMGGAYVLISDTDGKIIKAYDGEIFYHR
```

Cette séquence ne possède aucune caractéristique particulière exceptée l'absence de résidus cystéines. Le coefficient d'extinction molaire ϵ est estimé à $26930 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La présence d'un peptide signal est prédite avec un site de clivage situé après le résidu alanine 21 ($\text{AWA}_{21}/\text{A}_{22}\text{PA}$). Chez les bactéries, un tel peptide est caractéristique des protéines transloquées hors du cytoplasme via le système d'exportation des protéines Sec. Mis à part ce signal, aucun domaine de fonction décrite n'est présent dans la protéine RcnB. En revanche, RcnB contient le domaine DUF3315 retrouvé dans plus d'une centaine de gènes d'espèces de α , β et γ protéobactéries. Ce domaine est notamment caractérisé par la grande conservation des résidus leucine, proline et tryptophane en gras dans la séquence. L'alignement de RcnB avec les protéines les plus proches en identité contenant le domaine DUF3315 met en relief la relative bonne conservation de la moitié C-terminale de la protéine RcnB où se trouve ce domaine tandis que la partie N-terminale est peu conservée [Figure 48].

8.2 La répartition du système Rcn dans les bactéries

La protéine RcnA a initialement été identifiée chez *E. coli* par une approche bioinformatique. Elle possède toutefois de nombreux homologues chez des α , β et γ protéobactéries et chez des archées. Ainsi 81 gènes homologues du gène *rcnA* provenant de 64 espèces bactériennes

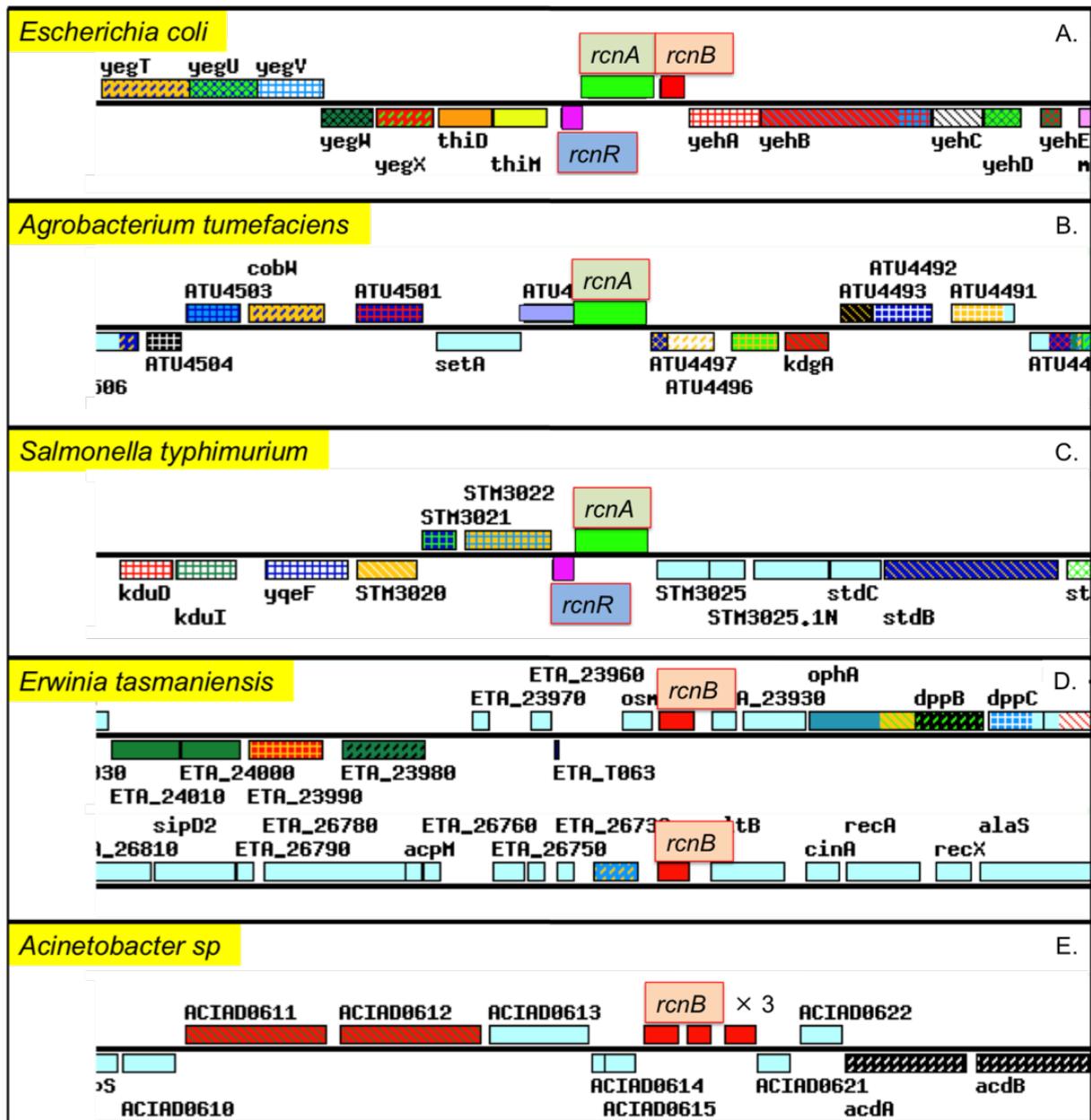


Figure 49 – Organisation du système Rcn dans différents organismes

Le gène *rcnA* est figuré en vert, le gène *rcnR* en bleu et le gène *rcnB* en orange. L'orientation ainsi que certains noms des gènes de la région du système sont donnés à titre indicatif. La position dans les génomes (en paires de bases) est également indiquée. Les organismes d'où proviennent les génomes sont entourés en rouge. Les chiffres 1, 2, 3 et 4 marquent les différentes organisations possibles du système Rcn.

différentes sont référencés dans la base de données MBGD. De manière intéressante, l'architecture du système Rcn avec ses trois composants RcnR, RcnA et RcnB tels qu'ils sont présents chez *E. coli* n'est pas universelle. Bien au contraire, elle ne représente qu'un cas isolé propre à cet organisme et à un autre très proche, *Shigella sonnei* [Figure 49 A.]. Pour la majorité des homologues de *rcnA*, le gène apparaît complètement isolé de tout autre gène apparenté au système Rcn comme pour *Agrobacterium tumefaciens* [Figure 49 B.]. Toutefois, les homologues de *rcnA* ne sont véritablement isolés que dans certains organismes (19/81). En effet, la majorité des gènes *rcnA* sont co-localisés avec d'autres gènes dont la fonction reste très majoritairement inconnue même si certains sont annotés comme faisant partie de systèmes de résistance aux métaux ou aux antibiotiques. Il est intéressant de remarquer qu'un gène codant une protéine de faible poids moléculaire, prédite pour être localisée dans le périplasme et de fonction inconnue est très fréquemment retrouvée juste en amont des homologues *rcnA*. Ces caractéristiques sont retrouvées pour la protéine RcnB bien qu'il n'y ait pas de similarité de séquence primaire.

Les systèmes les plus proches au niveau de l'architecture du système Rcn d'*E. coli* sont ceux composés par le gène du régulateur et celui codant pour le transporteur¹. Ceux-ci sont au nombre de 16 et sont présents chez des bactéries également proches de *E. coli* sur un plan évolutif comme *Salmonella typhimurium* [Figure 49 C.]. Parmi ces 16 systèmes, le gène du régulateur est placé en amont du gène de la protéine effectrice pour 15 d'entre eux dont 12 sont immédiatement adjacents ; et en aval dans 1 seul cas.

Tout comme le gène *rcnA*, le gène *rcnB* est retrouvé le plus souvent isolé dans les génomes. Dans la base de données MBGD, 52 gènes homologues de *rcnB* sont référencés provenant de 37 espèces différentes de α , β ou γ protéobactéries. Dans certains organismes comme *Erwinia tasmaniensis* par exemple, il existe deux copies du gène *rcnB* [Figure 49 D.]. Ces deux copies sont isolées l'une de l'autre dans le génome qui contient par ailleurs une seule copie du gène *rcnA* également isolée. De plus, dans le génome des bactéries du genre *Acinetobacter*, le gène *rcnB* existe sous forme de clusters de trois copies adjacentes du même gène [Figure 49 E.].

Toutes ces données indiquent que le système Rcn de *E. coli* ne constitue pas l'archétype du système Rcn retrouvé chez les bactéries et que la fonction de RcnB n'est probablement pas exclusivement liée à ce système.

8.3 Purification de la protéine RcnB

Pour progresser dans la compréhension de la fonction de RcnB, la purification de la protéine native a été réalisée. Pour cela, le cadre de lecture du gène *rcnB* a été cloné dans le vecteur de surexpression pET30 inductible par l'IPTG. La surproduction a ensuite été effectuée dans la souche *E. coli* BL21. Après 4 h d'induction par l'IPTG, l'accumulation de la protéine RcnB est contrôlée sur gel [Figure 50 A.] puis les bactéries sont lysées pour libérer le contenu cellulaire.

La purification de RcnB a nécessité de nombreuses manipulations de mise au point. L'hypothèse de départ était que RcnB, étant impliquée dans un système de résistance aux ions Ni^{2+} et Co^{2+} , possédait de l'affinité pour ces ions et serait retenue sur une matrice chargée par des ions Ni^{2+} ou Co^{2+} . Des colonnes ont donc été préparées pour tester cela. Il s'est avéré que la protéine n'était pas du tout retenue sur de telles colonnes et était directement éluée dans la

1. du type *rcnR-rcnA* pour comparer avec le système d'*E. coli*

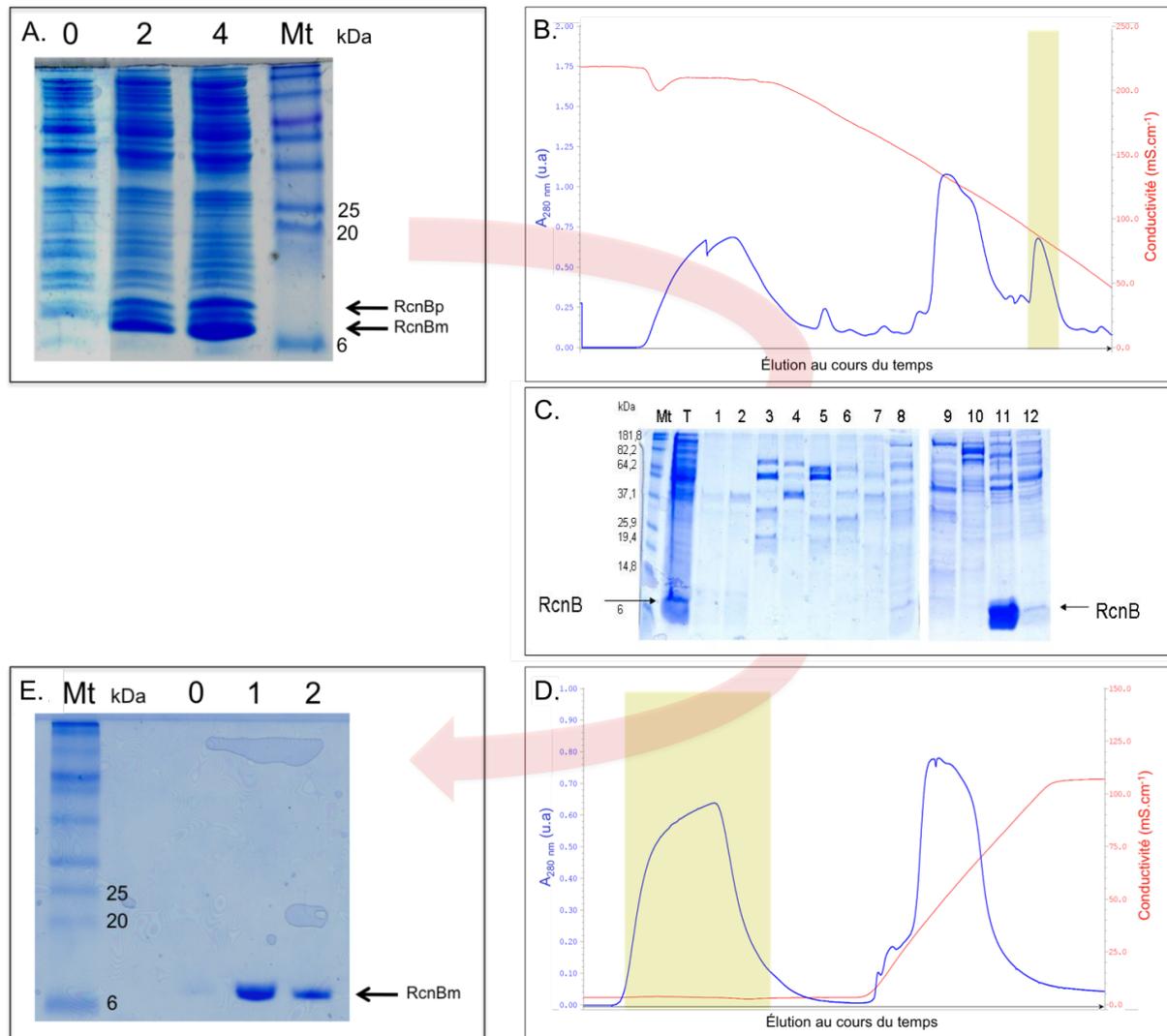


Figure 50 – De la production à la purification de la protéine RcnB

A. Le contrôle de la surproduction de RcnB est effectué en déposant un aliquot des cultures après 0, 2 ou 4 h d'induction par l'IPTG. Les formes précurseurs RcnBp (12 kDa) et mûres RcnBm (10 kDa) sont indiquées ainsi que la taille des marqueurs de taille (Mt) les plus proches. **B.** Elutogramme obtenu avec la première colonne d'interactions hydrophobes HiTrap Phenyl. Les protéines sont éluées dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. L'absorbance à 280 nm reflétant la quantité de protéines est représenté par la courbe bleue et la salinité résultant du gradient décroissant de sulfate d'ammonium en rouge. **C.** Les différentes fractions ont été testées sur gel. La piste T correspond à l'extrait total après lyse des cellules et les fractions sont numérotées selon leur temps d'élué. La fraction 11 contenant RcnB (aire jaune sur la figure B.) est sélectionnée puis dialysée contre du tampon pour éliminer les sels. **D.** Elutogramme obtenu avec la deuxième colonne échangeuse d'anions Uno-Q1. Les protéines sont éluées dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. La salinité résulte ici du gradient croissant de chlorure de sodium. **E.** Le contrôle de la pureté de RcnB est réalisé en déposant un aliquot des premières fractions éluées à la sortie de la deuxième colonne correspondant à l'aire jaune de la figure D. Le 0 correspond au volume mort de la colonne et 1 et 2 sont les premières fractions éluées correspondant aux protéines non retenues. La seule protéine visible dans ces fractions a bien une taille de ≈ 10 kDa comme attendu pour la forme mûre de RcnB.

fraction de charge². D'autres colonnes ont alors été tentées, basées cette fois-ci sur les échanges d'ions dans différentes conditions. Les résultats étant là encore peu probants, une autre approche a été envisagée, basée cette fois-ci sur les interactions des protéines avec une matrice hydrophobe. La qualité de séparation fut bien meilleure dans ce cas et cette étape fut choisie comme première étape de purification car la protéine RcnB est assez fortement retenue ce qui permet une bonne séparation de l'extrait protéique [Figure 50 B. et C]. Cette technique de chromatographie nécessite toutefois l'ajout de fortes quantités de sels dans les échantillons. Une étape de dialyse est donc nécessaire ensuite pour éliminer toute contamination saline dans l'échantillon. La seconde étape de purification est une chromatographie échangeuse d'anions. Dans les conditions utilisées, RcnB est la seule protéine non retenue par la colonne alors que toutes les autres protéines co-purifiées à l'étape précédente le sont [Figure 50 D.]. La protéine finalement obtenue est donc complètement pure [Figure 50 E.]. Le rendement de la purification est relativement bon puisque 5 à 10 milligrammes de protéine RcnB peuvent être purifiés à partir de 500 ml de culture bactérienne.

8.4 Localisation de la protéine RcnB

La purification de la protéine RcnB a permis des avancées dans la compréhension de sa fonction biologique. Ainsi, sa localisation prédite comme étant périplasmique a pu être confirmée.

8.4.1 Séquençage de la partie N-terminale de RcnB

La séquence N-terminale de la protéine RcnB purifiée a été déterminée par la technique de la dégradation d'Edman à l'IBCP³ de Lyon. La séquence révélée pour les 6 premiers acides aminés fut AGSTNT. Cela correspond aux résidus 26 à 31 de la séquence primaire. Ainsi, le clivage *in vivo* du peptide signal a lieu après le résidu 25 (PAT₂₅/AGS). La protéine RcnB maturée correspond donc à un peptide de 87 acides aminés (26 à 112) et fait exactement 9898 Da. Il y a bien clivage d'un peptide signal, bien que la forme native diffère de 4 acides aminés par rapport à la prédiction bio-informatique. Cela indique que la protéine RcnB est exportée en dehors du cytoplasme.

8.4.2 Immunodétection périplasmique de la protéine RcnB

Pour préciser la localisation de la protéine, des anticorps polyclonaux anti-RcnB ont été développés par la plateforme Valbex de l'IUT Lyon 1. Pour cela, la protéine purifiée a été utilisée pour immuniser un lapin. Puis le sérum contenant les anticorps a été prélevé. Ceux-ci se sont révélés très peu efficaces pour la détection de la protéine dans des extraits cellulaires et une autre campagne de production utilisant la même approche a été relancée avec la société Covalab installée à Villeurbanne. Ces anticorps se sont révélés légèrement plus sensibles et ont pu être utilisés pour l'immunodétection de la protéine RcnB. Afin de vérifier la localisation prédite, des extraits périplasmiques ont été préparés et révélés par Western Blot avec les anti-RcnB [Figure 51]. Un dosage de l'activité β -galactosidase, enzyme cytoplasmique, a été effectué sur les mêmes extraits comme contrôle de l'absence de contamination cytoplasmique⁴. La protéine

2. données non présentées

3. Institut de Biologie et Chimie des Protéines

4. données non présentées

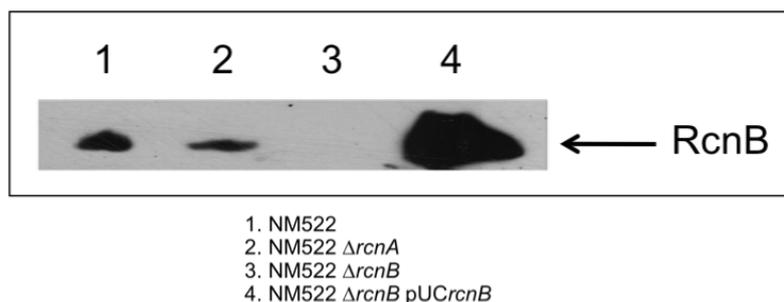


Figure 51 – Immunodétection de la protéine RcnB dans des extraits périplasmiques

Les cultures sont réalisées en milieu LB supplémenté par 500 μM de NiSO_4 pour induire l'expression du gène *rcnB*. Du lactose (0,1 % final) est également ajouté afin de pouvoir doser l'activité β -galactosidase. Les extraits périplasmiques de chaque souche sont préparés. Les valeurs d'activité β -galactosidase sont alors dosées pour les fractions totales et périplasmiques. Elles sont toutes nulles pour les extraits périplasmiques ce qui indique l'absence de contamination par des protéines cytoplasmiques. Une quantité égale de protéines totales est déposée sur le gel.

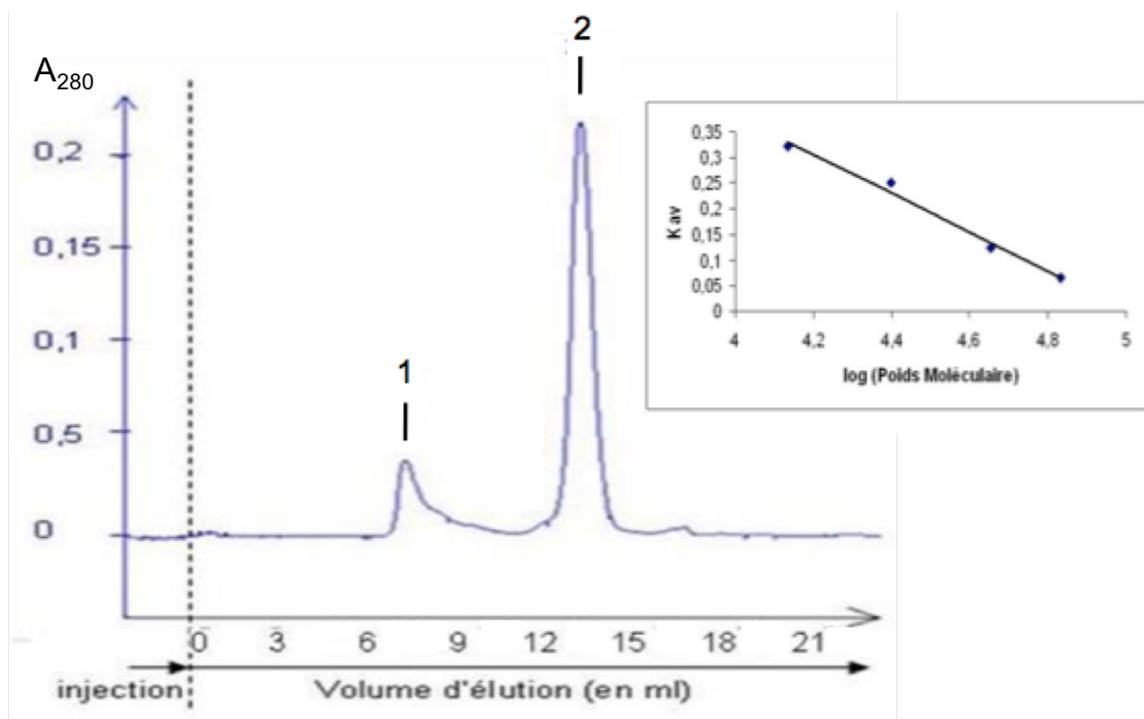


Figure 52 – Chromatographie par gel-filtration de la protéine RcnB

Les protéines sont éluées dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. La quantité de protéines au cours de l'élué est mesurée en continu grâce à l'absorbance à 280 nm exprimée ici en unités arbitraires. Le pic noté 1 correspond au volume mort de la colonne et le pic noté 2 correspond à la protéine RcnB. Dans l'encadré est présentée la calibration de la colonne exprimée en coefficient de rétention K_{av} $[(V_{elution}-V_{mort})/(V_{colonne}-V_{mort})]$ en fonction du \log_{10} du poids moléculaire). Les marqueurs utilisés sont la sérum albumine (68 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), la chymotrypsine (25 kDa) et la RNaseA (13,6 kDa) élués respectivement à 8,3 ; 9,3 ; 11,4 et 12,6 ml. Bien que le volume d'élué de RcnB soit en dehors de la gamme, l'équation de la droite de régression permet d'extrapoler sa masse moléculaire.

RcnB est bien visible dans l'extrait périplasmique de la souche sauvage et du simple mutant $\Delta rcnA$ [pistes 1 et 2]. En revanche, rien n'est visible pour le mutant $\Delta rcnB$ [piste 3]. Pour le mutant complétement par le plasmide portant le gène *rcnB*, la surproduction de la protéine est nettement visible même si cette méthode n'est que semi-quantitative [piste 4].

Ces deux manipulations confirment les prédictions bioinformatiques. La protéine RcnB native subit bien une maturation par clivage d'un peptide signal et est localisée dans le périplasme des bactéries.

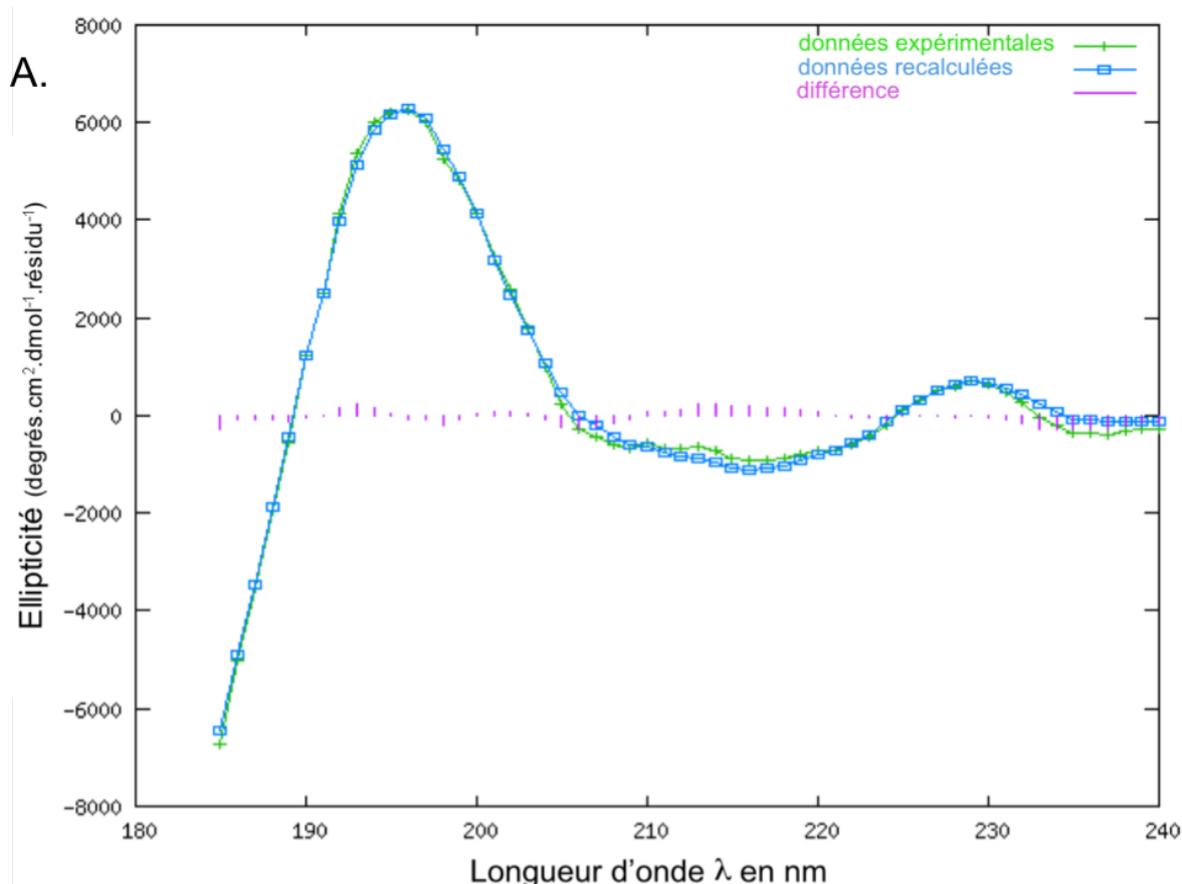
8.5 Caractéristiques structurales de la protéine RcnB

8.5.1 Etat d'oligomérisation de la protéine RcnB

Pour déterminer la structure quaternaire de la protéine RcnB, une expérience de chromatographie par gel-filtration a été réalisée. Celle-ci permet de séparer les protéines en fonction de leur encombrement stérique qui par approximation est proportionnelle à leur taille, les protéines étant supposées globulaires. Les protéines les plus grosses sont éluées le plus rapidement. La colonne utilisée pour cette chromatographie ayant été calibrée avec des marqueurs protéiques de poids moléculaire connu, il est possible de corréler le volume d'éluion d'une protéine donnée à sa masse moléculaire. Les résultats de cette manipulation sont présentés [Figure 52]. La protéine RcnB est éluee à un volume d'éluion de 13,5 ml. D'après la calibration de la colonne, cela correspond à une protéine d'une masse de 10,5 kDa. Cette valeur indique un probable état monomérique de la protéine RcnB puisqu'un monomère de protéine native équivaut à 9,9 kDa. Il est à noter que le pic est parfaitement symétrique et qu'aucune trace de forme oligomérique n'est détectée. Il semble donc que la protéine RcnB existe sous une seule forme *in vitro* ce qui autorise à penser que cela correspond à son état *in vivo*.

8.5.2 Détermination de la structure secondaire de la protéine RcnB

Pour appréhender la structure secondaire de la protéine RcnB, un spectre de dichroïsme circulaire a été enregistré avec la protéine native. Cette manipulation a été effectuée en collaboration avec Roland Montserret de l'IBCP de Lyon. Le spectre présenté ici [Figure 53 A.] a été obtenu en conditions non dénaturantes. Ce spectre présente un maximum autour de 195 nm et un minimum localisé vers 215 nm. Ces données sont caractéristiques des brins β ce qui traduit la présence de telles structures dans la protéine. En revanche, aucun signal ne montre la présence d'hélices α dans la protéine RcnB. Le spectre a pu être déconvolué [Figure 53 B.]. Ceci a permis de déterminer le pourcentage des structures secondaires dans la protéine. Quelle que soit la méthode de calcul utilisée, les brins β sont très présents puisque presque la moitié de la protéine est ainsi structurée. L'autre moitié de la protéine ne présente pas de structures particulières et les hélices α sont quasi-absentes. Ce spectre laisse également penser que la protéine RcnB purifiée est correctement repliée suite au processus de purification et a donc de bonnes probabilités d'avoir conservé sa fonction biologique.



B.

Méthode \ Structure II	% hélices α	% brins β	% autres
SELCON3	0	51	49
CONTIN	4	39 (+/- 1)	57 (+/- 1)
CDSSTR	5 (+/- 3)	40 (+/- 2)	55 (+/- 6)
K2D	4	48	48

Figure 53 – Dichroïsme circulaire de la protéine RcnB

A. Spectre de dichroïsme circulaire de la protéine RcnB. Le spectre est enregistré à température constante de 25°C dans une cuve droite de 1 mm. Le tampon utilisé est du tampon phosphate 10 mM pH 7 et la concentration de la protéine est de 15 μ M. Le spectre obtenu (vert) est lissé et la valeur du tampon est retranché. Le spectre recalculé par la méthode CDSSTR est figuré bleu pour l'exemple et la différence entre les deux est symbolisée en violet. **B.** La déconvolution des spectres est réalisée avec les quatre méthodes disponibles sur le serveur dichroweb et permet d'obtenir les pourcentages des structures secondaires. La moyenne ainsi que l'écart-type (quand celui-ci n'est pas nul) de deux échantillons de protéine de concentration 15 et 20 μ M sont présentés.

8.5.3 Stabilité de la protéine RcnB

Une autre caractéristique biochimique de la protéine RcnB est sa grande stabilité en solution. Afin de le montrer, des échantillons de protéines ont été concentrés jusqu'à des valeurs de 30 mg.ml⁻¹. Dans ces conditions, la protéine RcnB reste parfaitement soluble sans précipitation observée. De plus, la protéine purifiée peut être stockée pendant de longues périodes sans que celle-ci ne s'agrège. Ainsi, des échantillons de différentes concentrations ont été placés à 4°C puis centrifugés à intervalles réguliers et l'absorbance à 280 nm a été enregistrée. Sur un intervalle de temps de quelques mois, aucune diminution significative de l'A₂₈₀ n'a été observée. Cela montre que la protéine ne s'agrège pas et reste soluble.

8.6 Interactions de la protéine RcnB avec les ions métalliques

8.6.1 Mise en évidence des interactions par spectroscopie

L'hypothèse d'une interaction entre la protéine RcnB et les ions métalliques Ni²⁺ et Co²⁺ du périplasma permettrait de mieux appréhender la fonction de cette protéine. L'émission de fluorescence de la protéine RcnB en présence de ces ions a été étudiée. Cette manipulation a été effectuée en collaboration avec Pascal Arnoux et David Pignol du laboratoire de bioénergétique cellulaire du centre CEA⁵ de Cadarache. La séquence primaire de la forme mature de RcnB contient deux résidus tryptophanes et ces résidus sont bien connus pour leur forte émission de fluorescence à $\lambda \approx 320$ nm lorsqu'ils sont excités par un faisceau lumineux de $\lambda = 280$ nm. En effet, les spectres d'émission enregistrés sur la protéine RcnB purifiée montrent une forte émission à 319 nm en réponse à l'excitation [Figure 54]. L'émission de fluorescence est fortement influencée par l'environnement direct des résidus tryptophanes qui dépend du repliement de la protéine. Le but de cette manipulation est de suivre les éventuels changements de conformation de la protéine provoqués par la fixation des métaux en se basant sur la fluorescence des tryptophanes. Des spectres ont été enregistrés pour la protéine RcnB en présence d'excès d'ions Zn²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ et Cd²⁺ [Figure 54 A.]. Le spectre présenté dans cette figure illustre le cas de l'ajout de nickel. Mais pour tous les cations divalents cités, les spectres obtenus sont comparables. Aucun changement dans les spectres d'émission de fluorescence n'a été mis en évidence par rapport à la condition sans métal. Cela indique que ceux-ci ne modifient pas significativement l'environnement des résidus tryptophanes. En revanche, les résultats obtenus avec les ions Cu²⁺ ont montré une extinction partielle de la fluorescence [Figure 54 B.]. Dans les conditions utilisées, les ions Cu²⁺ modifient donc l'environnement d'au moins un résidu tryptophane ce qui montre une interaction entre la protéine RcnB et les ions Cu²⁺.

La spectroscopie UV-visible a été employée en complément de la précédente. En effet, dans le cas d'une fixation de métal ne modifiant pas l'environnement direct d'au moins un résidu tryptophane, aucun signal ne serait visible en spectrofluorescence. La protéine RcnB est incubée en présence ou en absence d'ions métalliques et un spectre UV-visible est enregistré afin de mettre en évidence de potentielles bandes d'absorption résultant d'interactions entre la protéine et le métal. La protéine seule présente un pic d'absorption caractéristique à 280 nm. L'ajout de quantités croissantes d'ions Ni²⁺ ou Co²⁺ n'a strictement aucun effet sur le spectre obtenu et

5. Commissariat à l'Energie Atomique

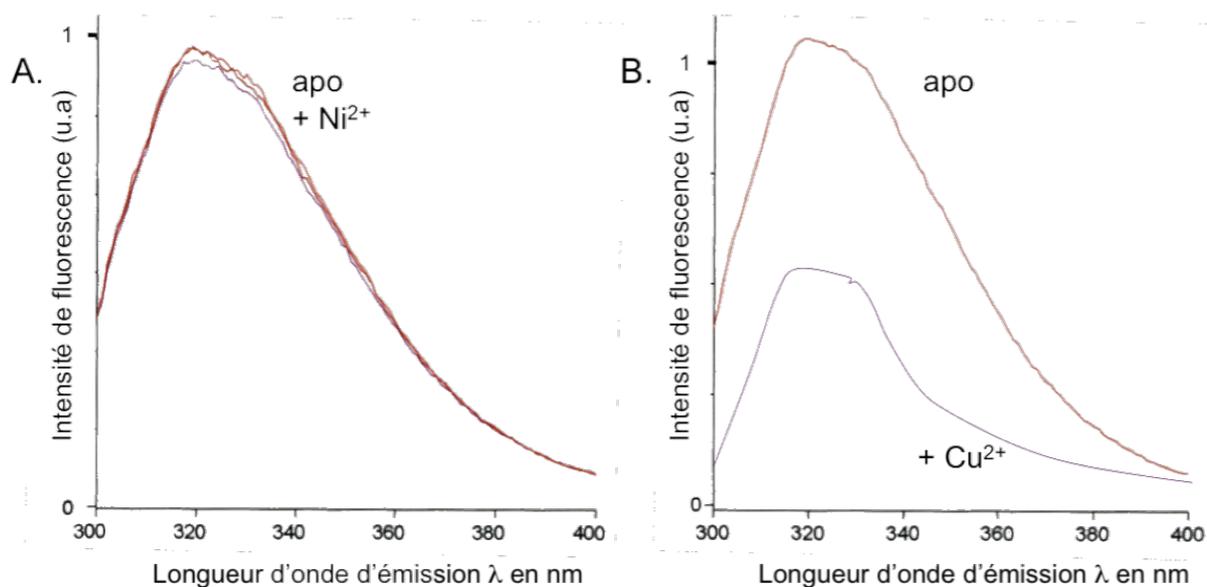


Figure 54 – Spectres d'émission de fluorescence de la protéine RcnB

Le spectre est enregistré à température ambiante dans une cuve droite de 10 mm. Le tampon utilisé est du tampon Bis Tris propane 100 mM pH 6 et la concentration de la protéine est de $5 \mu\text{M}$. Les métaux Ni^{2+} (A.) et Cu^{2+} (B.) sont ajoutés à raison de 20 équivalents puis, après un temps d'équilibration de 5 minutes, le spectre est réenregistré. L'intensité de fluorescence est donnée en unités arbitraires.

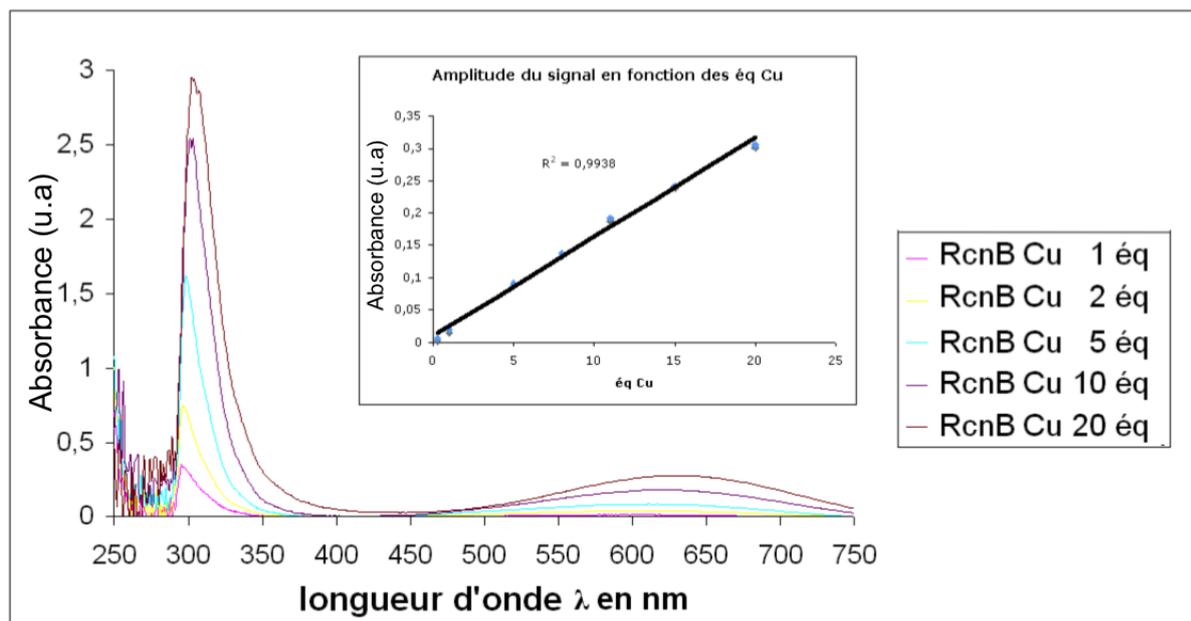


Figure 55 – Spectres d'absorption de la lumière UV-visible de la protéine RcnB

Le spectre est enregistré à température ambiante dans une cuve droite de 10 mm. Le tampon utilisé est du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7 et la concentration de la protéine est de $300 \mu\text{M}$. Les ions Cu^{2+} sont ajoutés en concentration croissante jusqu'à 20 équivalents. Après chaque ajout, un temps d'équilibration de cinq minutes est compté et le spectre est réenregistré. Les résultats sont présentés sous forme de spectres de différence, le spectre correspondant à la condition sans métal étant retranché systématiquement de celui enregistré en présence de métal.

ce jusqu'à des quantités de 20 équivalents⁶. En revanche, l'ajout de concentrations croissantes d'ions Cu^{2+} produit un signal [Figure 55]. Ainsi, deux bandes d'absorption sont visibles, une relativement intense autour de 300 nm ($\epsilon \approx 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et une moins intense entre 550 et 700 nm ($\epsilon \approx 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ces bandes sont caractéristiques des liaisons Cu-S et, en absence de cystéines, indiquent qu'au moins un résidu méthionine est impliqué dans la liaison au cuivre.

De manière contre-intuitive, la protéine RcnB semble donc fixer le cuivre mais pas le nickel ou le cobalt. Pourtant, cette protéine est impliquée dans l'homéostasie des ions Ni^{2+} et Co^{2+} chez *E. coli*. Les interactions de RcnB avec ces ions métalliques ont donc été recherchées à l'aide d'autres méthodes.

8.6.2 Interactions avec les ions Ni^{2+}

La méthode de spectroscopie UV-visible peut rester silencieuse alors même qu'une interaction se produit entre les ions métalliques et la protéine notamment dans le cas où une cystéine n'est pas impliquée dans la fixation du métal. Etant donné que RcnB ne possède pas de tels résidus, des méthodes plus directes ont été employées en utilisant des ions $^{63}\text{Ni}^{2+}$ radioactifs. Des ions $^{60}\text{Co}^{2+}$ radioactifs sont également disponibles sur le marché mais sont dangereux à manipuler du fait de leur rayonnement γ . Pour des raisons de sécurité, le personnel du laboratoire n'est pas autorisé à en manipuler et aucune expérience n'a donc été réalisée avec ces ions.

Dialyse à l'équilibre

Des expériences de dialyse à l'équilibre sur la protéine RcnB pure ont été effectuées. Le principe de cette manipulation est de placer la protéine dans un compartiment et du nickel radioactif dans un autre, les deux étant séparés par une membrane de dialyse permettant uniquement le passage des ions ^{63}Ni . De cette manière, si les ions ^{63}Ni possèdent de l'affinité pour la protéine, ils vont rester liés à celle-ci. A l'état d'équilibre, la concentration en ions Ni^{2+} libres sera égale des deux côtés de la membrane. Mais il y aura un déséquilibre de nickel total à cause du nickel lié à la protéine. Ceci entraînera donc un déséquilibre de radioactivité plus ou moins important en fonction de l'affinité de la protéine pour ces ions. Or, les résultats obtenus ici [Figure 56 A.] ne montrent aucune différence significative entre les deux compartiments et la quantité de nickel liée à la protéine est donc négligeable quelle que soit la quantité de départ.

Dot Blot

Pour consolider ce résultat, une expérience de Dot Blot a été réalisée. Dans ce cas, la protéine RcnB pure est incubée avec des quantités croissantes de ^{63}Ni puis filtrée sur membrane. En cas d'interaction, les ions ^{63}Ni liés à la protéine RcnB seront retenus sur la membrane. La quantification de la radioactivité présente sur celle-ci permet alors d'estimer l'affinité du complexe. Les résultats présentés ici [Figure 56 B.] montrent que la quantité de ^{63}Ni retenue par la protéine RcnB est nulle. Pourtant, la protéine RcnB est bien présente sur la membrane [Figure 56 C.]. Cela traduit le fait que le K_d de l'interaction est très largement supérieur à la plus forte concentration d'ions Ni^{2+} testés ici (ici 100 μM) et n'a donc aucune signification biologique. La protéine NikR, déjà décrite comme liant les ions Ni^{2+} avec un K_d de l'ordre de 10^{-7} M [290] est utilisée ici comme témoin positif.

6. données non présentées

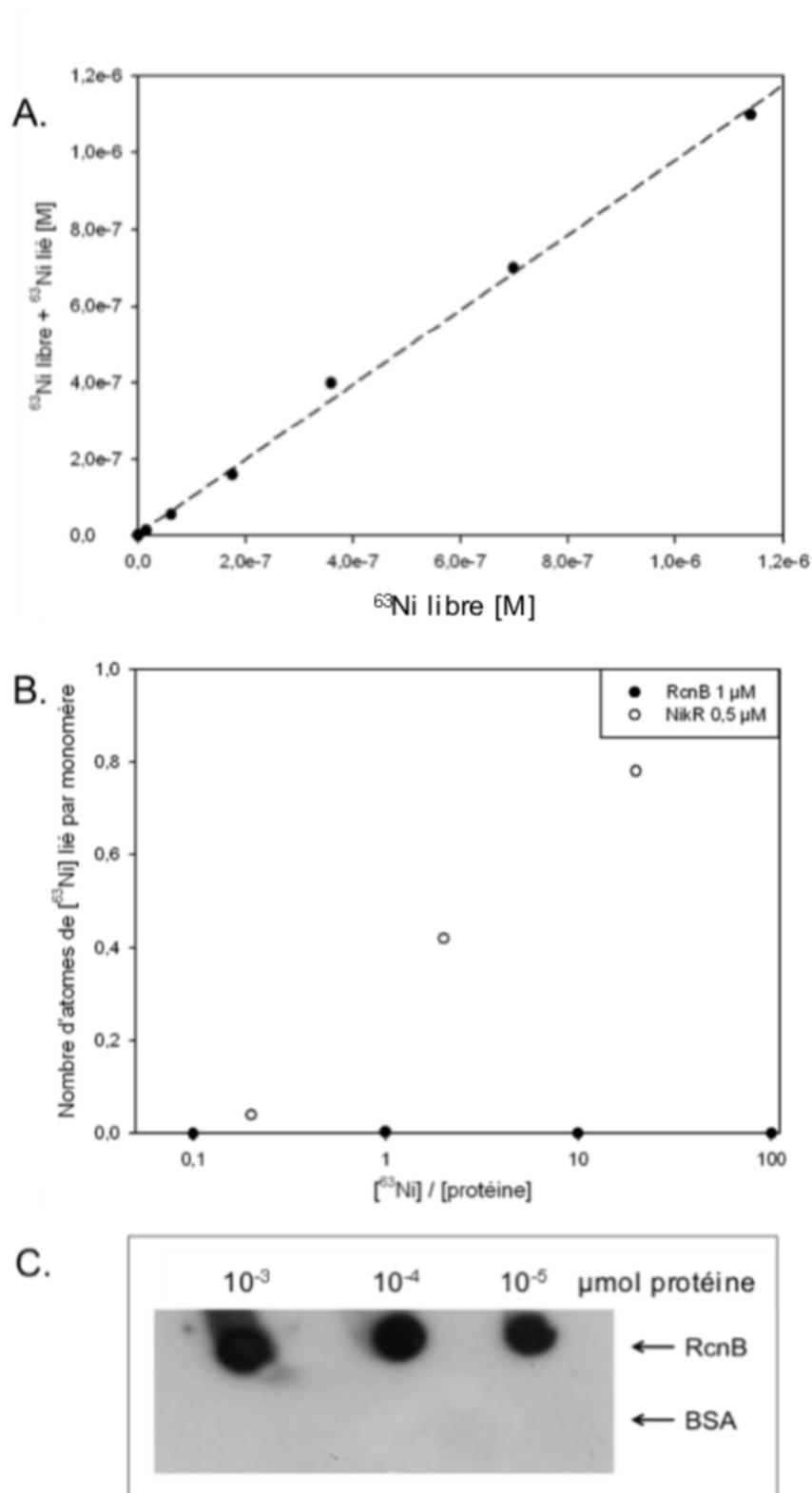


Figure 56 – Test d'interaction entre la protéine RcnB et les ions ^{63}Ni

A. Dialyse à l'équilibre. La protéine RcnB pure est diluée à une concentration de $12 \mu\text{M}$ dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7 dans une cellule. Puis des concentrations croissantes de ^{63}Ni sont ajoutées dans un autre compartiment et la radioactivité est mesurée dans chacune des deux cellules après 48 h d'échange. Les résultats sont donnés en quantité totale de ^{63}Ni en fonction de la quantité de ^{63}Ni libre. **B.** Dot Blot. Les protéines RcnB et NikR pures sont diluées respectivement à une concentration de $1 \mu\text{M}$ et $0,5 \mu\text{M}$ dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7. Puis des concentrations croissantes de ^{63}Ni sont ajoutées et après équilibration, la protéine est filtrée sur membrane PVDF. Celle-ci est ensuite séchée puis la radioactivité retenue est quantifiée. Les résultats sont exprimés en quantité de ^{63}Ni liée en fonction de la quantité totale de ^{63}Ni (exprimée par rapport à celle des protéines). **C.** Contrôle du dot blot. Des quantités croissantes de protéine RcnB pure sont déposées sur membrane PVDF puis révélées par les anticorps anti-RcnB. La protéine BSA est utilisée comme témoin négatif.

Dans les conditions utilisées, la protéine RcnB ne semble donc posséder aucune affinité significative pour les ions ^{63}Ni . Ces données sont en accord avec les données spectroscopiques.

8.6.3 Interactions avec le cuivre

Spectrométrie de masse

Pour caractériser l'interaction RcnB-Cu révélée par la spectroscopie, une expérience de spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec David Lemaire du laboratoire des interactions protéine-métal du centre CEA de Cadarache. Un spectre a été enregistré sur la protéine purifiée en absence [Figure 57 A.] ou en présence d'ions Cu^{2+} [Figure 57 B.]. Dans les deux cas, un pic majoritaire se distingue très nettement. La masse associée à ce pic est de 9826 Da en absence de cuivre alors qu'il est de 9889 Da en présence de métal [Figure 57 C.]. Il y a donc une différence de 63 Da entre les deux pics ce qui correspond exactement à la masse d'un atome de cuivre. Cette expérience permet donc d'affirmer que la protéine RcnB fixe le cuivre à raison d'un atome par monomère. Les résultats présentés ici ont été obtenus en conditions natives pour ne pas provoquer la dissociation du complexe RcnB-Cu. En conditions dénaturantes⁷, aucun complexe n'est visible⁸.

Une autre information importante de cette expérience est la masse exacte associée au pic en absence de métal. Celle-ci est en effet de 9826 Da et diffère donc de 72 Da par rapport à celle de 9898 Da déterminée grâce au séquençage d'Edman [voir 8.4.1]. Or cette masse de 9826 Da pourrait correspondre exactement à la protéine RcnB mature déletée du résidu alanine en position N-terminale. Mais il est également possible qu'il s'agisse d'une autre modification. Sur le spectre de masse, la forme à 9898 Da est totalement absente. Ces observations ne remettent toutefois pas en cause la fixation du cuivre par la protéine RcnB mais indiquent que celle-ci aurait subi une modification qui pourrait correspondre à une légère dégradation au cours du temps. Il est également possible que cette modification ait un réel sens biologique. Pour répondre à cette question, cette manipulation devra être refaite.

Chromatographie par gel-filtration

Afin de savoir si la fixation du cuivre modifie l'état d'oligomérisation de la protéine RcnB, une chromatographie par gel-filtration a été réalisée. La protéine pure est incubée en absence ou en présence d'ions Cu^{2+} puis le dépôt sur la colonne et l'élution sont effectués. Dans les deux cas, le volume d'élution est strictement identique et le pic d'élution est parfaitement Gaussien⁹. Le cuivre ne provoque donc aucun changement de la structure quaternaire de la protéine RcnB.

Spectrofluorescence

Les propriétés de métallation de RcnB par le cuivre ont été précisées par spectrofluorescence. Ainsi, des quantités croissantes d'ions Cu^{2+} ont été ajoutées à la protéine RcnB. Les résultats sont présentés dans la Figure 58 A. La quantité croissante d'ions Cu^{2+} provoque une extinction progressive de la fluorescence jusqu'à saturation du signal. La même expérience a été réalisée avec cette fois-ci les ions Cu^+ car il est admis que, chez *E. coli*, le cuivre existe en équilibre entre ces deux formes ioniques. Les ions Cu^+ sont extrêmement sensibles à l'oxydation et requièrent

7. en présence d'acide formique

8. données non présentées

9. données non présentées

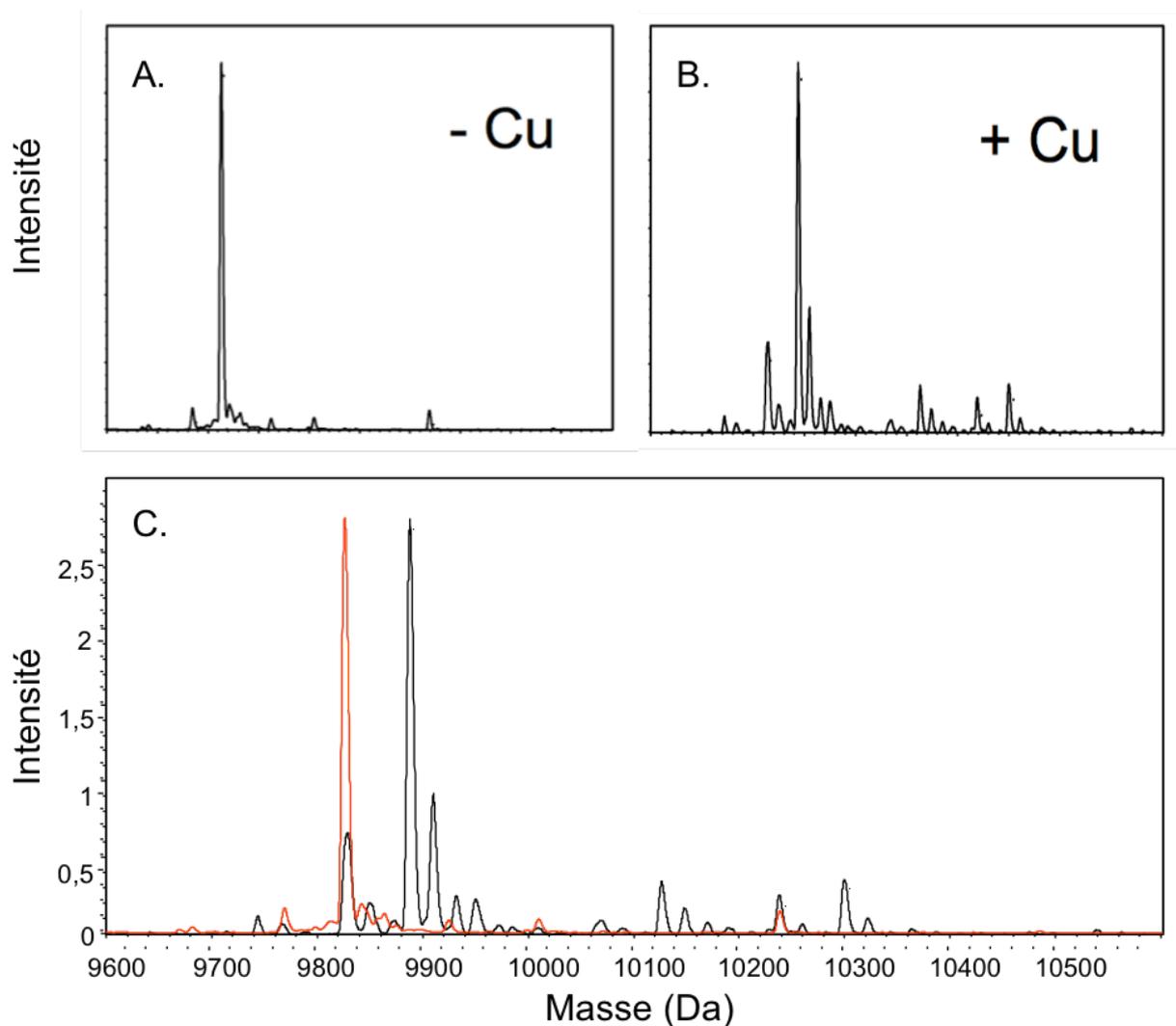


Figure 57 – Spectres de masse de la protéine RcnB

Les spectres de la protéine RcnB pure sans (A.) ou avec 10 équivalent d'ions CuSO_4 (B.) ont été réalisés en conditions natives pour une protéine diluée à une concentration finale de $5 \mu\text{M}$ dans une solution d'ions NH_4^+ 20 mM. (C.) Les spectres obtenus sont superposés pour comparer les tailles des espèces. Le spectre sans cuivre est en rouge tandis que le spectre avec cuivre est en noir.

des conditions anaérobies strictes pour être utilisés. Ils sont générés en solution par une espèce donneuse, $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$. La même manipulation de titration que pour les ions Cu^{2+} a été effectuée avec ces ions Cu^+ [Figure 58 B.]. Les résultats obtenus sont comparables. Il y a bien une extinction progressive de la fluorescence lors de l'ajout de quantités croissantes d'ions Cu^+ . Toutefois, une différence est observée au niveau de l'intensité du signal. En effet, l'extinction de fluorescence est beaucoup plus prononcée pour les ions Cu^+ que pour les ions Cu^{2+} indiquant que les premiers modifient l'environnement du ou des résidus tryptophanes de manière plus importante que les seconds. Les deux types d'ions Cu^+ et Cu^{2+} peuvent donc se lier à la protéine RcnB mais leur géométrie de coordination est probablement différente. En ce qui concerne la saturation du signal, la figure 58 C. montre les données obtenues pour les ions Cu^+ et Cu^{2+} . Mise à part la différence d'intensité, les deux profils de saturation sont tout à fait comparables avec des valeurs de demi-saturation¹⁰ identiques. Ces valeurs permettent d'estimer le K_d du complexe autour de $5 \cdot 10^{-5}$ M. La représentation de Scatchard des données obtenues pour les ions Cu^{2+} présentée sur la figure 58 D. permet d'avoir une meilleure idée du K_d . La courbe obtenue est curvilinéaire et constituée de deux composantes correspondant à deux sites de haute et faible affinité. Les K_d respectifs sont de $\approx 10^{-5}$ et 10^{-4} M. En considérant que le site de faible affinité correspond à de la fixation aspécifique, cette manipulation permet donc d'estimer le K_d du complexe RcnB- Cu^{2+} à 10^{-5} M. Pour les ions Cu^+ , la représentation de Scatchard livre des résultats strictement identiques. Cela reflète une affinité relativement faible, d'un ordre de grandeur comparable à celle de CusF, autre protéine périplasmique d'*E. coli* fixant les ions cuivreux [225].

8.7 Essais de cristallisation

La production en grande quantité ainsi que la purification de RcnB ont permis d'initier la cristallisation de cette protéine dans le but d'obtenir des données structurales. Cette manipulation a été effectuée en collaboration avec Pascal Arnoux et David Pignol du laboratoire de bioénergétique cellulaire du centre CEA¹¹ de Cadarache. Les premiers cribles ont été effectués grâce à des kits commerciaux très généralistes pour permettre un balayage du plus grand nombre de conditions possibles. Dans la grande majorité des cas, la protéine reste bien soluble [Figure 59 A.] dans le tampon confirmant ainsi les observations concernant sa grande stabilité. De façon intéressante, les quelques conditions dans lesquelles la protéine précipite [Figure 59 B.] ont la particularité de contenir assez fréquemment des cations métalliques. Suite à la mise en évidence de l'interaction RcnB-Cu postérieure à ce premier crible, une autre série a été effectuée avec la protéine purifiée en présence de cuivre. Dans ces conditions, la protéine est moins soluble et des précipités sont observés dans presque la moitié des cas. Toutefois, aucune perspective intéressante ne se dégage de ce second crible puisqu'aucune forme de cristaux n'a pu être obtenue. Un autre crible a alors été effectué et, pour une condition particulière¹², des microaiguilles ont été observées [Figure 59 C.]. Bien que ne constituant pas des cristaux exploitables pour la diffraction des rayons X, ces aiguilles apportent une piste sérieuse pour poursuivre la détermination des conditions de cristallisation de la protéine RcnB. Cependant, des cribles supplémentaires dans des conditions très proches de celles des microaiguilles se sont, pour l'heure, malheureusement

10. approximation du K_d

11. Commissariat à l'Energie Atomique

12. 2-méthyl-1,3-pentanediol 40 %

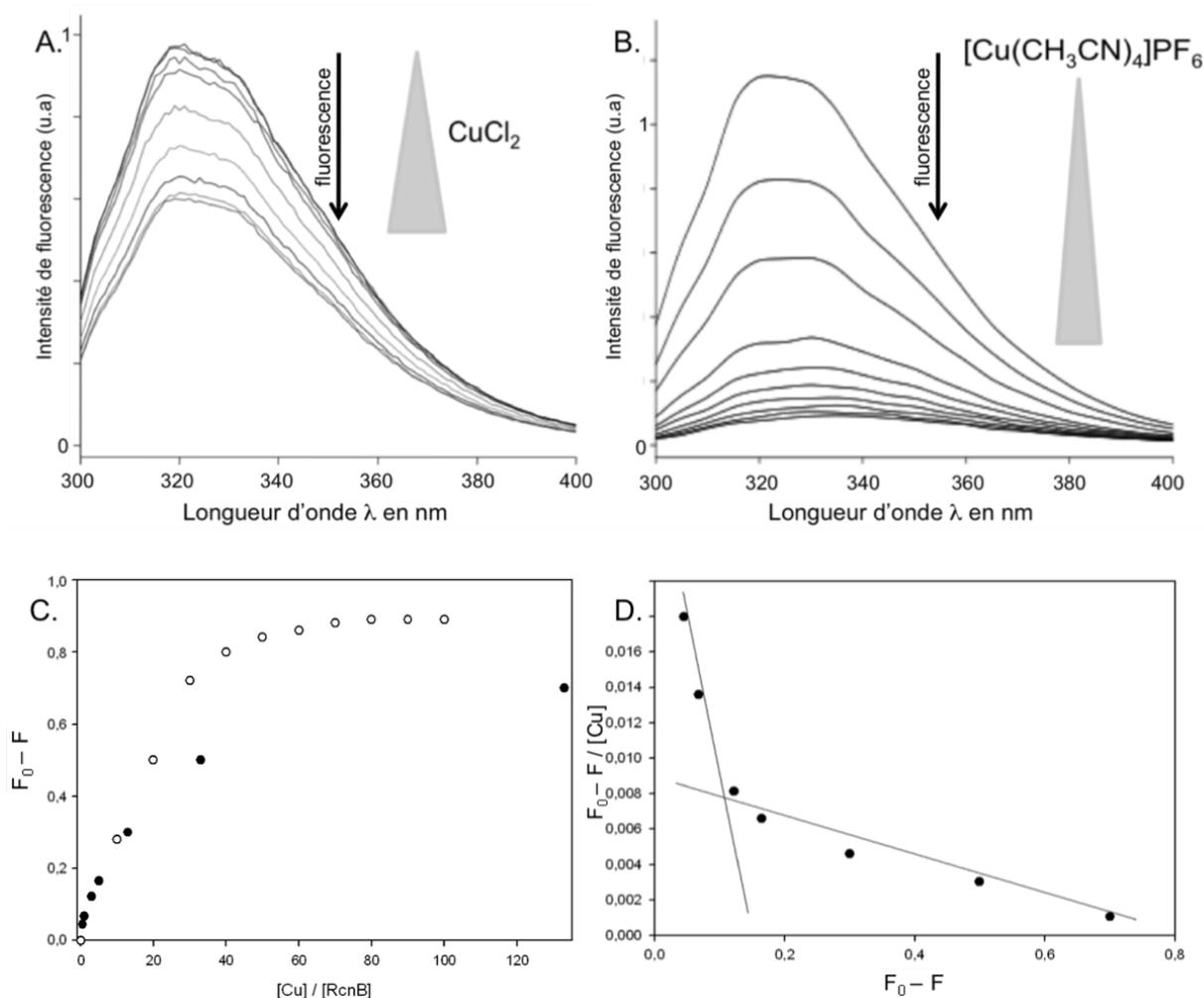


Figure 58 – Spectres d'émission de fluorescence de la protéine RcnB en présence de cuivre

Le spectre est enregistré à température ambiante dans une cuve droite de 10 mm. Le tampon utilisé est du tampon Bis Tris propane 100 mM pH 6 et la concentration de la protéine est de $5 \mu\text{M}$. Les ions Cu^{2+} (A.) ou Cu^+ (B.) sont ajoutés en concentration croissante de 1 à 130 équivalents de la concentration de la protéine puis, après un temps d'équilibration de 5 minutes, un spectre est réenregistré. Pour les ions Cu^+ , la manipulation est effectuée en conditions anaérobies grâce au donneur d'ions Cu^+ $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$. C. Les variations de la fluorescence à $\lambda = 319 \text{ nm}$ sont représentées en fonction de la quantité de cuivre ajoutée donnée en rapport de concentration avec la protéine RcnB (symboles pleins = Cu^{2+} et symboles vides = Cu^+). D. Représentation de Scatchard des données obtenues pour les ions Cu^{2+} .

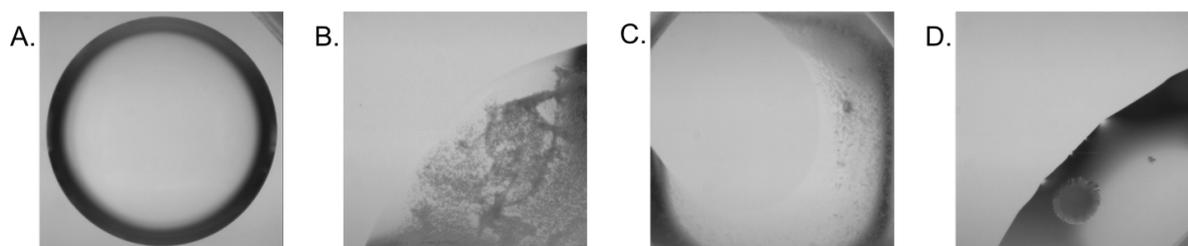


Figure 59 – Crible des conditions de cristallisation de la protéine RcnB

A. Goutte claire qui traduit une condition où la protéine reste soluble. B. Précipitation de la protéine. C. Microaiguilles cristallines. D. Structures cristallines salines.

révélés infructueux. D'autres structures cristallines ont été obtenues dans d'autres conditions [Figure 59 D.] mais sont imputables aux sels présents dans les tampons et non pas à la protéine RcnB.

8.8 Conclusion

Le gène *rcnB* est présent dans de nombreuses bactéries mais le plus fréquemment isolé du gène *rcnA*. La protéine RcnB est localisée dans le périplasme et existe vraisemblablement sous forme de monomère. Bien que le gène *rcnB* soit impliqué dans l'homéostasie du nickel et du cobalt, la protéine ne présente pas d'affinité pour ces ions *in vitro*. En revanche, elle est capable de fixer le cuivre, aussi bien sous forme Cu^+ que Cu^{2+} avec une affinité comparable. Ce résultat est aussi inattendu qu'intéressant. Pour l'expliquer, l'étude de l'implication de RcnB dans l'homéostasie du cuivre a été entreprise.

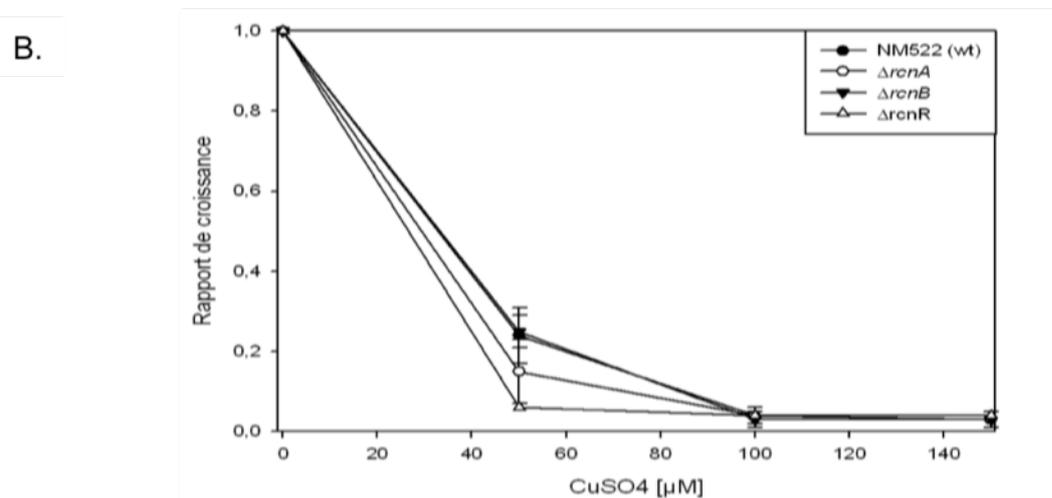
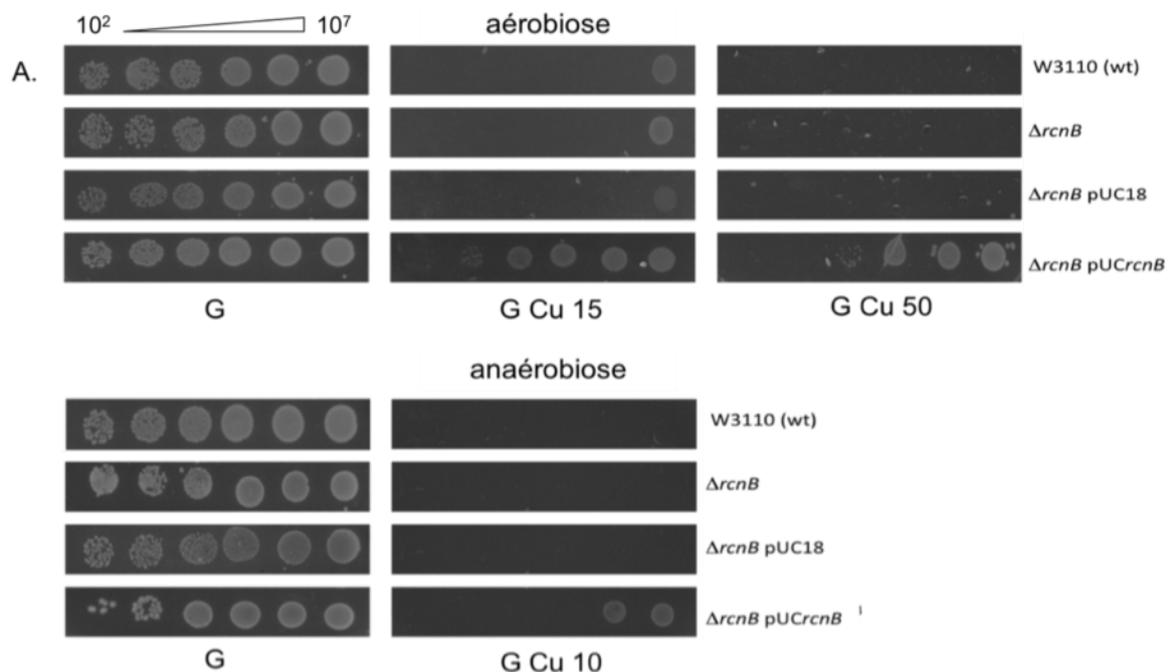


Figure 60 – Influence de la mutation de *rcnB* sur la résistance des bactéries aux ions cuivre

A. Méthode des gouttes. Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C jusqu'en phase stationnaire de croissance. Puis un aliquot de culture est dilué en cascades de 10^{-1} en 10^{-7} . 5 μ l des dilutions contenant de 10^2 (gauche) à 10^7 (droite) bactéries sont déposés sur milieu minimum M63 + 0,4 % glucose (G) supplémenté ou non par des ions Cu^{2+} . Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C en conditions aérobies (haut) ou anaérobies (bas) pendant 24 à 48 h. Une expérience significative est présentée.

B. Résistance en milieu liquide. Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu M63 + 0.4 % glucose avec des concentrations croissantes en cuivre en conditions aérobies à 37°C pendant 16 h. La D_{600nm} est ensuite mesurée sur un aliquot. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métal. La moyenne ainsi que l'écart-type de 2 manipulations distinctes sont représentées.

Chapitre 9

Implication de RcnB dans l'homéostasie du cuivre

9.1 Le gène *rcnB* est indirectement impliqué dans le phénomène de résistance aux ions cuivre

La protéine RcnB fixe le cuivre ce qui suggère que le gène correspondant puisse être impliqué dans le métabolisme de ce métal. Pour vérifier cette hypothèse, le mutant ayant subi l'échange d'une cassette de résistance au chloramphénicol avec le gène *rcnB* a été utilisé. Le profil de résistance aux ions Cu^{2+} de ce mutant par rapport à une souche sauvage a été déterminé ainsi que l'effet de la complémentation de ce mutant par un plasmide multi-copies portant le gène *rcnB*. Sur milieu minimum gélosé, la souche sauvage est sensible aux ions Cu^{2+} ($15 \mu\text{M}$) puisque des colonies sont observées seulement pour la plus faible dilution (10^7 bactéries déposées) [Figure 60 A.]. Le profil de résistance observé pour le mutant *rcnB* est strictement comparable à cette souche sauvage. En revanche, l'apport du gène *rcnB* porté sur le plasmide à ce mutant permet d'augmenter sensiblement la résistance au cuivre puisque des colonies sont également observées à des niveaux élevés de cuivre ($50 \mu\text{M}$) pour les faibles dilutions (10^5 à 10^7 bactéries déposées). Cet effet est bien spécifique du gène *rcnB* puisque l'apport du plasmide vide n'a pas d'effet. En conditions anaérobies, les profils sont comparables même si les niveaux de résistance au cuivre de toutes les souches sont diminués. Ainsi, seule la souche complémentée par *rcnB* peut se développer en présence de $10 \mu\text{M}$ de métal. Cette toxicité du cuivre accrue en anaérobiose a déjà été rapportée et s'explique par l'état d'oxydation du métal, les ions cuivreux Cu^+ plus toxiques étant prépondérants dans ces conditions.

Des résultats en tous points semblables sont obtenus en modifiant légèrement les conditions expérimentales en utilisant la technique des halos d'inhibition¹. Le diamètre du halo est plus faible pour la souche surexprimant la protéine RcnB ce qui traduit une meilleure résistance au cuivre de cette souche par rapport aux autres testées. Bien qu'étant moins discriminante, cette technique permet de valider les observations précédentes.

Enfin, des cultures en milieu liquide avec des concentrations croissantes de cuivre des souches mutées sur les gènes *rcnR*, *rcnA* ou *rcnB* n'ont pas montré de différence significative de résistance au cuivre entre ces souches [Figure 60 B.].

1. données non présentées

Tableau 10 – Détermination par ICP-OES de l'accumulation du cuivre par les bactéries

souches	W3110 (wt)	$\Delta rcnB$	$\Delta rcnB$ pUCrcnB
Cu (ppm)	75,2 (+/-3)	67,3 (+/-0,2)	144 (+/-2,5)

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB supplémenté par 500 μM d'ions Cu^{2+} en conditions aérobies à 37°C et les bactéries sont récoltées à $D.O_{600nm} \approx 0,6$. Les résultats sont exprimés en ppm ($\mu\text{g métal.g}^{-1}$ PSB). La moyenne ainsi que l'écart-type de 2 cultures indépendantes sont présentés.

Tableau 11 – Effet de la complémentation par *rcnB* sur les différents mutants des systèmes de résistance au cuivre

souches	$\Delta copA$		$\Delta cusCFBA$		$\Delta cueO$	
	-	/ pUCrcnB	-	/ pUCrcnB	-	/ pUCrcnB
Ø halo (mm)	14,5 (+/-1,5)	13 (+/-2)	8 (+/-1)	9 (+/-1)	19 (+/-2,5)	10 (+/-1)

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C et les bactéries sont récoltées à $D.O_{600nm} \approx 0,6$. Les cellules sont étalées sur boîte de milieu gélosé. Des disques imprégnés d'une solution d'ions Cu^{2+} (10 μl à 5 μM) sont déposés sur la boîte et le diamètre du halo d'inhibition est mesuré après 24 h en conditions aérobies à 37°C. La moyenne ainsi que l'écart-type de 2 cultures indépendantes sont présentés.

9.2 Effet de *rcnB* sur la quantité totale de cuivre dans les cellules

Un dosage de la quantité totale de cuivre a été réalisé dans les cellules bactériennes par une analyse ICP-OES. La détermination du contenu en cuivre des souches sauvage, $\Delta rcnB$ et $\Delta rcnB$ complémentée par *rcnB* a été effectuée [Tableau 10]. Comme dans les cas du nickel et du cobalt, les cellules ont été cultivées dans du milieu supplémenté en cuivre car les niveaux de métaux dans le milieu de base sont trop faibles. Dans ces conditions, le mutant *rcnB* accumule une quantité de cuivre légèrement inférieure mais comparable à la souche sauvage. En revanche, la complémentation par le plasmide portant *rcnB*, et donc la surproduction de la protéine RcnB, double la quantité de cuivre accumulée par les cellules. La résistance au cuivre accrue dans cette souche ne peut donc pas s'expliquer par un mécanisme d'efflux mais résulte probablement du stockage du cuivre par la protéine RcnB, celle-ci étant capable de fixer un atome de cuivre par monomère [voir Chapitre 8].

Cette expérience montre qu'une souche délétée du gène *rcnB* n'est pas directement affectée dans sa résistance au cuivre car le niveau de cuivre intracellulaire n'est pas grandement modifié. Toutefois, la surexpression de la protéine RcnB provoquée par l'apport du plasmide pUC*rcnB* améliore sensiblement la résistance à ce métal. Le gène *rcnB* a donc une implication dans l'homéostasie du cuivre. Mais il est possible que la présence d'autres systèmes de maintien de l'homéostasie de cet élément masque la fonction de RcnB. Pour cette raison, les interactions entre le gène *rcnB* et ces différents systèmes ont été étudiées.

9.3 Relations entre le gène *rcnB* et les autres systèmes impliqués dans l'homéostasie du cuivre chez *E. coli*

Pour rappel, trois systèmes chromosomiques de résistance au cuivre, CopA, CusCFBA et CueO [voir 3.3.4 et 3.5.2] ont été décrits à ce jour chez *E. coli*. CopA est une pompe d'efflux de la membrane interne permettant d'exclure les ions Cu^+ du cytoplasme. Le système CusCFBA est un système RND capable de détoxiquer majoritairement le périplasma et il est surtout actif en conditions anaérobies. Quant à CueO, elle peut oxyder les ions cuivreux du périplasma en ions cuivriques moins toxiques et n'est active qu'en présence de dioxygène.

Le gène *rcnB* ne semble pas directement impliqué dans la résistance au cuivre mais la surproduction de la protéine RcnB est capable d'augmenter la résistance à ce métal d'une souche sauvage d'*E. coli* [Figure 60]. Cela plaide pour une action indirecte de la protéine. Ainsi, la complémentation par *rcnB* des mutants des trois systèmes CopA, CusCFBA et CueO a été réalisée². Un test préliminaire a tout d'abord été effectué et les résultats sont présentés [Tableau 11]. Ces données ont été obtenues en conditions aérobies. Le diamètre du halo d'inhibition n'est pas significativement modifié par la complémentation par *rcnB* que ce soit pour le mutant *copA* ou le mutant *cusCFBA*. En revanche, le mutant *cueO* voit sa résistance grandement augmenter lorsque le gène *rcnB* est apporté.

2. ces mutants n'ont pas été construits au laboratoire mais proviennent d'un autre groupe [316]

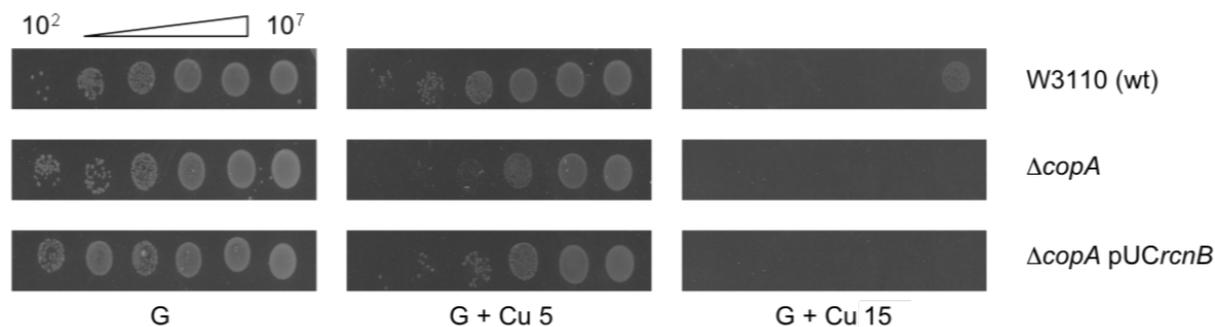


Figure 61 – Lien entre *rcnB* et *copA* pour le phénomène de résistance au cuivre.

Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C jusqu'en phase stationnaire de croissance. Puis un aliquot de culture est dilué en cascades de 10^{-1} en 10^{-1} . 5 μl des dilutions contenant de 10^2 (gauche) à 10^7 (droite) bactéries sont déposés sur milieu minimum M63 + 0,4 % glucose (G), supplémenté par 5 ou 15 μM d'ions Cu^{2+} . Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C en conditions aérobies pendant 24 à 48 h. Une expérience significative est présentée.

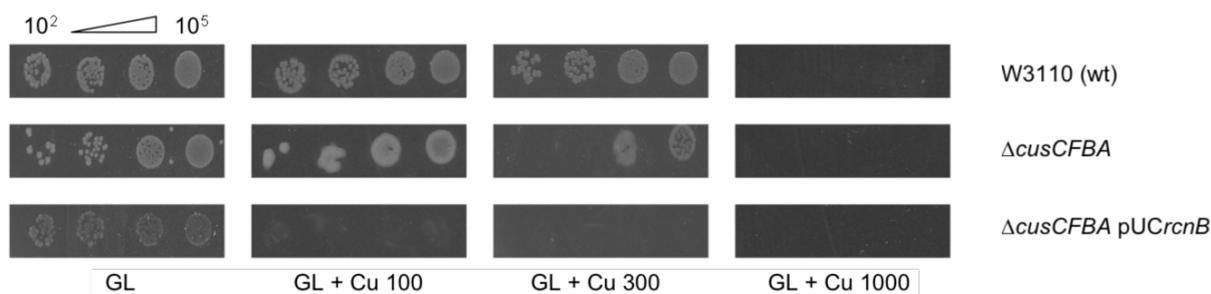


Figure 62 – Lien entre *rcnB* et *cusCFBA* pour le phénomène de résistance au cuivre.

Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C jusqu'en phase stationnaire de croissance. Puis un aliquot de culture est dilué en cascades de 10^{-1} en 10^{-1} . 5 μl des dilutions contenant de 10^2 (gauche) à 10^5 (droite) bactéries sont déposés sur milieu riche LB (GL), supplémenté par 100, 300 ou 1000 μM d'ions Cu^{2+} . Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C en conditions anaérobies pendant 48 à 72 h. Une expérience significative est présentée.

9.3.1 Influence de RcnB sur une souche mutante délétée de *copA*

Les résultats précédents [Tableau 11] ont été vérifiés par la méthode des gouttes sur les souches sauvage, $\Delta copA$ et $\Delta copA$ complétée par *rcnB* [Figure 61]. Le mutant *copA* est plus sensible que la souche sauvage puisque l'effet toxique du cuivre est visible pour une concentration aussi faible que 5 μM . Cette forte toxicité du cuivre montre bien le caractère essentiel de CopA. Le cuivre libre est supposé absent du cytoplasme en conditions physiologiques et donc, en absence de la pompe d'efflux cytoplasmique CopA, un excès de cuivre est très toxique pour les cellules. L'apport du gène *rcnB* ne modifie pas ce phénotype et n'améliore pas la résistance des bactéries. Les phénotypes présentés ici ont été obtenus en conditions aérobies mais, en conditions anaérobies, ils sont tout à fait comparables avec le gène *rcnB* incapable d'augmenter la résistance du mutant *copA*³. Les résultats sont donc en accord avec le tableau 11.

Le plasmide portant *rcnB* augmente la résistance d'une souche sauvage [Figure 60] mais n'a pas d'effet sur un mutant *copA*. RcnB ne peut pas pallier l'absence de CopA. Ces résultats laissent penser que RcnB, de par sa localisation périplasmique, influence le niveau de cuivre présent dans le périplasma mais n'a aucun effet sur les ions Cu^+ du cytoplasme.

9.3.2 Influence de RcnB sur une souche mutante délétée de *cusCFBA*

Pour confirmer cette observation, l'étude de la surproduction de RcnB chez le mutant délété du système CusCFBA impliqué dans la détoxification du périplasma a été réalisée. La méthode des gouttes a été employée pour étudier la résistance au cuivre des souches sauvage, $\Delta cusCFBA$ et $\Delta cusCFBA$ complétée par *rcnB*. Les résultats présentés ici [Figure 62] ont été obtenus en conditions anaérobies car en aérobiose, aucune différence n'est observée entre la souche sauvage et le mutant $\Delta cusCFBA$ [Tableau 11 et données non présentées]. A la différence des expériences précédentes réalisées en milieu minimum, du milieu riche a ici été employé. En effet, en anaérobiose, le cuivre est extrêmement toxique car les ions Cu^+ sont plus stables. Les quantités de métal ajoutées dans le milieu minimum doivent donc être extrêmement faibles et les différences entre les souches sont peu marquées. Le milieu LB permet d'obtenir des résultats plus clairs. Ainsi, le mutant *cusCFBA* est plus sensible au cuivre que la souche sauvage et l'effet toxique du métal est clairement visible à 300 μM . La complémentation par *rcnB* augmente considérablement la sensibilité du mutant puisque la croissance est complètement inhibée pour une concentration de 100 μM . La croissance des bactéries semble d'ailleurs perturbée par rapport aux autres souches même en absence de métal. La surexpression de *rcnB* est donc plus toxique chez un mutant *cusCFBA* que chez la souche sauvage.

Les résultats obtenus pour les mutants $\Delta copA$ et $\Delta cusCFBA$ permettent de mieux appréhender la hausse de la quantité totale de cuivre observée pour les bactéries complétées par *rcnB* [Tableau 10]. D'après les données issues de l'étude du mutant *copA*, il semble que RcnB ne modifie pas le pool cytoplasmique de cuivre. En revanche, les résultats concernant le mutant *cusCFBA* indiquent qu'en cas d'absence de ce système d'efflux périplasmique, la surproduction de RcnB accentue la sensibilité au cuivre. L'hypothèse la plus probable est que RcnB contribue à augmenter le niveau de cuivre présent dans le périplasma. Ces données *in vivo* viennent confirmer les observations *in vitro* concernant la fixation du cuivre par RcnB.

3. données non présentées

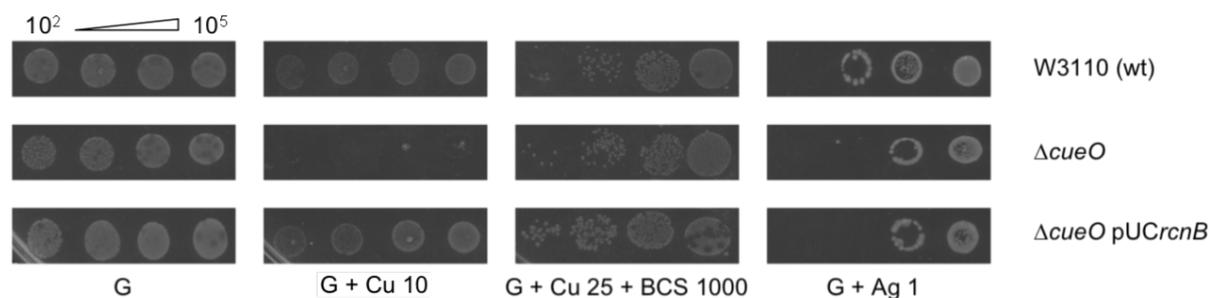


Figure 63 – Lien entre *rcnB* et *cueO* pour le phénomène de résistance au cuivre.

Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C jusqu'en phase stationnaire de croissance. Puis un aliquot de culture est dilué en cascades de 10^{-1} en 10^{-1} . 5 μ l des dilutions contenant de 10^2 (gauche) à 10^5 (droite) bactéries sont déposés sur milieu minimum M63 + 0,4 % glucose (G), supplémenté par 10 ou 25 μ M d'ions Cu^{2+} ou 1 μ M des ions Ag^+ . Le BCS est un agent chélatant spécifique des ions Cu^+ et son addition en large excès permet de séquestrer la totalité de ces ions. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C en conditions aérobies pendant 24 à 48 h. Une expérience significative est présentée.

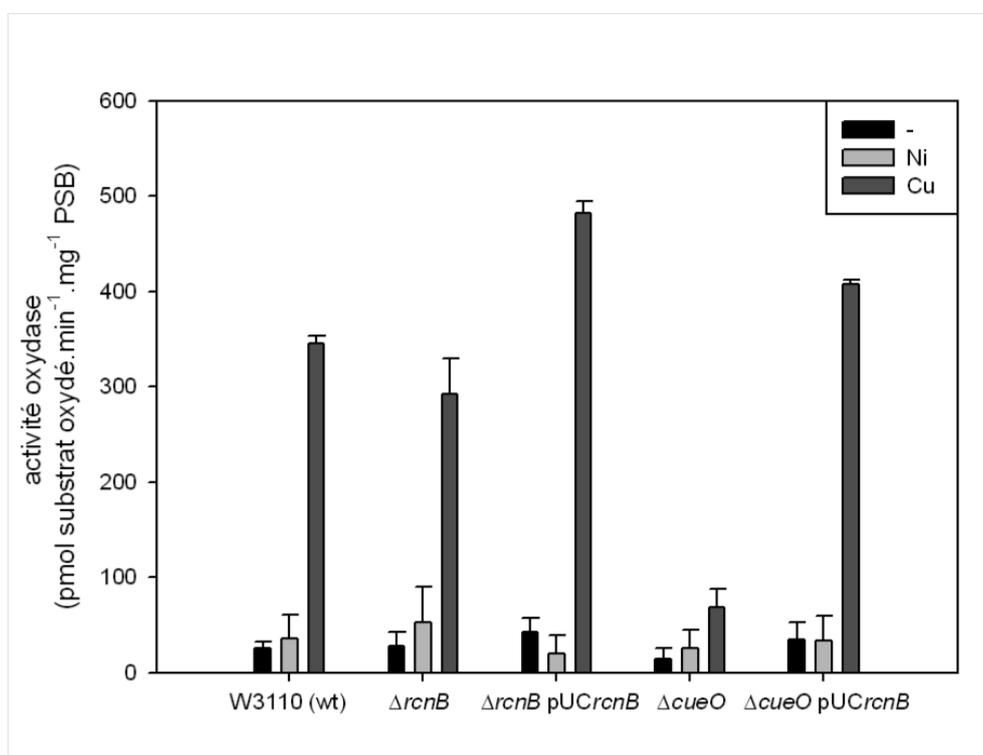


Figure 64 – Effet de *RcnB* sur l'activité oxydase de différentes souches.

Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu LB supplémenté ou non par des métaux en conditions aérobies à 37°C jusqu'en phase stationnaire de croissance. Puis, l'extraction des protéines périplasmiques est réalisée. L'oxydation du substrat synthétique 3,3-diméthoxybenzidine est quantifiée par dosage colorimétrique et les résultats sont exprimés en pmol de substrat oxydé. mg^{-1} de PSB. min^{-1} . La moyenne ainsi que l'écart-type de 3 cultures indépendantes sont présentés.

9.4 Relation entre RcnB et l'activité oxydase des bactéries

9.4.1 Influence de RcnB sur une souche mutante délétée de *cueO*

Le test préliminaire présenté dans le Tableau 11 montrait clairement une résistance accrue au cuivre chez un mutant *cueO* complémenté par *rcnB*. Comme pour les deux autres systèmes, la méthode en gouttes a été employée pour les souches sauvage, $\Delta cueO$ et $\Delta cueO$ complémentée par *rcnB* et les résultats sont présentés [Figure 63]. CueO est une oxydase et n'est active qu'en présence d'oxygène, les expériences ont donc été effectuées en aérobiose. Pour une concentration de 10 μM de cuivre, la croissance du mutant *cueO* est complètement inhibée. En revanche, la complémentation par *rcnB* permet de restaurer le phénotype sauvage. L'ajout dans le milieu d'un excès de BCS⁴, agent chélatant spécifique des ions Cu^+ permet de supprimer l'effet toxique du cuivre pour le mutant *cueO*. Cela montre bien que ce sont ces ions Cu^+ qui génèrent la toxicité. Le gène *cueO* étant également induit par l'argent, un test a été réalisé avec ce métal. La souche mutante est légèrement affectée par ce métal et la complémentation par RcnB ne modifie pas le phénotype indiquant une certaine spécificité de RcnB à l'égard du cuivre. RcnB peut donc tout à fait compenser l'absence de CueO en ce qui concerne la résistance au cuivre. Cela suggère que les fonctions de RcnB et CueO pourraient être reliées.

9.4.2 Le gène *rcnB* permet de restaurer l'activité oxydase d'un mutant *cueO*

Il a été montré que CueO possédait une activité oxydase étant capable d'oxyder les ions Cu^+ en ions Cu^{2+} . Cette réaction est principalement responsable de la résistance au cuivre [voir 3.5.2]. Pour tester l'hypothèse d'une complémentation fonctionnelle de CueO par RcnB, l'activité oxydase a été dosée chez les souches sauvage, $\Delta cueO$ et $\Delta cueO$ complémentée par *rcnB* ainsi que pour les souches $\Delta rcnB$ et $\Delta rcnB$ complémentée par *rcnB* [Figure 64]. Ces dosages ont été effectués sur des extraits périplasmiques de souches cultivées dans différentes conditions, en ajoutant du nickel ou du cuivre dans le milieu pour induire respectivement *rcnB* et *cueO*. L'activité oxydase est ensuite mesurée par le suivi de l'oxydation du substrat synthétique 3,3-diméthoxybenzidine. En milieu LB ou milieu LB supplémenté en nickel, aucune activité oxydase significative n'est détectée pour aucune des souches. Dans ces conditions, l'expression du gène *cueO* n'est pas induite. En revanche, la protéine RcnB est produite en grande quantité en présence de nickel. Cela suggère que la protéine RcnB n'est pas directement responsable de l'activité oxydase. Lorsque du cuivre est ajouté au milieu, l'activité oxydase de la souche sauvage est bien visible. Aucune altération de cette activité n'est observée chez le mutant *rcnB* confirmant ainsi le fait que RcnB n'est pas directement responsable de l'activité oxydase. Toutefois, cette activité est légèrement stimulée pour cette même souche délétée de *rcnB* complémentée par *rcnB* et qui surproduit donc la protéine RcnB. Chez le mutant *cueO*, l'activité oxydase est très réduite comme attendu. La complémentation par *rcnB* permet de restaurer cette activité à un niveau comparable ou très légèrement supérieur à la souche sauvage. La surproduction de RcnB peut donc restaurer l'activité oxydase en absence de CueO.

4. Bathocuproïne DiSulfonate

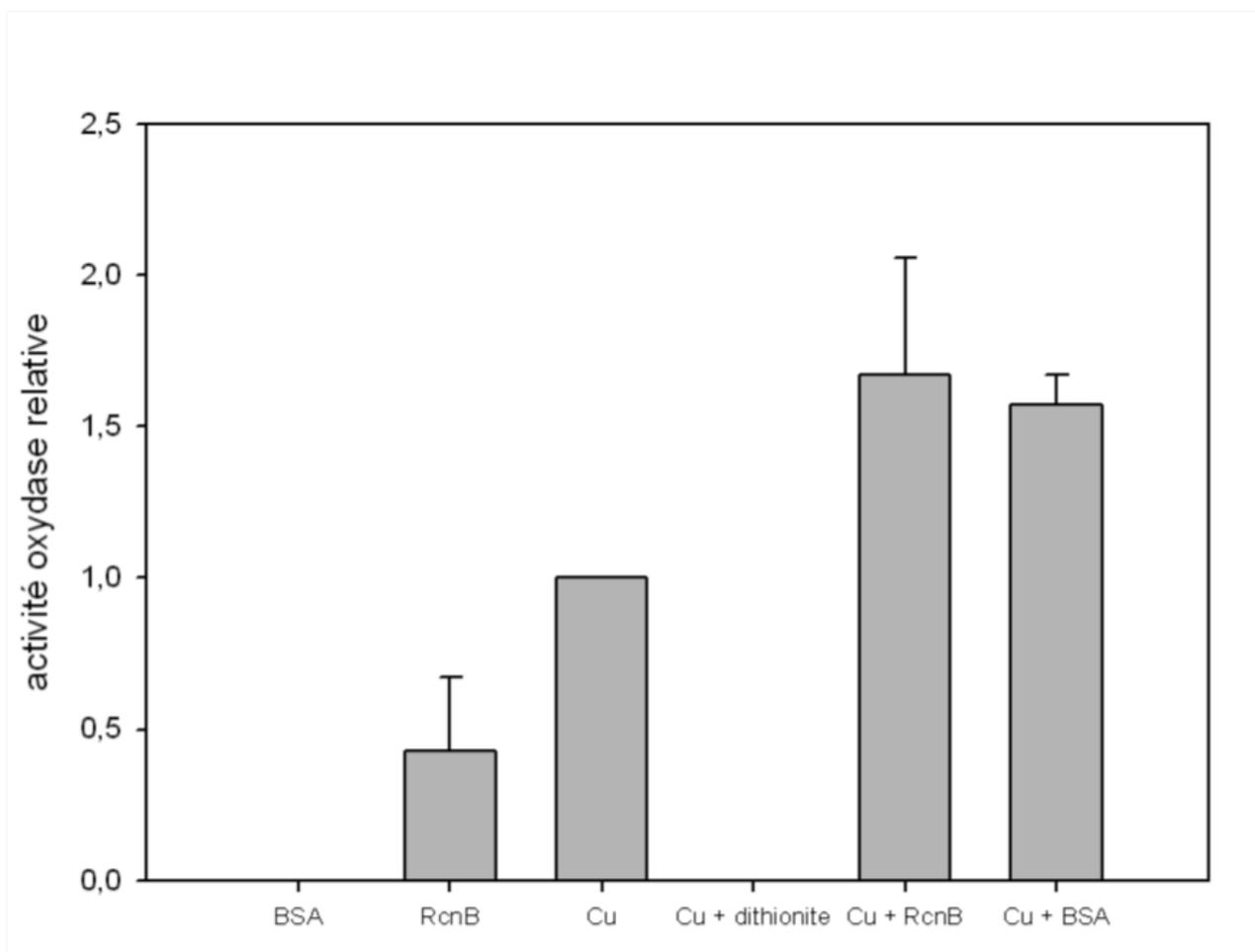


Figure 65 – Activité oxydase de la protéine RcnB purifiée.

Le dosage de l'activité oxydase est effectué en mesurant l'oxydation du substrat synthétique 3,3-diméthoxybenzidine à l'aide d'un dosage spectrophotométrique à 540 nm. Des quantités égales de protéine ou de cuivre (CuSO_4) sont utilisées pour chaque réaction ($100 \mu\text{M}$) et un mélange équimolaire ($100 + 100 \mu\text{M}$) dans le cas de Cu + RcnB et Cu + BSA. Le dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), agent réducteur, est utilisé en large excès (5 mM). Les résultats sont exprimés en activité relative par rapport à celle du cuivre seul prise pour référence. La moyenne ainsi que l'écart-type de quatre expériences indépendantes sont présentés.

Tableau 12 – Détermination par ICP-OES de l'accumulation du cobalt, cuivre et nickel par les bactéries

Milieu LB + Métal dosé	-	Cu	Ni	Ni + Cu	Co	Co + Cu
Co (ppm)	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	33 (+/-1)	63 (+/-10)
Cu (ppm)	<i>n.d</i>	31 (+/-20)	<i>n.d</i>	41 (+/-21)	<i>n.d</i>	25 (+/-18)
Ni (ppm)	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	33 (+/-11)	140 (+/-57)	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>

Les cultures de la souche sauvage W3110 sont effectuées dans du milieu LB supplémenté par différentes quantités de métaux en conditions aérobies à 37°C et les bactéries sont récoltées à $\text{D.O}_{600nm} \approx 0,6$. Concentrations de métal utilisées : $\text{Co}^{2+} = 50 \mu\text{M}$, Cu^{2+} et $\text{Ni}^{2+} = 500 \mu\text{M}$. Les résultats sont exprimés en ppm ($\mu\text{g métal.g}^{-1}$ PSB). *n.d* = non détecté. La moyenne ainsi que l'écart-type de 3 cultures indépendantes sont présentés.

9.4.3 Activité oxydase spécifique de la protéine RcnB

Pour étudier l'activité oxydase de RcnB, un dosage de l'activité enzymatique sur la protéine pure a été effectué. Les résultats sont présentés sur la Figure 65. La BSA est ici utilisée comme témoin négatif. Cette protéine fixe le cuivre avec une forte affinité⁵ [317] mais ne possède aucune activité oxydase. Les ions Cu^{2+} sont quant à eux utilisés comme témoin positif. En effet, ceux-ci, grâce à leur potentiel d'oxydo-réduction, sont capables d'oxyder le substrat. Lorsqu'un excès d'agent réducteur⁶ est ajouté dans le milieu, le substrat n'est plus oxydé. A la différence de la BSA, la protéine RcnB purifiée possède une légère activité oxydase intrinsèque toutefois plus faible que celle des ions Cu^{2+} seuls. Les deux protéines possèdent en revanche une activité oxydase comparable lorsque du cuivre est ajouté. Dans ce cas, ce sont les ions Cu^{2+} qui oxydent le substrat. Ceci confirme le fait que les deux protéines fixent les ions Cu^{2+} puisque les ions métalliques non fixés sont éliminés avant le dosage. L'activité oxydase mesurée dans ces conditions, protéines et ions Cu^{2+} , est légèrement supérieure à celle des ions Cu^{2+} seuls. Une explication possible est que la coordination du cuivre par les protéines modifie légèrement le potentiel d'oxydo-réduction du cuivre qui devient alors plus efficace pour oxyder le substrat.

Toutes ces données indiquent donc que la protéine RcnB possède une activité oxydase qui peut pallier l'absence de CueO. En cas de stress causé par le cuivre, RcnB peut se substituer à CueO et restaurer un phénotype de résistance identique à la souche sauvage.

9.5 Effets cumulés du nickel, du cobalt et du cuivre

Bien qu'étant une protéine manifestement impliquée dans l'homéostasie du cuivre, RcnB appartient au système Rcn de résistance au cobalt et au nickel. Cette protéine pourrait donc constituer un point de convergence entre les homéostasies de ces différents métaux.

9.5.1 Effet du cuivre sur l'accumulation totale de nickel et de cobalt

L'effet du cuivre sur l'accumulation du nickel et du cobalt a été étudié par des analyses ICP-OES. La détermination du contenu en nickel et cobalt d'une souche sauvage a ainsi été effectuée en absence ou en présence de cuivre [Tableau 12]. L'accumulation de nickel est multipliée par 4 en présence de cuivre par rapport à des conditions où seul le nickel est ajouté dans le milieu. Pour le cobalt, l'effet est également visible mais de plus faible amplitude puisque la quantité de cobalt accumulée est doublée en présence de cuivre. La présence de cuivre influence donc fortement les niveaux de nickel et de cobalt ce qui montre un lien entre les homéostasies de ces différents métaux. A l'inverse, les niveaux de cuivre ne semblent pas significativement modifiés en présence de nickel ou de cobalt.

Il est à noter pour cette série d'expériences que d'une part, les écarts-type sont relativement importants et que d'autre part, les niveaux de nickel et de cobalt mesurés sur la souche sauvage en présence des ions Ni^{2+} et Co^{2+} seuls diffèrent de ceux précédemment obtenus [voir Tableau 9]. Ceci peut s'expliquer par le fait que les lots de milieu sont différents et peuvent contenir initialement des quantités inégales de métaux ou d'agents chélatants. Ainsi, les valeurs relatives

5. $K_d \approx 10^{-11}$ M

6. le dithionite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

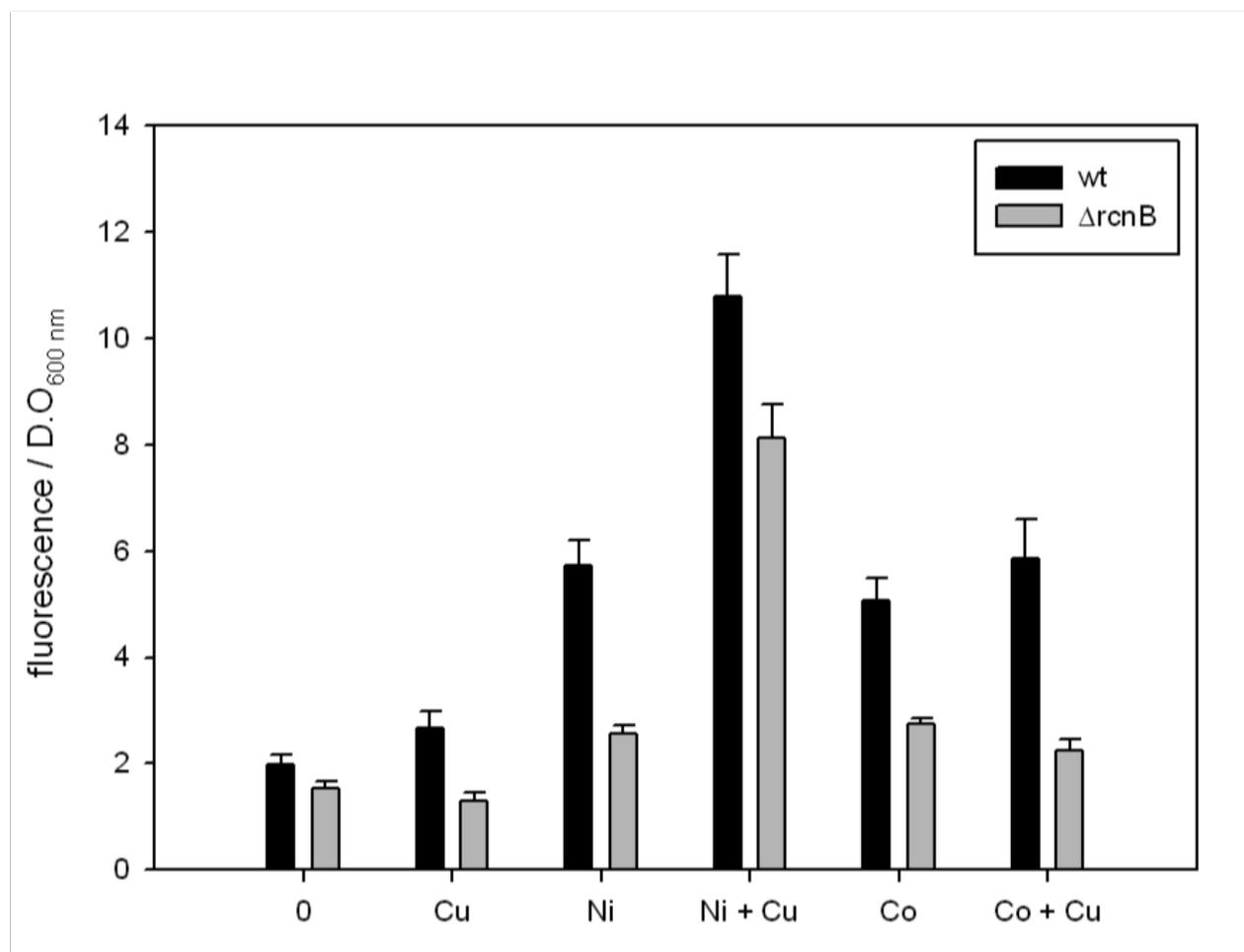


Figure 66 – Effet croisé des ions nickel, cobalt et cuivre sur l'expression de la fusion *rcnA-gfp*

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB supplémenté par différentes quantités de métaux en conditions aérobies à 37°C. Concentrations de métaux utilisées : $\text{Co}^{2+} = 50 \mu\text{M}$, Cu^{2+} et $\text{Ni}^{2+} = 500 \mu\text{M}$. La fluorescence est mesurée à $\lambda_{510 \text{ nm}}$ après excitation à $\lambda_{490 \text{ nm}}$. La valeur de fluorescence est rapportée à la $\text{D.O}_{600 \text{ nm}}$. La fluorescence est mesurée après 4 h de croissance. La moyenne ainsi que l'écart-type d'au moins 3 manipulations distinctes sont représentés.

de métal entre les conditions sont plus significatives que les valeurs absolues.

9.5.2 Effet du cuivre sur la quantité cytoplasmique de nickel et de cobalt

Afin de mieux comprendre la hausse de l'accumulation des ions Ni^{2+} et Co^{2+} en présence de cuivre, des expériences portant sur l'induction de l'opéron *rcnAB* ont été réalisées. Cet opéron est inductible par les ions Ni^{2+} et Co^{2+} de manière dose-dépendante [voir Chapitre 6] et son expression reflète la quantité de métaux présents dans le cytoplasme. Le plasmide portant la fusion transcriptionnelle *rcnA-gfp* a été employé pour transformer la souche sauvage mais également la souche mutante privée du gène *rcnB*. La fluorescence des bactéries a ensuite été mesurée en présence des ions Ni^{2+} , Co^{2+} ou Cu^{2+} seuls ou d'un mélange $\text{Ni}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$ ou $\text{Co}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$ [Figure 66]. Pour la souche sauvage, la fluorescence mesurée en présence de cuivre seul n'est pas différente de celle observée en absence de métal et l'induction par le nickel et le cobalt est bien visible. Pour le mélange $\text{Ni}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$, la fluorescence augmente significativement par rapport à la condition Ni^{2+} seul ce qui suggère une accumulation plus importante de nickel dans le cytoplasme dans ce cas. Cela confirme les résultats de l'analyse ICP. En revanche, pour le mélange $\text{Co}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$, aucune augmentation n'est observée ce qui montre que la variation observée en ICP, déjà plus faible que pour le nickel, n'a pas de répercussion sur l'induction de l'opéron *rcnAB*.

Comme précédemment observé, les niveaux de fluorescence sont plus faibles pour le mutant *rcnB* que pour la souche sauvage quelles que soient les conditions. Toutefois, l'effet du cuivre sur l'accumulation du nickel reste bien visible chez le mutant puisque la fusion est induite lorsque les deux métaux sont ajoutés au milieu de culture.

La construction *rcnA-gfp* permet de quantifier la quantité d'ions Ni^{2+} et Co^{2+} présents dans le cytoplasme contrairement aux dosages ICP-OES qui reflètent la quantité totale de ces ions. Or, RcnB étant localisée dans le périplasme, son effet doit être plus marqué sur les pools d'ions métalliques de ce compartiment ou des membranes cytoplasmiques et externes. Pour vérifier cela, il serait intéressant de doser les métaux par ICP-OES dans les mêmes conditions chez un mutant *rcnB*.

9.6 Conclusion

Le gène *rcnB* semble impliqué dans la résistance au cuivre et la surproduction de la protéine correspondante entraîne une augmentation de la teneur en cuivre des cellules. De plus, le gène *rcnB* peut interférer avec les autres systèmes de résistance au cuivre en complétant notamment un mutant *cueO* et en permettant à ce mutant de retrouver une activité oxydase normale. Enfin, un lien entre les homéostasies du nickel et du cuivre, et dans une moindre mesure du cobalt et du cuivre, a été mis en évidence même si cela semble indépendant du gène *rcnB*.

Troisième partie

Conclusion

Chapitre 10

Discussion et perspectives

10.1 Régulation transcriptionnelle du système RcnRAB

10.1.1 Spécificité de la réponse du système RcnRAB

Les résultats présentés dans le chapitre 6 montrent que des cations divalents autres que les ions Ni^{2+} et Co^{2+} , les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} peuvent influencer l'interaction *in vitro* entre RcnR et la région promotrice de *rcnAB* et donc la régulation du système. Cependant, c'est uniquement lorsque ces cations sont en quantité importante qu'ils peuvent provoquer la dissociation du complexe ADN/protéine. Or, les niveaux d'ions Cu^{2+} et Zn^{2+} libres sont supposés très faibles chez *E. coli* ($< 10^{-15}$ M) [22, 246]. La question d'une réelle fonction biologique de ces résultats peut se poser car il s'agit d'études *in vitro*, dans lesquelles seuls les cations, la protéine RcnR et la sonde ADN sont mis en contact. Les interactions sont en quelque sorte un peu contraintes et ces conditions sont très éloignées de ce qui se passe dans les bactéries. En effet, dans le cas de l'opéron *rcnAB* seuls les ions Ni^{2+} et Co^{2+} peuvent induire l'expression [voir 6.1.2]. *In vivo*, les protéines sont en contact avec de nombreux cations divalents très proches du point de vue de la taille. Pourtant, celles-ci sont capables de reconnaître très sélectivement tel ion et pas un autre [10, 30]. A titre d'exemple, il y a environ 40 fois plus d'ions Fe^{2+} que d'ions Ni^{2+} chez *E. coli* [Tableau 5]. Pourtant, les enzymes à Ni^{2+} , tout comme le système Rcn, sont capables de reconnaître sélectivement les ions Ni^{2+} et pas les ions Fe^{2+} . Comme détaillés en introduction, ces phénomènes de reconnaissance sont complexes et peuvent nécessiter des protéines auxiliaires. De plus, la biodisponibilité des métaux et leur concentration locale sont très contrôlées dans la cellule. Or, cet aspect n'est pas pris en compte dans les expériences *in vitro*. Une étude des propriétés de fixation des cations métalliques Cu^{2+} et Zn^{2+} par la protéine RcnR pourrait être réalisée pour approfondir cet aspect.

Un autre aspect intéressant concernant la régulation du système Rcn révélé par ce travail est l'interférence entre les homéostasies du cuivre et du nickel. En effet, la présence de cuivre dans le milieu augmente considérablement la quantité intracellulaire de nickel et dans une moindre mesure de cobalt. L'hypothèse la plus probable serait que les ions Cu^{2+} entrent en compétition avec les ions Ni^{2+} et diminuent ainsi la prise en charge de ces derniers par la pompe d'efflux RcnA. Toutefois, l'absence de RcnA ne modifie pas le profil de résistance au cuivre [233] ce qui laisse penser que cette protéine n'est pas impliquée dans l'homéostasie du cuivre.

Une autre hypothèse est possible pour expliquer la forte induction de l'opéron *rcnAB* par le nickel en présence de cuivre. D'après la série d'Irving & Williams, le cuivre a plus d'affinité

pour les ligands biologiques que le nickel et il est possible que les ions Cu^{2+} en excès chassent les ions Ni^{2+} de leurs sites de fixation. Ainsi, la biodisponibilité des ions Ni^{2+} serait accrue ce qui expliquerait la différence observée au niveau de l'induction de *rcnAB*.

D'autre part, une étude a révélé un lien possible entre le système Rcn et l'homéostasie du fer [310]. Il a été montré qu'une boîte potentielle de reconnaissance du métallorégulateur Fur est présente dans la région de régulation commune de *rcnR* et *rcnA*. Un effet du fer sur la régulation des gènes *rcnR* et *rcnA* a d'ailleurs été mis en évidence mais celui-ci semble indépendant des métallorégulateurs Fur et RcnR. Ces résultats seraient à approfondir. Dans le cadre du travail présenté ici, des tests de résistance au fer ont été réalisés sur la souche délétée de *rcnB* mais aucun phénotype n'a pu être mis en évidence.

Pour conclure, bien que le système Rcn soit spécifiquement régulé par les ions Ni^{2+} et Co^{2+} , des relations complexes existent avec les métaux les plus proches dans le tableau périodique à savoir le cuivre et le fer. Ces effets, s'ils ont un réel sens biologique, constituent un phénomène intéressant dans l'homéostasie des ions métalliques. En effet, la vision simpliste voudrait que chaque pool de métal dans la cellule soit indépendant et régulé par ses propres systèmes de régulation, d'import, de transit intracellulaire, d'efflux et de stockage. Mais la réalité biologique est sans doute beaucoup plus complexe. En fonction de la biodisponibilité des différents éléments qui varie avec les conditions environnementales, des interactions secondaires peuvent avoir de l'importance et influencer le fonctionnement des systèmes dédiés à l'homéostasie des métaux. Dans ce contexte, le niveau d'un métal peut influencer les niveaux des autres, tout du moins les plus proches d'un point de vue physico-chimique. Les pools des différents métaux seraient donc plus à voir comme différents éléments interconnectés qui peuvent s'influencer mutuellement. Par exemple, chez *E. coli*, il a été montré qu'un excès de cobalt avait pour effet de diminuer la transcription des gènes des transporteurs du nickel Nik et du fer Feo [235]. Il en résulterait alors une baisse de la quantité de nickel et de fer dans les cellules même si ce phénomène n'a pour l'heure pas été montré. Cela illustre bien le concept d'interconnexion entre les ions métalliques les plus proches dans le tableau périodique. L'effet synergique de deux¹ métaux de nature différente sur les bactéries n'a pour l'heure quasiment jamais été étudié principalement en raison de la complexité d'une telle approche mais constitue un axe intéressant pour l'avenir. En combinant des études physiologiques sur la résistance des bactéries et la détermination des quantités cellulaires totales de métaux par ICP-OES, il est possible de mettre à jour des connexions originales à l'image de ce qui a été montré ici [Tableau 12 et Figure 66].

10.1.2 Régulation différentielle par le nickel et le cobalt

Le profil d'induction de l'opéron *rcnAB* en présence de concentrations croissantes des deux types d'ions Ni^{2+} et Co^{2+} montre trois différences importantes entre ces deux métaux [Figure 38]. Tout d'abord, en milieu riche, l'induction du système Rcn est bien visible à partir de 10 μM d'ions Co^{2+} alors qu'elle n'est pas observable pour les ions Ni^{2+} lorsque leur concentration est inférieure à 200 μM . En second lieu, le cobalt commence à affecter la croissance bactérienne à une concentration de 100 μM alors que l'effet du nickel ne se fait ressentir qu'à partir de 500 μM . Enfin, une dernière remarque à propos de ces expériences concerne la saturation du système Rcn. Ainsi, le cobalt est capable d'induire le système à son maximum pour une faible concentration (25 μM) à partir de laquelle un plateau est observé. Mais entre 25 et 100 μM

1. ou plus !

de cobalt, aucun effet sur la croissance bactérienne n'est visible. En revanche, le plateau n'est jamais atteint en présence de nickel puisque l'effet toxique de ce métal devient trop important pour des concentrations supérieures à 1 mM et la perte de viabilité engendrée ne permet pas d'effectuer la mesure de l'activité de *rcnA-uidA*. Ces trois observations suggèrent que le nickel est moins toxique que le cobalt pour une même quantité ajoutée dans le milieu de culture.

Une étude portant sur la fixation des ions Ni^{2+} et Co^{2+} par RcnR a montré que l'affinité était du même ordre de grandeur pour les deux ions avec une limite supérieure de l'ordre de 10^{-9} M [311]. Toutefois, la coordination de ces deux ions métalliques n'est pas exactement la même [voir 5.2.3]. Il se peut donc que la fixation du nickel et du cobalt puisse être à l'origine d'un changement de conformation de la protéine RcnR légèrement différent pour ces deux métaux. Dans ce cas, l'affinité de RcnR pour l'ADN pourrait varier légèrement *in vivo*² ce qui expliquerait les différences observées dans la régulation.

Une autre différence importante existe entre les homéostasies du nickel et du cobalt. Le nickel possède un système dédié à son entrée dans la cellule, le système NikABCDE nécessaire pour la synthèse des hydrogénases. La quantité de nickel intracellulaire résulte donc des activités des systèmes Nik et Rcn. Les connaissances actuelles ne permettent pas d'identifier un tel équilibre dynamique entrée-sortie pour le cobalt puisqu'aucun transporteur spécifique connu à ce jour ne permet l'entrée des ions Co^{2+} libres dans la cellule. A la différence des ions Ni^{2+} , les ions Co^{2+} libres³ ne sont pas nécessaires pour *E. coli*. Seule la vitamine B12 est nécessaire pour un certain nombre de réactions métaboliques et celle-ci possède son propre système de transport. A la différence des ions Ni^{2+} , les ions Co^{2+} libres présentent donc un caractère essentiellement toxique notamment par leur entrée en compétition avec les ions Fe^{2+} [235].

De plus, des protéines chaperons ont été identifiées pour le nickel chez *E. coli*. C'est ainsi le cas des protéines de l'opéron *hyp* et de SlyD. Il n'est de plus pas exclu que des protéines de stockage de ce métal puissent exister à l'image des protéines Hpn de *H. pylori* par exemple [242]. Bien que quelques exemples de métalochaperons à cobalt soient connus comme la protéine AnhE de *Rhodococcus jostii* [319], aucun exemple n'a été décrit chez *E. coli*. Cela pourrait également expliquer la toxicité plus prononcée du cobalt.

La raison des différences observées entre le nickel et le cobalt pourrait cependant être due aux conditions expérimentales utilisées. Il est en effet connu que le milieu LB, milieu complexe dont la composition n'est pas exactement établie, possède des éléments peptidiques qui chélatent les ions métalliques. Il est donc possible que les ions Ni^{2+} soient moins biodisponibles car plus chélatés. Dans ce cas, les bactéries accumuleraient proportionnellement moins de Ni^{2+} que de Co^{2+} lors de l'ajout d'une même quantité totale dans le milieu. Les données issues des analyses ICP [voir 7.2.1] confirment cette idée puisque les bactéries accumulent une quantité comparable de métal alors qu'une quantité dix fois plus importante de nickel est ajoutée dans le milieu LB.

Des expériences ont alors été effectuées en milieu minimum dans lequel les ions métalliques ajoutés sont beaucoup moins chélatés par les constituants du milieu. Dans ce cas, l'induction de l'opéron *rcnAB* est, comme en milieu riche, plus forte en présence de cobalt que de nickel et un plateau est visible uniquement pour les ions Co^{2+} . Ces manipulations semblent donc bien confirmer que la régulation du système Rcn par le nickel et le cobalt n'est pas la même. Cela est probablement imputable à une homéostasie différente des ions Ni^{2+} et Co^{2+} dans la cellule.

2. même si *in vitro*, les ions Ni^{2+} et Co^{2+} provoquent la dissociation du complexe ADN-protéine pour une stoechiométrie de 1 pour 1 [Figure 33]

3. dans le sens de non coordonnés par la vitamine B12

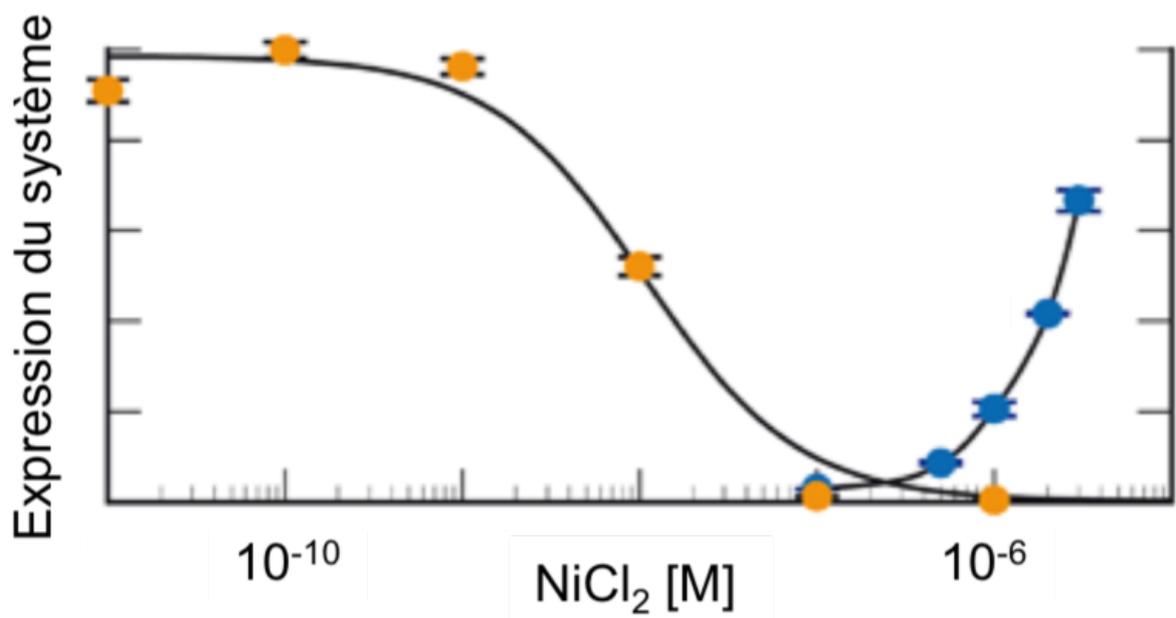


Figure 67 – Profil d'expression des systèmes Nik et Rcn

Les profils d'expression des systèmes Nik (en jaune) et Rcn (en bleu) sont indiqués en fonction de la concentration en ions Ni²⁺ du milieu. Figure adaptée de [318].

Toutes ces expériences mettent également en évidence la notion de biodisponibilité des ions métalliques. La part de métal effectivement accessible pour les macromolécules intracellulaires est une donnée extrêmement difficile à estimer ce qui peut parfois entraver la compréhension des phénomènes biologiques.

10.1.3 Complémentarité des systèmes Nik et Rcn dans l'homéostasie du nickel

Les systèmes d'entrée Nik et d'efflux Rcn régulant la quantité de nickel intracellulaire sont sous le contrôle des deux seuls métallorégulateurs Ni^{2+} -dépendant identifiés à ce jour chez *E. coli*, NikR et RcnR. Les deux systèmes ont besoin d'être synchronisés pour éviter des cycles futiles d'import-export des ions Ni^{2+} . Ainsi, pour des concentrations très faibles en nickel libre, NikR et RcnR sont sous forme apo. Le système d'import Nik est alors exprimé alors que le système d'efflux Rcn est réprimé. Lorsque la concentration en ions Ni^{2+} s'élève, NikR qui répond à de plus faibles concentrations de nickel que RcnR, va fixer les ions Ni^{2+} et réprimer progressivement l'expression du système Nik. Dans ces conditions, l'expression du système Rcn est toujours réprimé par RcnR. Dans le cas de plus fortes concentrations de nickel, RcnR va alors fixer le nickel ce qui entraînera sa dissociation de l'ADN et la pleine expression du système Rcn [309]. Les deux régulateurs Ni^{2+} -dépendant d'*E. coli* agissent donc de manière complémentaire puisqu'ils empêchent la co-expression du système d'entrée Nik et du système d'efflux Rcn [Figure 67]. Une hypothèse a récemment été proposée selon laquelle l'affinité des métallorégulateurs NikR et RcnR serait corrélée à la géométrie du site de coordination des ions Ni^{2+} . Ainsi, le site de haute affinité de NikR où les ions Ni^{2+} sont coordonnés par quatre ligands selon une géométrie planaire carrée [voir 4.1.3] aurait une grande affinité pour le nickel. A l'inverse, le site de RcnR, où les ions Ni^{2+} sont coordonnés par six ligands selon une géométrie octaédrique [voir 5.2.3], favoriserait les échanges de l'ion métallique en réponse aux fluctuations de la concentration intracellulaire [318]. Cette hypothèse doit toutefois encore être appuyée par d'autres exemples pour s'imposer. De plus, elles reposent sur certaines estimations d'affinité des protéines pour les métaux alors que ces données peuvent varier de manière extrêmement importante.

10.1.4 Etude de l'expression propre de *rcnB*

La régulation du système Rcn a été abordée dans le Chapitre 6 mais en s'appuyant principalement sur l'expression de l'opéron *rcnAB* dans son ensemble. Ceci se base sur le fait que, chez *E. coli*, les deux gènes forment un opéron et leur expression est donc synchronisée tout du moins au niveau transcriptionnel.

Mais il est possible que *rcnB* puisse s'exprimer indépendamment de *rcnA* et *rcnR* chez *E. coli*. La région intergénique entre *rcnA* et *rcnB* est relativement longue, supérieure à > 200 paires de bases, ce qui est compatible avec la présence d'une région régulatrice propre au gène *rcnB*. La construction d'un outil génétique permettant de rapporter l'expression du gène *rcnB* est actuellement en cours au laboratoire (*rcnB-yfp*) et permettra de mener cette étude. Cela devrait livrer certaines informations et principalement celle concernant une possible régulation par le cuivre même si aucune boîte CueR ou CusR n'est présente dans la région non traduite en amont du gène *rcnB*. De plus, une approche transcriptomique par qPCR est en cours de réalisation et permettra de quantifier directement la transcription du gène *rcnB* en réponse au cuivre.

L'extrême diversité du système Rcn dans le règne bactérien avec notamment les nombreux cas où le gène *rcnB* est isolé semble confirmer l'hypothèse d'une expression propre de ce gène dans la majorité des cas. Pour illustrer cette notion, la bactérie *Staphylococcus aureus* est dotée d'un système NikABCDE pour l'import de nickel codé par deux opérons distincts non adjacents, *nikA* et *nikBCDE*. Cette organisation originale est unique par rapport à tous les autres systèmes NikABCDE décrits à l'heure actuelle. Dans ce cas, les deux loci sont régulés de façon différentielle, le gène *nikA* étant induit en conditions acides alors que l'expression de *nikBCDE* reste stable [320]. Il est supposé que cette production de la protéine NikA en surabondance par rapport aux autres composants du transporteur permette de mieux capturer le nickel présent à l'état de traces dans l'environnement. Il serait enrichissant d'étudier l'expression de *rcnB* dans au moins un organisme où celui-ci est isolé. Les conditions d'expression de *rcnB* pourrait ainsi apporter des éléments d'information quant à sa fonction.

10.2 Structure et fonction de la protéine RcnB

10.2.1 Structure de RcnB

Les prédictions bio-informatiques ne permettent pas d'envisager une structure tridimensionnelle car aucune protéine apparentée n'est identifiée. Le travail de cristallographie initié pourrait permettre de résoudre la structure et livrer des informations importantes notamment sur le site de fixation des ions métalliques. La protéine RcnB est une petite protéine de 10 kDa extrêmement soluble même à forte concentration. Une étude structurale par RMN⁴ peut donc tout à fait être envisagée. Cette méthode, bien que de résolution plus faible que la diffraction des rayons X par des cristaux protéiques, présente l'avantage d'être beaucoup moins empirique car elle ne dépend pas de la formation de cristaux. Elle pourrait donc être privilégiée à l'avenir.

10.2.2 Interactions de RcnB avec les ions Ni²⁺ et Co²⁺

Les résultats présentés dans cette étude ont mis en évidence l'absence d'interactions directes entre la protéine RcnB et les ions Ni²⁺ et Co²⁺. Bien que toutes les approches utilisées aboutissent à cette même conclusion, il est possible d'envisager que les méthodes employées ici ne soient pas assez sensibles pour mettre à jour les complexes RcnB-Ni²⁺ et RcnB-Co²⁺. Les méthodes directes les plus couramment employées pour étudier les interactions protéine/métal sont la spectrométrie d'absorption des rayons X EXAFS⁵ et la microcalorimétrie. Ces techniques nécessitent un appareillage très lourd non disponible au laboratoire mais peuvent être envisagées dans le cadre d'une collaboration.

Cependant, ces méthodes, aussi efficaces soient-elles, permettent uniquement de détecter des interactions *in vitro* tout comme d'ailleurs les méthodes de spectroscopie ou d'utilisation d'isotope radioactif présentées dans cette étude. Il est possible que RcnB, suite à sa purification, ne possède pas exactement la même conformation *in vitro* que la protéine présente *in vivo* et c'est peut-être ce phénomène qui est à la source des résultats négatifs obtenus. Il est également envisageable que RcnB requiert une ou plusieurs protéines accessoires dans le périplasma pour reconnaître et fixer les ions Ni²⁺ et Co²⁺, protéines absentes dans les expériences effectuées.

4. Résonance Magnétique Nucléaire

5. Extended X-Ray Absorption Fine Structure

De même, la mise en évidence du BTC comme probable nickélophore pour NikA [46] permet d'envisager la nécessité d'un tel composé pour la fixation du nickel par RcnB, composé qui serait absent dans les conditions *in vitro* utilisées. Pour l'heure, des tests de fixation de nickel radioactif par RcnB en présence de ce nickélophore ont été effectués mais, comme pour NikA, aucun résultat positif n'a pu être obtenu. Il pourrait être utile à l'avenir de tester d'autres conditions pour confirmer ces données.

10.2.3 Rôle de RcnB au sein du système Rcn

Le système Rcn de *E. coli* n'appartient à aucune grande famille de systèmes d'efflux des métaux⁶ connue à ce jour et représente donc un sujet d'études particulièrement intéressant. Pour rappel, le système Rcn d'*E. coli* se compose d'une pompe d'efflux RcnA située dans la membrane interne et du composant périplasmique RcnB. Toutefois, l'absence de système apparenté ne permet aucune comparaison directe du mécanisme d'action avec ce qui a déjà été décrit.

La présence d'une protéine soluble dans le périplasma est fréquente pour les transporteurs ABC chargés de l'import des métaux dans le cytoplasme comme par exemple la protéine NikA du système Nik [42] ou encore FecB de FecABCDE [172]. Ces composants sont monomériques et solubles mais de taille supérieure à RcnB⁷. De plus, ils possèdent une très bonne affinité pour les ions métalliques transportés par le système d'où ils sont issus, le nickel pour Nik et le fer pour Fec. C'est d'ailleurs grâce à cette bonne affinité qu'ils peuvent exercer leur rôle de transporteur périplasmique des ions métalliques. Or, RcnB ne présente pas d'affinité pour les ions Ni²⁺ et Co²⁺ et ne peut donc pas transporter ces ions bien qu'une fixation par l'intermédiaire d'un nickélophore ne soit pas exclue.

La particularité de Rcn est de fonctionner avec deux éléments là où les autres systèmes d'efflux de métaux fonctionnent avec seulement une protéine⁸ ou trois⁹. Pour les systèmes d'efflux, la présence d'une protéine soluble dans le périplasma est rare. La protéine chaperon CusF du système RND CusCFBA est de ce type mais celle-ci possède de l'affinité pour les ions Cu⁺ qu'elle transfère au complexe CusCBA via la protéine périplasmique CusB. De plus, un mutant $\Delta cusF$ présente un phénotype de sensibilité au cuivre certes moins prononcé que pour un mutant $\Delta cusCFBA$ mais qui va dans le sens d'un rôle de protéine accessoire pour CusF favorisant l'efflux. Cette situation ne semble donc pas transposable aux connaissances acquises sur le nickel et la protéine RcnB.

Il existe un autre exemple intéressant représenté par le système *ncrABCY* de *Leptospirillum ferriphilum* qui confère la résistance au nickel. Ce système se compose de NcrA, protéine membranaire d'efflux de la famille MFS apparenté à NreB, NcrB, impliquée probablement dans la régulation du système et NcrC, protéine de la membrane interne de fonction inconnue. Le quatrième gène prédit du système, *ncrY*, coderait une petite protéine périplasmique de 16 kDa. Des expériences de complémentation d'une souche d'*E. coli* par différentes constructions codant tout ou partie de ce système ont été réalisées [321]. Le système complet *ncrABCY* apporte une résistance significative au nickel qui est encore augmentée lorsque seuls les gènes *ncrABC* sont présents. Le gène *ncrY* pourrait donc avoir un effet négatif sur la résistance au nickel par un mécanisme qui reste à élucider. Ce phénotype peut être comparé à ce qui est obtenu pour RcnB

6. RND, CDF ou ATPases de type P

7. respectivement 56 et 30 kDa pour NikA et FecB

8. la pompe d'efflux seule pour les familles CDF et ATPase de type P

9. la pompe d'efflux, une protéine d'ancrage et une porine pour les systèmes RND

puisqu'un mutant *rcnB* est plus résistant au nickel et au cobalt qu'une souche sauvage même si les deux séquences protéiques de RcnB et NcrY ne présentent aucune similarité. Il existe des gènes apparentés à *ncrY* chez d'autres organismes comme *Hafnia alvei* [322] et *Enterobacter cloacae* [323] mais leur mécanisme d'action n'est pas identifié.

La séquence de RcnB ne montre aucun motif caractéristique d'une fonction connue mais la protéine est conservée chez de nombreux organismes. Ceci plaide pour une fonction originale propre à cette protéine, inconnue jusqu'alors. Les gènes présentant un fort taux de similarité avec *rcnB* sont retrouvés dans un nombre moins élevé d'organismes que dans le cas de *rcnA* ou *rcnR*. Ainsi, la fonction propre à RcnB ne serait pas extrêmement répandue dans le monde bactérien et pourrait être apparue récemment. Dans la majorité des organismes où elle est présente, la protéine homologue de RcnB pourrait avoir un rôle isolé ou associé à une protéine autre que RcnA. Il serait intéressant d'étudier le rôle de RcnB dans ces autres organismes car une fonction autre que celle associée au système d'efflux est possible.

Ce travail a permis de montrer que l'expression de la protéine RcnB augmentait la quantité intracellulaire des ions Ni^{2+} et Co^{2+} . RcnB pourrait donc potentiellement interagir avec des protéines impliquées dans l'import de ces ions et en faciliter l'entrée dans le cytoplasme. L'étude présentée ici a cependant montré que RcnB fonctionnait indépendamment du transporteur du nickel Nik [voir 7.3.3] et cette hypothèse reposerait donc sur d'autres systèmes d'entrée non identifiés à l'heure actuelle. *rcnB* appartient à l'opéron *rcnAB* d'*E. coli* et est donc exprimé en présence d'ions Ni^{2+} et Co^{2+} . Un système d'entrée du métal auto-induit par les ions Ni^{2+} et Co^{2+} serait paradoxal puisqu'il générerait une toxicité pour les cellules. En fait, un rôle de régulation de l'efflux semble plus probable pour RcnB.

Une hypothèse serait une régulation au niveau transcriptionnel de l'expression du gène *rcnA*. La protéine RcnB étant localisée dans le périplasma, un effet direct de celle-ci sur la région promotrice de *rcnA* peut être exclue. En revanche, RcnB pourrait agir comme un senseur périplasmique pour assurer la transduction d'un signal provoquant la baisse de l'expression de *rcnA* comme cela a déjà été observé pour d'autres systèmes de type senseur-régulateur [324]. Mais en absence de RcnB, l'expression de la fusion *rcnA-gfp* est diminuée ce qui est en opposition avec une telle hypothèse.

Une autre hypothèse beaucoup plus intéressante peut être proposée. RcnB pourrait avoir un rôle régulateur de l'activité de l'autre composant du système, RcnA. Cette protéine est en effet produite en présence de nickel ou de cobalt et permet d'évacuer l'excès de ces métaux. Le gène *rcnA* seul, apporté dans les bactéries, permet une réduction drastique des quantités de métal. En revanche, lorsque l'opéron complet *rcnAB* est apporté, les bactéries accumulent plus de nickel qu'en présence de *rcnA* seul. Une explication possible serait que l'activité d'efflux de RcnA est fonctionnellement modulée par RcnB via une interaction directe entre les protéines. En absence de RcnB, l'efflux est plus efficace et la résistance est grandement augmentée. Cette hypothèse implique que le système RcnAB d'*E. coli* est tout à fait original puisqu'aucun exemple de ce type n'est connu. Elle pose la question de la synchronisation entre les deux protéines et notamment la capacité de RcnB à agir comme senseur des concentrations des ions Ni^{2+} et Co^{2+} . Cette hypothèse devra être éprouvée par des méthodes directes permettant de mettre en évidence les interactions RcnA-RcnB comme décrit plus loin.

Des données bioinformatiques issues de la base de données Pfam¹⁰ [325] pourraient appuyer

10. <http://pfam.sanger.ac.uk/>

cette hypothèse d'une régulation fonctionnelle de RcnA par RcnB. Ainsi les gènes apparentés à *rcnA* sont parfois retrouvés fusionnés avec d'autres gènes contenant le motif DUF1007 comme c'est le cas chez l' α -protéobactérie *Labrenzia aggregata* ou le motif DUF3299 chez la cyanobactérie *Synechococcus sp.* PCC 7335. Or, les protéines à motif DUF1007 et DUF3299 ne sont pas caractérisées mais sont annotées comme de petites protéines périplasmiques. Bien qu'aucune similarité de séquence primaire n'existe avec RcnB, cela montre que des gènes proches de *rcnA* peuvent être fusionnés avec d'autres gènes codant des protéines accessoires. Ces dernières pourraient jouer un rôle sur la régulation du transport comparable à celui de RcnB.

10.2.4 Autres fonctions possibles pour RcnB

Les résultats obtenus et présentés en fin du chapitre 8 et dans le chapitre 9 concernant le lien de RcnB avec l'homéostasie du cuivre suggèrent d'autres fonctions pour RcnB. En effet, ils montrent que la fixation des ions Cu^+ et Cu^{2+} par RcnB observée *in vitro* a des répercussions *in vivo*. Il ne s'agit donc pas d'une observation artefactuelle. L'effet de *rcnB* ne semble toutefois pas direct puisqu'un mutant de ce gène n'est pas affecté pour sa résistance au cuivre. En revanche, l'accumulation supérieure de cuivre chez le mutant complémenté par *rcnB* suggère que la protéine RcnB permet de stocker le cuivre. Comme la complémentation provoque une synthèse de RcnB beaucoup plus forte que la normale [voir Figure 51], l'accumulation de cuivre observée peut être seulement liée à cette surproduction de la protéine RcnB qui fixe le cuivre. Dans ce cas, la fonction réelle de la protéine en conditions physiologiques ne serait pas forcément le stockage de cuivre. La multiplicité des systèmes dédiés à l'homéostasie du cuivre chez *E. coli* rend difficile l'assignation du rôle exact de RcnB. Dans cette optique, l'étude de doubles mutants ΔcueO ΔrcnB et $\Delta\text{cusC, F, B et A}$ ΔrcnB apporterait des résultats intéressants. Par ailleurs, des tests de sensibilité du mutant ΔrcnB ont été effectués pour la souche BW25113 et dans ce contexte génétique, la résistance au cuivre des mutants ΔrcnB est diminuée. D'autre part, pour étudier l'effet de RcnB sur la résistance au cuivre, il serait intéressant d'effectuer des études en présence de cuivre et de nickel ou de cobalt. L'induction du gène *rcnB* par les ions Ni^{2+} et Co^{2+} pourrait en effet accentuer le phénotype de résistance au cuivre.

Pour avancer sur cette question du rôle de RcnB dans l'homéostasie du cuivre, l'affinité de la protéine pour le métal doit être déterminée plus finement. Un moyen d'estimer le K_d du complexe RcnB-Cu est de mesurer l'affinité en présence de compétiteurs. Une expérience préliminaire a été effectuée dans ce sens afin d'étudier la formation du complexe RcnB- Cu^+ en présence de BCS¹¹ par spectroscopie UV-visible. Le BCS fixe les ions Cu^+ avec une très bonne affinité, le K_d étant de $\approx 10^{-19}$ M [326] et le complexe BCS- Cu^+ possède une forte bande d'absorption à 483 nm avec $\epsilon_{483 \text{ nm}} = 13300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [327]. En suivant la décroissance de l'intensité du signal à 483 nm lors de l'ajout de concentrations croissantes de RcnB, il est possible d'avoir une idée de l'affinité de la protéine pour les ions Cu^+ . Cette méthode a déjà été efficacement utilisée pour la protéine CopZ et a permis d'estimer la constante d'affinité K_d à $\approx 10^{-18}$ M [327]. Cette affinité est extrêmement forte mais la protéine CopZ est cytoplasmique et les ions Cu^+ sont quasi-absents du cytoplasme. RcnB est localisée dans le périplasma où le cuivre est supposé être en quantité plus importante. Il est donc très probable que l'affinité soit beaucoup plus faible. En effet, les résultats de l'expérience montrent que la protéine RcnB ne semble pas entrer efficacement en

11. Bathocuproïne DiSulfonate

compétition avec le BCS¹². D'autres compétiteurs ont été testés, l'EDTA et la glycine fixant le cuivre avec respectivement un K_d de 10^{-19} [326] et 10^{-14} M [328] et corroborent les résultats obtenus avec le BCS. Cela laisse penser que l'affinité de RcnB pour le cuivre correspond à un K_d supérieur à 10^{-14} M, en accord avec les données de spectrofluorescence [voir 8.6.3].

Chez *E. coli*, la protéine CusF est soluble dans le périplasme et fixe les ions Cu^+ avec une affinité de 10^{-6} M [voir 3.3.4]. Une affinité du même ordre de grandeur pourrait être envisagé pour RcnB. Le site de fixation des ions Cu^+ de CusF met en jeu, en plus d'une histidine isolée dans la séquence, deux méthionines et un tryptophane arrangés selon le motif **WXXMXM**. Or, la séquence de RcnB contient un motif **W₈₃XXM₈₆** dont le tryptophane est strictement conservé. La méthionine est beaucoup moins conservée et est retrouvée dans environ 30 % des organismes. Ces résidus pourraient être impliqués dans l'interaction avec l'ion cuivre. Toutefois, les propriétés spectroscopiques de RcnB et CusF sont différentes puisque RcnB n'est pas une protéine à cuivre rose mais bleue ce qui montre que la coordination du métal diffère entre les deux protéines. Une manipulation de mutagenèse dirigée pourrait être utilisée pour déterminer si les résidus W₈₃ et M₈₆ sont nécessaires à la fixation de métal par RcnB.

Un rôle de métallochaperon à cuivre peut être envisagé pour RcnB. Outre CusF, PcoC et PcoE de *E. coli*, d'autres exemples sont connus dans le monde bactérien. Ainsi, la protéine CopK de *Cupriavidus metallidurans* CH34 est décrite comme telle. Le gène *copK* fait partie d'un locus *cop* composé de dix-neuf gènes impliqués dans la résistance au cuivre et son expression est induite en présence de cuivre. CopK est une petite protéine de 73 acides aminés sous forme maturée, riche en résidus méthionines, histidines et glutamates et qui comme RcnB ne contient pas de cystéine [329]. CopK se présente sous forme d'un dimère [330]. CopK, tout comme CopC de *P. syringae*, a été décrite comme fixant les ions cuivreux et cuivriques dans deux sites différents, avec une affinité meilleure pour les ions Cu^+ ¹³. La fixation des deux types d'ions semble toutefois coopérative puisque la fixation des ions Cu^+ augmente sensiblement l'affinité pour les ions Cu^{2+} [330]. La coordination de l'ion Cu^+ n'est pas exactement décrite mais il semble qu'elle n'implique que des résidus méthionines, trois ou quatre selon les études [330, 331]. Pour l'heure, seule la caractérisation biochimique de la protéine au travers de la compréhension de la fixation du cuivre est envisagée. La fonction de CopK reste inconnue. Un simple rôle de stockage du cuivre pour améliorer la résistance des bactéries est possible mais il est plus vraisemblable que CopK interagisse avec des partenaires pour assurer sa fonction. Comme pour RcnB, la compréhension du mécanisme d'action passe par l'identification et la caractérisation de ses partenaires.

L'un des aspects les plus intrigants de *rcnB* est son interconnexion avec les systèmes de résistance au cuivre. En plus de la complémentation fonctionnelle du mutant *cueO*, l'apport de *rcnB* accentue la sensibilité au cuivre du mutant *cusCFBA*. Ceci peut être mis en relation avec les données de l'ICP qui montrent que la surproduction de RcnB augmente la quantité de cuivre dans les cellules. Ainsi, sans le système *cusCFBA* chargé de réduire ce niveau, les bactéries sont plus sensibles. La résistance du mutant *copA* n'est quant à elle pas affectée par l'apport de *rcnB*. Or, CopA est dédié à l'efflux des ions Cu^+ cytoplasmiques. RcnB est donc uniquement connecté avec les systèmes *cus* et *cueO* impliqués dans la détoxification du périplasme. Il est probable que RcnB agisse sur la quantité de cuivre périplasmique.

Le phénotype le plus marqué est observé pour le mutant *cueO* car l'apport de *rcnB* peut pallier la sensibilité au cuivre d'un mutant *cueO* en restaurant l'activité oxydase. Tous ces éléments

12. données non présentées

13. $K_d \text{ Cu}^+ \approx 10^{-11} \text{ M} < K_d \text{ Cu}^{2+} \approx 10^{-5} \text{ M}$

plaident pour une implication indirecte de RcnB dans le phénomène de résistance au cuivre. Un cas semblable a été rapporté chez *Salmonella enterica*. Un plasmide portant le gène *cueP*, inducible par le cuivre, a été décrit comme étant capable d'améliorer la résistance au cuivre d'un mutant *cuiD*¹⁴ bien qu'une délétion de *cueP* seul n'atténue pas la résistance au cuivre des bactéries [332]. Il a également été montré que les homologues du gène *cueP* sont présents dans de nombreuses bactéries à gram négatif comme *Yersinia pestis* ou *Erwinia carotovora* par exemple. Une corrélation existe entre *cueP* et le locus *cus*, la présence de l'un étant systématiquement liée à l'absence de l'autre [332]. Le mode d'action de CueP est inconnu mais il a été montré qu'elle constitue la protéine périplasmique fixant le cuivre la plus abondante lors d'un stress causé par le cuivre [333]. Un rôle de stockage est donc envisagé. Chez *E. coli*, *cueP* est absent mais *rcnB* pourrait avoir un rôle apparenté.

Le phénomène de complémentation de *cueO* par *rcnB* peut également laisser penser que RcnB fonctionne comme une oxydase à cuivre et pourrait donc appartenir à la famille des cupredoxines. Cette famille regroupe des petites protéines entre 10 et 14 kDa, liant un atome de cuivre dans un site I qui leur donne une couleur bleue. Il y a peu de conservation au niveau de la séquence primaire des membres de cette famille mais en ce qui concerne les structures secondaires, ces protéines sont majoritairement composées de brins β . RcnB possède ces caractéristiques à ceci près que le cuivre ne peut pas être coordonné dans un site I car celui-ci se compose de deux histidines et une cystéine. Toutefois, la coloration bleue étant dûe à la liaison Cu-S, RcnB doit posséder au moins un résidu méthionine impliqué dans la fixation du cuivre.

Au niveau fonctionnel, les cupredoxines sont toutes impliquées dans un processus d'oxydo-réduction [334]. Elles permettent d'effectuer des transferts d'électrons entre deux molécules dans la cellule. La diversité des partenaires extrêmement importante et la complexité des cascades d'oxydo-réduction dans la cellule compliquent énormément la caractérisation fonctionnelle des cupredoxines. De plus, la spécificité des donneurs ou accepteurs d'électrons n'est pas très élevée pour de nombreuses cupredoxines. En fait, il est possible que d'une part, plusieurs donneurs et accepteurs interagissent avec la même cupredoxine et que d'autre part, la cupredoxine interagisse avec d'autres protéines auxiliaires [334].

Il existe un exemple de transporteur à métaux dans lequel une cupredoxine est impliquée. Il s'agit du système EfeUOB d'import des ions Fe^{2+} . La cupredoxine EfeO oxyderait les ions Fe^{2+} en Fe^{3+} pour permettre leur prise en charge par la pompe membranaire EfeU [335]. Par analogie, une fonction possible de RcnB pourrait être de modifier l'état d'oxydo-réduction des ions Ni^{2+} et Co^{2+} . Bien que les changements du nombre d'oxydation soient moins courants pour le nickel et le cobalt que pour le fer et le cuivre, certains exemples sont connus. Ainsi, le nickel peut exister sous les formes Ni(II) ou Ni(III) lorsqu'il est complexé à certains peptides [336]. De plus, certaines enzymes comme *sodN* de *Streptomyces* possèdent un ion Ni(III) [139]. Dans ce cas, le changement d'état d'oxydo-réduction des ions Ni^{2+} et Co^{2+} influencerait leur quantité intracellulaire. Il paraît néanmoins prématuré de vouloir assigner ce type de fonction d'oxydo-réductase à RcnB et la détermination de son rôle exact devra forcément passer par la mise en évidence de ses partenaires moléculaires. Une autre hypothèse peut également être envisagée. En effet, il est possible que RcnB soit dépourvue d'activité oxydase *in vivo*. Dans l'expérience de dosage de l'activité oxydase, c'est uniquement l'oxydation du substrat qui est suivie. Or, les ions Cu^{2+} seuls sont capables de l'oxyder. Il est donc possible que la protéine RcnB purifiée

14. *cuiD* est l'orthologue du gène *cueO* chez *Salmonella enterica*

contienne du cuivre même si ce métal n'a été ajouté à aucun moment au cours du processus de purification. Dans ce cas, ce serait l'ion Cu^{2+} fixé par RcnB qui oxyderait le substrat mais ceci ne reflèterait peut-être pas la fonction biologique de la protéine.

La protéine CueO possède cinq atomes de cuivre et ce sont quatre de ces atomes qui par leur passage de l'état cuivrique à cuivreux permettent d'oxyder le substrat. Pour l'heure, toutes les protéines à cuivre du périplasma bactérien sont impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction ou dans l'homéostasie du cuivre [24, 149, 337]. Mais il n'est pas exclu que RcnB constitue le premier membre d'une nouvelle famille de protéines de fonction originale.

10.3 Identification des partenaires de RcnB

Pour achever la compréhension de la fonction de la protéine RcnB, ses protéines partenaires doivent être identifiées. Le candidat le plus probable pour une interaction protéine-protéine est bien évidemment la protéine RcnA puisque les deux gènes *rcnA* et *rcnB* font partie d'un système unique codé par le même opéron et la présence de RcnB semble réguler le fonctionnement de RcnA.

10.3.1 Interactions entre RcnA et RcnB

Dans l'optique de l'étude des interactions entre RcnB et RcnA, la surproduction de RcnA dans un système acellulaire a été réalisée¹⁵ grâce au kit RTS 100 (Roche). En effet, les précédents essais de surproduction *in vivo* initiés au laboratoire n'ont pas été concluants en raison du caractère très hydrophobe de RcnA et de sa localisation membranaire. La surproduction *in vitro* semble donc une éventualité prometteuse. Les résultats préliminaires sont relativement encourageants même si la surproduction nécessite encore d'être mise au point pour être réellement efficace. Pour l'heure, la quantité de protéine produite est encore trop faible pour envisager une purification de RcnA et le développement d'anticorps polyclonaux dirigés contre cette protéine. Mais des essais de far western blot ont pu néanmoins être envisagés. Ces expériences consistent à utiliser une protéine purifiée, ici RcnB, comme équivalent d'un anticorps primaire dans un western blot classique. Ainsi, dans le cas d'une interaction, RcnB peut reconnaître et se fixer à RcnA. Ensuite, l'immunodétection de RcnB est réalisée. Cela permet de visualiser la bande correspondante à RcnA. Ces manipulations sont encore en phase de mise au point mais pourront être affinées à l'avenir.

10.3.2 Autres partenaires de RcnB

Bien que RcnA soit le partenaire le plus probable, d'autres partenaires sont envisageables. Ainsi, des protéines des membranes internes ou externes pourraient être impliquées comme par exemple les protéines du système TonB/ExbB/ExbD fournissant l'énergie nécessaire à un système de transport du nickel chez *H. pylori* [36]. Etant donné que RcnB possède une fonction originale, d'autres candidats possibles seraient des porines de la membrane externe ou encore des partenaires solubles dans le périplasma, non décrits à l'heure actuelle. Le développement d'anticorps anti-RcnB permet d'envisager des manipulations de pontage moléculaire et de « pull-down » afin d'identifier les partenaires moléculaires de RcnB.

15. données non présentées

10.3.3 Structure et fonction de la protéine RcnA

Les études présentées ici sont focalisées sur RcnB car il semble que cette protéine apporte la spécificité au système Rcn d'*E. coli*. Mais il serait également intéressant de caractériser la protéine RcnA. Celle-ci ne ressemble à aucune protéine d'efflux connue puisqu'elle se compose de six hélices α transmembranaires. Ce faible nombre laisse supposer que l'état d'oligomérisation *in vivo* n'est probablement pas monomérique. De plus, aucun motif de séquence connu n'est présent dans la protéine ce qui renforce son originalité. La boucle riche en résidus histidines ayant permis la découverte de cette protéine est intrigante [voir 5.1]. Cet acide aminé est bien connu pour sa forte affinité pour les ions Ni^{2+} et Co^{2+} et cette boucle pourrait avoir un rôle dans la reconnaissance et la fixation des ions métalliques. Un gène codant pour une protéine RcnA tronquée ne possédant pas cette boucle a été construit. Des essais portant sur la cinétique d'accumulation d'ions ^{63}Ni radioactifs montrent que cette construction est fonctionnelle et réduit drastiquement la quantité de métal accumulée par les bactéries de manière équivalente à la protéine RcnA sauvage¹⁶. Le rôle exact de cette boucle reste donc à déterminer. Une hypothèse est qu'elle permettrait l'interaction avec RcnB pour la régulation fonctionnelle de RcnA et cette hypothèse pourra être testée dans le cadre de l'étude des interactions RcnA-RcnB.

10.4 Rôle de RcnB dans l'agrégation des bactéries

Un autre phénomène a été mis en évidence. Celui-ci montre un lien entre RcnB et l'agrégation des bactéries. En effet, la souche délétée de *rcnB* a une tendance à l'agrégation plus marquée que la souche sauvage et la complémentation par le gène sauvage restaure bien un phénotype normal [Figure 68 A.]. Cette observation peut sembler *a priori* ne posséder aucun lien avec l'homéostasie des ions Ni^{2+} et Co^{2+} . Une étude du laboratoire a néanmoins démontré que des concentrations subinhibitrices de nickel étaient capables d'induire la formation de biofilms en induisant la production des curli [338]. Toutefois, la quantité de métal utilisée pour engendrer le biofilm induit très faiblement l'expression de l'opéron *rcnAB*. Il est donc peu probable que le système Rcn soit directement impliqué dans ce phénomène de génération des biofilms.

Un phénotype d'agrégation similaire a déjà été rapporté précédemment pour le mutant *cueO* [339]. Dans cette étude, une analyse transcriptomique avait permis de montrer que l'expression d'une quinzaine de gènes impliqués dans la synthèse des flagelles permettant la mobilité était diminuée tandis que l'expression de gènes associés à l'agrégation cellulaire était stimulée. Parmi ces derniers, l'expression du gène *flu* était décuplée. Ce gène code pour l'adhésine Ag43 et a déjà été décrit comme favorisant l'agrégation des bactéries et la formation des biofilms [340, 341]. Chez un mutant *cueO*, le promoteur du gène *flu* est méthylé ce qui aboutit à une expression constitutive de la protéine Ag43 et donc au phénotype d'agrégation [339]. L'origine de cette modification du profil de méthylation est inconnue. Comme dans le cas de la résistance au cuivre, la surexpression de *rcnB* chez un mutant *cueO* permet de restaurer un phénotype sauvage et donc de supprimer l'agrégation [Figure 68 B.]. Toutefois, rien ne plaide en faveur d'un mécanisme commun pour ce phénotype chez les mutants *rcnB* et *cueO*.

Ces observations montrent clairement un lien entre l'homéostasie du nickel et du cuivre et l'agrégation des bactéries. Dans cette optique, le rôle de la protéine RcnB doit être précisé en se

16. données non présentées

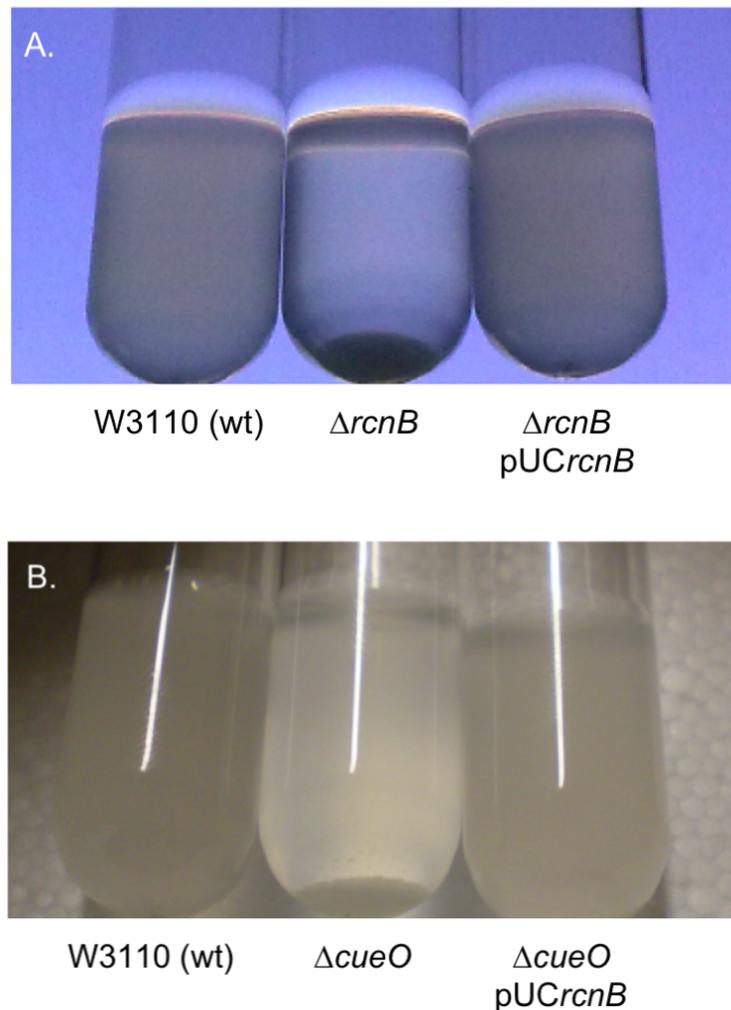


Figure 68 – Influence de la mutation de *rcnB* sur l'agrégation des bactéries

Effet des gènes *rcnB* **A.** et *cueO* **B.** Les cultures sont effectuées en milieu riche à 37°C en aérobiose jusqu'en phase stationnaire de croissance. Puis, les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues dans un volume équivalent de tampon phosphate. Les données présentées correspondent à la situation après 3 h à température ambiante sans agitation.

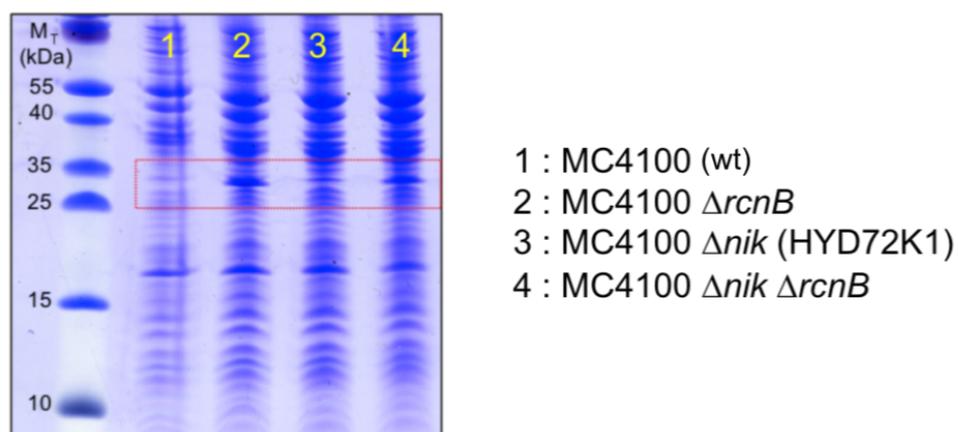


Figure 69 – Induction de l'expression d'une protéine inconnue chez le mutant *rcnB*

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB MoSe en conditions anaérobies à 37°C. Les cellules sont récoltées par centrifugation puis resuspendues dans du tampon de dépôt et une quantité équivalente de cellules sont déposées sur gel Tris-tricine 15 %. Le cadre rouge permet de visualiser l'apparition d'une bande à ≈ 30 kDa pour les souches délétées du gène *rcnB*.

basant par exemple sur les données concernant CueO. Des données transcriptomiques seraient ainsi intéressantes pour comprendre cet aspect de la fonction de RcnB.

10.5 Identification d'une protéine induite chez le mutant *rcnB*

Une observation intéressante a été faite et pourrait être mise en relation avec les partenaires de RcnB. Les extraits protéiques totaux de différentes souches mutées sur les systèmes Nik ou Rcn ont été préparées, initialement pour étudier l'impact sur l'activité hydrogénase [Figure 45]. Ces extraits ont été séparés sur gel Tris-tricine 15 % [Figure 69]. Les profils de séparation montrent distinctement l'apparition d'une bande correspondant à une taille de ≈ 30 kDa chez les souches délétées du gène *rcnB*. L'absence de RcnB provoque donc l'induction de l'expression de cette protéine. Des gels de dimensions plus importantes ont été réalisés et la bande a été découpée puis analysée par la plateforme protéomique de l'IMM¹⁷ à Marseille. La protéine a ainsi été identifiée comme GatY, la tagatose 1,6-bisphosphate aldolase. Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme du galactose et semble donc *a priori* éloignée de l'homéostasie du nickel et du cobalt. Deux interprétations sont donc possibles. Tout d'abord, la protéine induite peut effectivement être GatY et le lien avec le système Rcn doit être clarifié. De façon intéressante, des études transcriptomiques ont montrées que l'expression des gènes *gatC* et *gatD*, organisés en opéron avec *gatY* chez *E. coli*, est fortement réprimée chez un mutant *cueO* [339]. Cette observation est opposée à celle obtenue pour le mutant *rcnB* et n'est pas comprise mais elle montre un lien entre agrégation cellulaire et l'opéron *gat*. Cependant, l'autre explication possible est que la protéine induite n'est pas GatY mais une ou plusieurs autres inconnues. En effet, dans les conditions utilisées, c'est à dire avec un gel monodimensionnel de taille moyenne¹⁸, il est communément admis qu'une seule bande peut contenir de plusieurs unités à plusieurs dizaines de protéines. Il est donc tout à fait possible que la protéine séquencée ne soit pas celle induite effectivement en absence de *rcnB*. Pour vérifier cela, la mise en place d'outils protéomiques mieux adaptés comme les gels bidimensionnels pourrait s'avérer nécessaire. Une approche transcriptomique pourra également être effectuée pour comparer les niveaux d'expression génétique entre souche sauvage et délétée de *rcnB* en réponse au nickel et au cobalt.

10.6 Application pratique

Pour conclure ce manuscrit, une application du système Rcn en tant que biosenseur du nickel et du cobalt est proposée. En effet, la présence de composés métalliques dans les sols et les eaux est un phénomène naturel depuis l'origine de la planète. Néanmoins, les activités humaines ont considérablement modifié ces équilibres et particulièrement depuis les 150 dernières années. La toxicité des métaux telle qu'elle a été présentée dans le Chapitre 3 peut en partie être généralisée pour tous les organismes vivants et ce bouleversement présente donc des risques à grande échelle. Pour apporter des réponses adaptées à cette problématique de la contamination métallique de l'environnement, il est important de pouvoir quantifier la pollution. Pour l'heure, des produits existent sur le marché et font bien souvent appel à des techniques issues du génie chimique. Bien que leur efficacité soit indéniable, ces produits commerciaux¹⁹ peuvent représenter un danger en

17. Institut de Microbiologie de la Méditerranée

18. 10×15 cm

19. comme le PAR (2,4-PyridylAzoResorcinol) pour la quantification du nickel par exemple

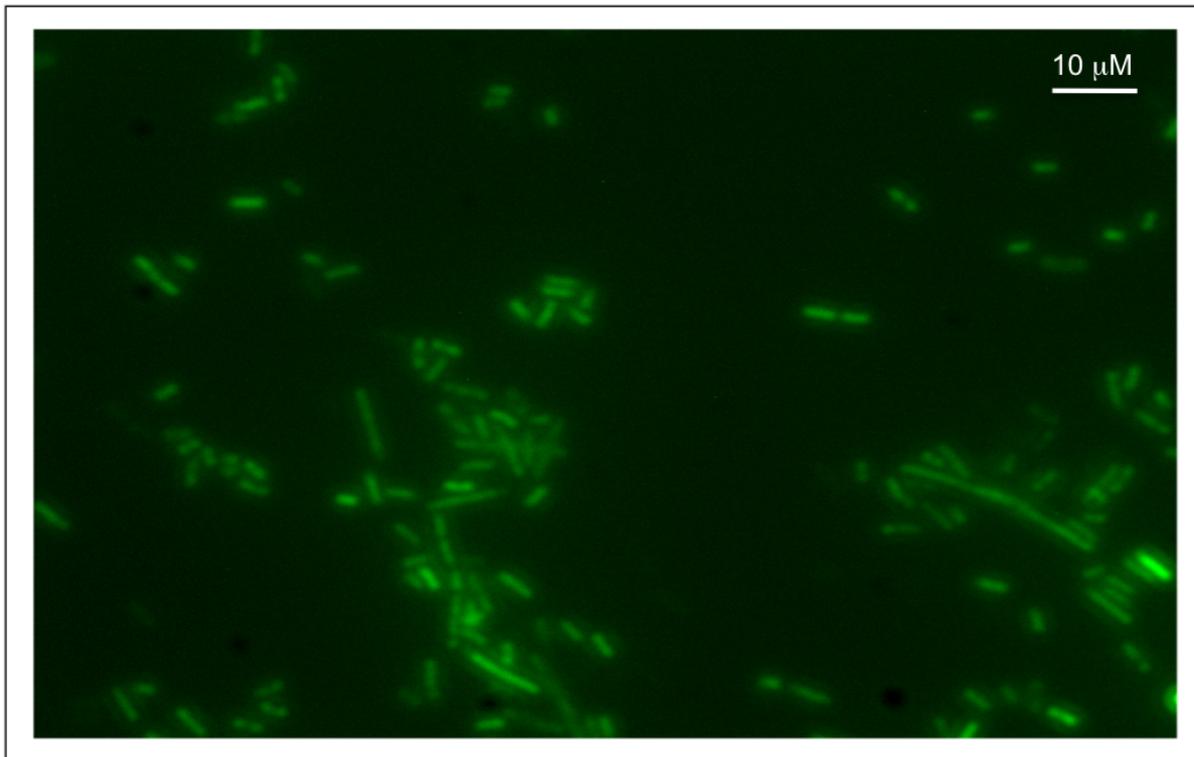


Figure 70 – Vue microscopique de bactéries exprimant la fusion *rcnA* :: *gfp*

Les cultures sont effectuées dans du milieu LB en conditions aérobies à 37°C. La fluorescence est mesurée à $\lambda_{510 \text{ nm}}$ après excitation à $\lambda_{490 \text{ nm}}$. Concentration de métal utilisée : $\text{Ni}^{2+} = 500 \mu\text{M}$.

eux-mêmes car leur impact sur l'environnement est méconnu. De plus, ces produits nécessitent bien souvent un appareillage lourd²⁰ mal adapté à des contraintes de terrain. L'utilisation de systèmes biologiques peut permettre de s'affranchir de certains inconvénients. Dans le chapitre 6, les constructions *rcnA-gfp* et *rcnA-uidA* sont présentées. Celles-ci permettent de générer un signal biologique dont l'intensité varie en fonction de la quantité d'ions Ni²⁺ ou Co²⁺ biodisponibles et donc potentiellement toxiques. Ce système est rapide, fiable, facile à mettre en place et les données générées peuvent être aisément analysées. Pour illustrer cela, des bactéries porteuses de la construction *rcnA-gfp* ayant été mises en contact quelques heures avec du nickel sont observées après excitation à $\lambda_{490\text{ nm}}$ et présentées sur la Figure 70. Cette application basée sur le système Rcn demande encore une certaine optimisation pour, par exemple, réduire le temps de réponse mais pourrait se révéler être une excellente alternative aux moyens de détection existants.

20. comme l'ICP par exemple

Quatrième partie

Matériel et Méthodes

Tableau 13 – Souches bactériennes utilisées pour cette étude

souches	noms	génotypes	références
BL21		F- <i>ompTgal[dcn][lon] hsdS_B(r_B-m_B-)</i> (DE3)	[342]
DH5 α		F- <i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17(r_k-m_k+)</i> <i>recA1 relA1 supE44 thi-1</i> Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>), ϕ 80 <i>lacZDM15</i>	[343]
W3110		F- <i>mcrA</i> <i>mcrB</i> IN (<i>rrnD-rrnE</i>)1 λ -	[344]
W3110 Δ <i>rcnA</i>	WRCA1	W3110, <i>rcnA</i> : : <i>cm^r</i>	ce travail
W3110 Δ <i>rcnB</i>	WRCB1	W3110, <i>rcnB</i> : : <i>cm^r</i>	ce travail
WYO	WYOM1	W3110, <i>rcnA</i> : : <i>uidAkan^r</i>	ce travail
W3110 Δ <i>cueO</i>		W3110, <i>cueO</i> : : <i>cm^r</i>	[316]
W3110 Δ <i>cus</i>		W3110, <i>cusCFBA</i> : : <i>cm^r</i>	[316]
W3110 Δ <i>copA</i>		W3110, <i>copA</i> : : <i>kan^r</i>	[316]
MC4100		F- <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>) U169 <i>rpsL150 relA1 deoC1 ptsF25 rbsR flbB5301</i>	[345]
MC4100 Δ <i>rcnB</i>	MCRB1	MC4100, <i>rcnB</i> : : <i>cm^r</i>	ce travail
MCYO	ARY023	MC4100, <i>rcnA</i> : : <i>uidAkan^r</i>	[233]
HYD720		MC4100, Δ (<i>nikA-R</i>)	[39]
HYD72K1		MC4100, <i>nikA</i> : : <i>MudI (Kan^r, lac)</i>	[40]
HYD72K1 Δ <i>rcnB</i>	HYRB1	HYD72K1, <i>rcnB</i> : : <i>cm^r</i>	ce travail
NM522		<i>supE thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>hsdMS mcrB</i>)5 (<i>F'proAB+ lacI^q lacZ DM15</i>) (<i>r_k- m_k- McrBC-</i>)	[346]
NM522 Δ <i>rcnA</i>	NRCA1	NM522, <i>rcnA</i> : : <i>cm^r</i>	laboratoire
NM522 Δ <i>rcnB</i>	NRCB1	NM522, <i>rcnB</i> : : <i>cm^r</i>	laboratoire
NMYO	ARY024	NM522, <i>rcnA</i> : : <i>uidAkan^r</i>	laboratoire
NM522 Δ <i>rcnR</i>	DB150	NM522, <i>rcnR</i> : : <i>cm^r</i>	laboratoire

Tableau 14 – Plasmides utilisés pour cette étude

plasmides	noms	génotypes	références
pUC18		<i>lac amp^r</i>	[347]
pUC <i>rcnA</i>	pAR020	pUC18, <i>rcnA</i>	[233]
pUC <i>rcnB</i>	pUCRCB	pUC18, <i>rcnB</i>	laboratoire
pUC <i>rcnAB</i>	pAR123	pUC18, <i>rcnRAB</i>	laboratoire
pET30		pT7, <i>kan^r</i>	Novagen
pET <i>rcnB</i>	pETRCB	pET30, <i>rcnB</i>	laboratoire
pPROBE-OT		pBBR1 replicon, gène rapporteur <i>gfp, spc^r</i>	[348]
prcnA-gfp	p157	pPROBE-OT, <i>gfp</i> sous le contrôle du promoteur <i>rcnA</i>	[338]
pGEM-T		<i>lac amp^r</i> , pT7, pSP6	Promega
pP _{<i>rcnAB</i>}		pGEM-T, promoteur <i>rcnAB</i>	laboratoire

Chapitre 11

Matériels et Méthodes

11.1 Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont décrits dans les tableaux 13 et 14. Toutes les souches dérivent de *E. coli* K12.

11.1.1 Composition des milieux de culture

Milieu riche LB

NaCl 10 g.l⁻¹; bactotryptone 10 g.l⁻¹; extrait de levure 5 g.l⁻¹; pH 7. Ce milieu constitue un milieu nutritif complet utilisé en routine pour la croissance des bactéries. Il peut être utilisé sous forme solide (GL).

Milieu minimum M63

KH₂PO₄ 13,6 g.l⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 2 g.l⁻¹; MgSO₄ 0,2 g.l⁻¹; FeSO₄ 0,5 mg.l⁻¹; pH 7,2. Ce milieu sert de base minimale et doit être complété par du glucose (2 g.l⁻¹) qui sert de source de carbone. Il peut être utilisé sous forme solide (G).

11.1.2 Préparation des milieux

Les milieux complets (LB) et minimum (M63) employés sont préparés selon Miller [349] sous forme liquide ou solide après addition de 12 g.l⁻¹ d'agar. Les antibiotiques sont ajoutés s'il y a lieu aux concentrations finales suivantes : ampicilline (100 µg.ml⁻¹), kanamycine (50 µg.ml⁻¹), chloramphénicol (20 µg.ml⁻¹) ou spectinomycine (50 µg.ml⁻¹). L'influence des métaux est testée par dilution d'une solution mère de 50 mM de NiSO₄, CuSO₄, CoCl₂, ZnSO₄ ou CdCl₂. Le milieu LB MoSe obtenu par supplémentation de molybdate de sodium 2 mM et de sélénite de sodium 2 mM est utilisé pour la croissance anaérobie.

11.1.3 Conditions de culture et conservation des souches bactériennes

Les cultures sont effectuées en général à 37°C en milieu LB. Pour assurer une croissance en bonne aération, la culture est réalisée en milieu liquide sous agitation à 130 rpm en erlenmeyer rempli au 1/5^{ème} alors que les cultures anaérobies sont réalisées sans agitation dans des tubes de 25 ml remplis jusqu'au col. Pour les croissances sur milieu solide, les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C en aérobiose ou bien disposées en jarre sous atmosphère de gaz carbonique, d'hydrogène et d'azote engendrée par une enveloppe GasPack¹ pour obtenir des conditions anaérobies. L'ensemencement s'effectue à 1 % à partir d'une préculture cultivée dans des conditions analogues à celles de la culture finale arrivée en phase stationnaire de croissance. Le nombre de bactéries est estimé par mesure de la turbidité, exprimée en unité de densité optique à 600 nm (D.O_{600nm}), 1 unité de D.O_{600nm} correspond à 4,5.10⁸ bactéries par ml ou 0,37 mg de PSB² par ml. Les cellules bactériennes sont récoltées par centrifugation (5 min, 8000 rpm) avant d'être reprises dans un tampon adapté pour être utilisées. Les souches sont conservées à +4°C sur boîtes de Pétri ou à -20°C dans leur milieu de culture additionné de DMSO 1,4 M.

1. Becton, Dickinson et Cie
2. Poids Sec Bactérien

11.1.4 Détermination du seuil de toxicité des métaux pour les différentes souches bactériennes

Croissance sur milieu solide - Méthode des gouttes

Les cultures liquides sont effectuées comme précédemment décrit en absence de métaux jusqu'en phase stationnaire de croissance. La culture est ensuite diluée en cascades de 10^{-1} à 10^{-7} dans du milieu M63. $5 \mu\text{l}$ des dilutions contenant de 10^2 à 10^7 bactéries sont déposées sur boîte de milieu minimum supplémenté ou non par différentes quantités de métaux. Après 24 à 48 h d'incubation à 37°C en aérobiose ou 48 à 72 h en anaérobiose, les boîtes peuvent être lues.

Croissance sur milieu solide - Méthode du halo d'inhibition

Les cultures liquides sont effectuées comme précédemment décrit en absence de métaux jusqu'en phase stationnaire de croissance. La culture est diluée au $1/10^{\text{ème}}$ dans du milieu minimum puis un aliquot de $100 \mu\text{l}$ est étalé sur une boîte de milieu minimum gélosé. Un microdisque de coton est ensuite placé sur la boîte puis imprégné par une solution de NiSO_4 , CoCl_2 ou CuSO_4 . Après 24 à 48 h d'incubation à 37°C en aérobiose ou 48 à 72 h en anaérobiose, les boîtes peuvent être lues.

Croissance en milieu liquide

Les cultures sont réalisées en milieu minimum ou LB supplémenté par des concentrations croissantes de métaux. La D.O_{600nm} est lue après 16 h de croissance à 37°C avec agitation pour estimer la croissance bactérienne des différentes souches.

11.2 Méthodes génétiques et de biologie moléculaire

11.2.1 Extraction d'ADN plasmidique

En petite quantité (miniprép)

La méthode utilisée est celle de l'extraction alcaline [350]. Les cellules provenant d'un aliquot de 1,5 ml d'une culture de la nuitensemencée avec les bactéries portant les plasmides à extraire, sont récoltées par centrifugation. Le culot est repris par $100 \mu\text{l}$ de solution A (Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucose 50 mM) auxquels sont ajoutés $200 \mu\text{l}$ de solution B (NaOH 0,2 N, SDS 1 %) afin de lyser les bactéries. Après 5 min à température ambiante, $150 \mu\text{l}$ de solution C (acétate de sodium 3 M pH 4,8) sont ajoutés et le mélange est incubé sur la glace 10 min afin de précipiter l'ADN chromosomique et les ARN de grande taille. L'ADN plasmidique, soluble, est récupéré dans le surnageant de centrifugation (13 000 g, 10 min) et précipité à l'éthanol 100 %. Le culot séché après lavage à l'éthanol 70 % est repris dans 30 à $50 \mu\text{l}$ d'eau + RNase (20 mg.ml^{-1}).

En grande quantité (midiprép)

Le protocole suivi est celui fourni par le fabricant³. Les différences majeures résident dans l'utilisation d'une solution A contenant de la RNase (100 mg.ml^{-1}) et d'une résine échangeuse d'anions permettant d'obtenir de l'ADN de meilleure qualité et pureté. Le volume de départ de la culture est également plus important ce qui permet d'obtenir de grosses quantités de plasmides.

11.2.2 Séparation par électrophorèse en gel d'agarose

Les différents fragments d'ADN, mélangés à une solution de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %, EDTA 25 mM, glycérol 50 %), sont séparés en fonction de leur masse moléculaire et de leur degré d'enroulement dans un gel d'agarose en routine à 1 % préparé en tampon TBE (Tris-Borate 90 mM, EDTA 2 mM pH 7,9) contenant du bromure d'éthidium. Un marqueur de taille⁴ est mis à migrer en parallèle aux échantillons. La séparation s'effectue en tampon TBE sous l'influence d'un champ électrique de 5 V.cm^{-1} , puis la visualisation se fait sous UV à 312 nm, l'agent intercalant BET⁵ provoquant la fluorescence des bandes d'ADN. Une photographie du gel est prise automatiquement.

11.2.3 Clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur

Digestion par des endonucléases de restriction

Ces enzymes reconnaissent des séquences palindromiques particulières de (6 pb en général) d'ADN bicaténaire qu'elles clivent. Le clivage peut donner des bords francs ou des extrémités cohésives. Les enzymes sont utilisées à raison de 1 à 5 unités (U) par échantillon (500 ng d'ADN) dans les tampons recommandés par le fournisseur. Les coupures sont réalisées pendant 1 à 2 h à la température recommandée, en général 37°C . Les coupures aux enzymes de restriction sont utiles dans le cadre de la réalisation et la vérification du clonage d'un insert dans un vecteur.

3. Macherey-Nagel

4. DNA Ladder Mass Ruler, Fermentas

5. Bromure d'ETHidium

Purification d'un fragment d'ADN

Le fragment d'intérêt est séparé par électrophorèse sur gel et la bande d'agarose excisée est purifiée par le kit Nucleospin Extract II⁶, basé sur l'adsorption différentielle de l'ADN sur colonne de silice [351]. Les minicolonnes de résine utilisées sont chargées de résine anionique qui retient l'ADN et permet d'éliminer l'agarose, les sels et autres impuretés. Le fragment est élué par 30 à 50 μ l de Tris HCl 10 mM pH 8,5.

Ligature de fragments d'ADN

Le fragment d'ADN à insérer et le plasmide sont digérés par les mêmes enzymes de restriction ou enzymes de restriction compatibles. L'insertion est réalisée en général au niveau du site de clonage multiple du vecteur. Elle sera possible grâce à la complémentarité de base résultant de l'utilisation d'enzymes compatibles dans le cas d'extrémités cohésives. La ligature s'opère par action d'1 U d'ADN ligase du phage T4⁷ créant une liaison phosphodiester entre les extrémités 5' phosphate et 3' hydroxyle en présence d'ATP, le contact durant une nuit à 15°C. Afin d'éviter une recircularisation du vecteur sur lui-même, la proportion optimale entre ADN du vecteur et ADN à insérer doit être comprise entre 1 pour 3 et 1 pour 10.

Construction des plasmides *rcnA-gfp*, pETRCB et pUCRCB

La construction du plasmide *rcnA-gfp* a déjà été décrite [338]. Brièvement, un fragment d'ADN de 541 paires de bases contenant la région promotrice et le début du gène *rcnA* a été isolé du plasmide pAR020 [233] après digestion par les enzymes de restriction EcoRI et PvuII. Ce fragment a ensuite été inséré entre les sites EcoRI et SmaI du vecteur pPROBE-OT [348] formant ainsi le plasmide p157. Le plasmide pETRCB a été produit grâce à l'amplification par PCR d'un fragment de 625 paires de bases contenant le cadre de lecture du gène *rcnB* avec des amorces contenant les sites NdeI ou EcoRI. Ce fragment a ensuite été cloné entre les sites correspondants du plasmide pET30. Quant au plasmide pUCRCB, il résulte du sous-clonage d'un fragment extrait du pETRCNB par les enzymes XbaI et HindIII et cloné entre les sites correspondants du plasmide pUC18.

11.2.4 Transformation par de l'ADN plasmidique

Technique du TSS

Les plasmides sont introduits par choc thermique au cours de la transformation dans les cellules hôtes bactériennes, rendues compétentes par un traitement au tampon de transformation TSS [352]. Un volume de 5 ml de milieu LB estensemencé avec une goutte d'une préculture de la nuit de la souche bactérienne à transformer. Les cellules sont récoltées par centrifugation à une $DO_{600} \approx 0,3$, correspondant à $1,5 \cdot 10^8$ cellules. ml^{-1} . Le culot est repris délicatement par 0,1 ml d'une solution de TSS froide (PEG 3350 10 %, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, DMSO 5 %, dans du LB) conservée à 4°C. Les cellules peuvent être utilisées après maintien 30 min au moins dans la glace. Pour la transformation, 0,1 à 1 μ g de plasmide est ajouté aux cellules compétentes. Le mélange est laissé 30 min dans la glace, puis 900 μ l de LB sont ajoutés et la culture est incubée à 37°C pendant 1 h minimum pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide. Les cellules sont ensuite étalées sur milieu sélectif approprié et incubées à 37°C pendant 24 à 48 h.

Technique de l'électroporation

La transformation par électroporation permet aussi de faire pénétrer de l'ADN dans une cellule hôte bactérienne par un choc électrique. Afin d'éviter la formation d'un arc électrique, les cellules sont soigneusement lavées et toute trace de sels ainsi éliminée. 50 μ l de cellules électrocompétentes commerciales sont placées dans une cuve d'électroporation stérile, refroidie dans la glace puis environ 1 ng d'ADN plasmidique est ajouté dans la cuve. L'échantillon est soumis à un choc électrique très bref de l'ordre de la milliseconde mais de très forte intensité (résistance de 400 Ω , capacité de 25 μ Fd, voltage de 12500 V. cm^{-1})⁸. Après l'impulsion électrique, les cellules sont reprises dans 1 ml de milieu LB et incubées 1 h à 37°C. A la suite de cette culture d'expression, les cellules sont centrifugées et le culot étalé sur milieu sélectif puis incubé à 37°C pendant 24 à 48 h.

11.2.5 Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR⁹ permet d'amplifier un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques. Elle repose sur la synthèse enzymatique d'ADN par une ADN polymérase thermostable¹⁰ à partir de deux amorces de polarité opposée, complémentaires de chacun des brins à amplifier. Un cycle de synthèse est constitué des trois étapes :

1. La dénaturation de la matrice ADN par chauffage à 95°C(30 s à 1 min).
2. L'hybridation des amorces réalisée à une température dépendante de la composition en base des oligonucléotides (1 min).
3. L'extension des amorces par l'ADN polymérase est réalisée à 72°C à raison de 1 min par kb recopié, en présence des dNTP.

6. Macherey-Nagel

7. Invitrogen

8. appareil Biorad

9. Polymerase Chain Reaction

10. Taq polymérase, Promega

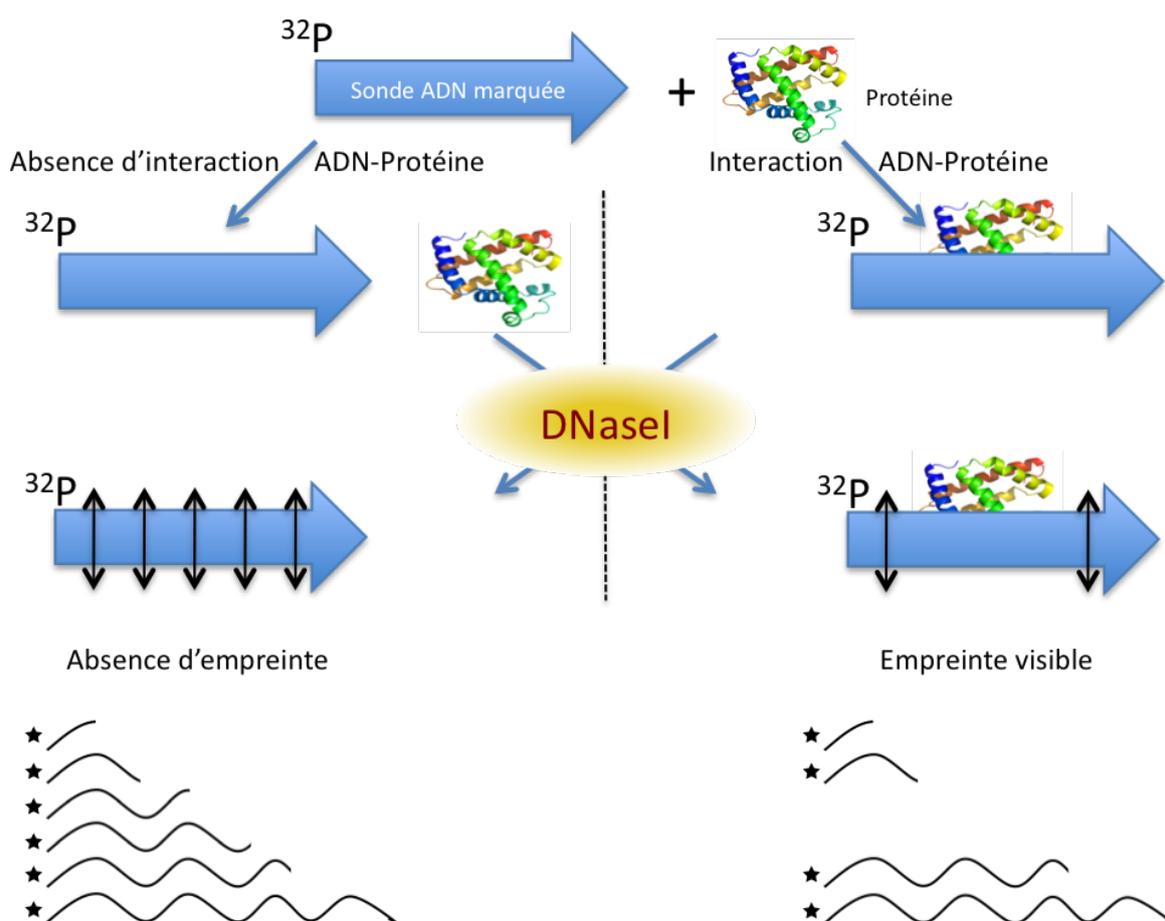


Figure 71 – Principe de l'empreinte à la DNase

La région promotrice de l'ADN qui sert de sonde est symbolisée par une flèche bleue. En absence d'interactions ADN-protéines, la DNase a accès à la totalité de la sonde et va générer des fragments de toute taille, marqués en 5' par le ^{32}P . En revanche, si la protéine interagit avec l'ADN, elle va protéger celui-ci de la digestion et l'enzyme ne pourra pas couper dans la zone protégée. Certaines tailles de fragments ne seront donc pas représentées ce qui va constituer une empreinte visible sur le gel.

Une amplification classique comporte 30 cycles, précédés d'une étape de dénaturation de 5 min à 95°C et s'achevant par une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C. La durée d'élongation doit cependant être adaptée en fonction de la taille du fragment à amplifier. Les cycles des chauffages successifs sont assurés par l'appareil Mycycler¹¹. Il est recommandé de choisir des amorces de 20 nucléotides minimum avec un pourcentage de G + C de 50 à 60 % et se terminant en 3' par G ou C.

11.2.6 Construction de la souche mutante $\Delta rcnB$

L'inactivation du gène cible *rcnB* a été effectuée au laboratoire selon la méthode de mutagenèse en une étape dans la souche BW25113 [353]. Les oligonucléotides yoNFRUp (ACGAAATCATGGGATCACTAACAAAAATATCGCTTGT-CAGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC) et yoNFRDwn2 (TAGCGATGATAAAAAATCTCACCGTCGTAGGCTTTA-ATCATATGAATATCCTCCTTAG) ont été utilisés pour amplifier la cassette *cat* du plasmide pKD3 [353] par PCR. L'amplifié a ensuite été utilisé pour transformer les bactéries receveuses possédant le système de recombinaison Red issu du phage λ . Grâce à la complémentarité de leurs séquences, les cassettes ont pu être intégrées dans le génome par recombinaison homologue. La fusion *rcnB-cat* a pu par la suite être transférée de la souche BW25113 aux souches d'intérêt par transduction avec le phage P1.

11.2.7 Transduction avec le phage P1

Le stock de phages P1^{vir} est réalisé en milieu liquide par infection de 5 ml de la souche donatrice cultivée à faible $D_{600nm} \approx 0,2$ en LB supplémenté en $MgSO_4$ 8 mM et $CaCl_2$ 4 mM avec 0,5 ml d'une dilution 10^{-2} d'un stock précédent. Le mélange est ensuite placé à 37°C jusqu'à la lyse totale des cellules (2 à 4 h). Le lysat, récupéré par centrifugation, est stérilisé par 0,2 ml de chloroforme et stocké à 4°C. La transduction est effectuée pendant 30 min à 37°C par mise en contact de la souche réceptrice cultivée en phase exponentielle de croissance en LB $MgSO_4$ 8 mM et $CaCl_2$ 4 mM avec le stock de phages, à une multiplicité d'infection de 1 phage pour 10 bactéries. Cette étape permet à un fragment de chromosome de la cellule donatrice encapsidé dans une particule phagique de pénétrer dans la cellule réceptrice et de recombiner. Après 3 lavages en LB + citrate 0,1 % pour éliminer le phage non adsorbé, une culture d'expression est effectuée 1 h en milieu LB + citrate 0,1 %. Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu sélectif approprié pendant 24 à 48 h à 37°C.

11.2.8 Empreinte à la DNase

Cette méthode permet de détecter une interaction ADN/Protéine. En effet, la fixation de la protéine sur l'ADN confère une protection visualisable de l'ADN vis-à-vis de l'endonucléase DNase. Elle s'effectue techniquement en trois étapes. Son principe est donnée sur la figure 71.

Marquage de la sonde ADN par du $^{32}P\alpha$ -dCTP

La sonde P_{rcnAB}^{12} est insérée au niveau du site multiple de clonage du plasmide pGEM-T entre les sites de restriction Sall et SacII formant ainsi le plasmide pP_{rcnAB} . 60 μ g de celui-ci sont alors digérés par ces deux enzymes de restriction afin de libérer des extrémités 5' protubérantes. Celles-ci sont ensuite comblées par l'ajout de 20 nM de chaque dNTP (dATP, dGTP, dTTP et $^{32}P\alpha$ -dCTP) ainsi que 5 U de Kleenow. Après 30 minutes, le marquage est stoppé par l'ajout de 20 nM de dCTP non marqué. L'ADN est précipité sur la nuit par un mélange adapté (acétate de sodium 3 M, pH 4,8, éthanol absolu). Après centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70 % puis séché complètement à 42°C avant d'être repris dans de l'eau. Une migration sur gel d'agarose 1 % est alors effectuée dans les conditions décrites précédemment et la bande correspondante à la sonde est excisée puis l'ADN purifié.

Préparation des échantillons

La sonde marquée est mise en contact avec la protéine RcnR en proportions égales et éventuellement les ions métalliques testés dans du tampon adapté (Hepes-NaOH 24 mM, Tris HCl 8 mM, KCl 140 mM, DTT 0,4 mM, dIdC 10 nM, Glycérol 10 %, NP 4 %, BSA 200 μ g.ml⁻¹, pH 7). Ensuite, 2 mU de DNase sont ajoutées. Après 15 s, la digestion est stoppée par l'ajout de 25 μ M d'EDTA. Les protéines et l'ADN sont alors séparés par un mélange de tampon TE (Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) et de phénol chloroforme puis centrifugés. Le surnageant contenant l'ADN est précipité à l'éthanol 70 %. Après centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70 % puis séché et repris dans la solution de dépôt.

Migration sur gel de polyacrylamide

Le gel utilisé contient 6 % d'acrylamide ainsi que 6 M d'urée. Il est coulé entre deux plaques de verre avec un gradient d'épaisseur sur un appareil 2010 Macrophor¹³. Les échantillons sont portés à ébullition pendant 5 min puis déposés sur le gel. La migration s'effectue dans du tampon TBE sous une tension constante de 1500 V et à température constante de 50°C. Après 4 h de migration, le gel est démoulé puis fixé dans l'acide acétique 8 %. Après un rinçage à l'eau, il est séché puis autoradiographié.

11. Biorad

12. la région promotrice de l'opéron *rcnAB* de 314 paires de bases

13. LKB Bromma

11.3 Méthodes biochimiques

11.3.1 Préparation d'extraits protéiques

Extraction des protéines périplasmiques

Les cellules d'une culture bactérienne sont récoltées par centrifugation et le culot cellulaire est lavé par du tampon phosphate 50 mM pH 7. L'extraction s'opère par action de 10 μ l de chloroforme, suivie, après un contact de 15 min, de l'addition de 100 μ l de Tris HCl 10 mM pH 7. La phase aqueuse obtenue après centrifugation (15 min, 10000 rpm, 4°C) contient les protéines périplasmiques et peut alors être dosé par réaction de Bradford et/ou traité pour dépôt sur gel d'électrophorèse de protéines.

Préparation rapide d'extraits bruts

Cette technique est basée sur un cassage mécanique des cellules par l'action de billes de verre. Les cellules contenues dans 1 ml de culture sont récoltées par centrifugation puis le culot est lavé par 100 μ l de tampon auquel on ajoute 50 μ l de billes de verre lavées à l'acide 150 – 212 μ m¹⁴. Le tube est vortexé 3 fois pendant 1 min puis centrifugé 5 min à 13000 rpm. Le surnageant récupéré contient les protéines totales et peut alors être dosé par réaction de Bradford et/ou traité pour dépôt sur gel d'électrophorèse de protéines.

11.3.2 Cinétique de transport du nickel

Ces manipulations visent à déterminer la concentration intracellulaire en ions nickel. Pour ce faire, l'isotope radioactif ⁶³Ni est utilisé. Celui-ci possède une demi-vie d'une centaine d'années et se caractérise par des émissions β - de faible énergie ce qui en fait un élément ayant une faible radio-toxicité et donc manipulable sans équipement de protection lourd. Les cultures sont effectuées en milieu LB et en aérobiose comme précédemment décrit en présence de 500 μ M de NiSO₄ pour induire le système *rcn* jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance (D.O_{600nm} \approx 0,6). Les cellules contenues dans un aliquot de 30 ml sont récoltées par centrifugation puis lavées par 5 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7 et repris dans 2 ml de tampon phosphate. 0,2 % de glucose sont ajoutés afin de maintenir le métabolisme bactérien et les cellules sont placées à 30°C pendant 10 min. Puis, 4 à 5 μ M de ⁶³NiCl₂ sont ajoutés et un aliquot de 100 μ l est filtré (0,45 μ m) à intervalles réguliers. Les filtres de nitrocellulose sont préalablement immergés dans une solution de tampon phosphate + EDTA 1 mM et rincés une fois par cette même solution après le dépôt des bactéries. Les filtres sont ensuite séchés totalement puis plongés dans 5 ml de liquide scintillant OCS¹⁵ et comptés au compteur à scintillation¹⁶. Les résultats sont exprimés en pmol de ⁶³Ni accumulé.mg⁻¹ PSB.

11.3.3 Dosage d'activité hydrogénase

L'activité hydrogénase peut être détectée visuellement par recherche de la réduction du BV¹⁷ en anaérobiose en présence d'hydrogène. La présence de BV réduit entraîne l'apparition d'une coloration violette des colonies bactériennes cultivées en anaérobiose ne persistant pas car le BV est rapidement réoxydé à l'air ambiant. Cette méthode est rapide et relativement aisée à mettre en œuvre mais très faiblement quantitative. Pour mieux différencier les activités hydrogénase propres à chaque souche, un dosage précis doit être fait. Pour cela, une préculture sur milieu LB MoSe (30 ml) est utilisée pour ensemercer un flacon de 250 ml rempli jusqu'au col. Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation et le culot, lavé à deux reprises dans du tampon phosphate 50 mM pH 7, est resuspendu dans 1 ml de ce même tampon. Une détermination de la concentration bactérienne est réalisée par mesure de la D.O_{600nm}, l'échantillon ayant été dilué au 1/100^{ème}. Une perméabilisation des cellules au toluène permet la pénétration du substrat. Après conservation au moins 15 min dans la glace, les échantillons sont dosés par mesure de l'apparition de benzyl viologène réduit absorbant à 600 nm. La réaction chimique, catalysée par l'hydrogénase, est la suivante :



Le substrat benzyl viologène à 1 M est injecté à la seringue dans une cuve calibrée, remplie de tampon phosphate 100 mM saturé en H₂. 50 mM de dithionite de sodium Na₂S₂O₄ jouant le rôle d'agent réducteur sont ajoutés au mélange réactionnel pour amorcer la réaction. La mesure spectrophotométrique s'effectue durant 5 min à raison de 2 mesures.min⁻¹. L'activité spécifique est exprimée en μ mol de BV réduit.min⁻¹.mg⁻¹ de PSB avec $\epsilon = 7,4 \text{ mM.cm}^{-1}$.

11.3.4 Dosage des activités β -galactosidase ou β -glucuronidase

Les cultures sont effectuées comme précédemment décrit. Les cellules sont recueillies après différents temps de croissance par centrifugation puis sont lavées 2 fois et resuspendues dans 1 ml de tampon M63. La D.O_{600nm} est mesurée après dilution

14. Sigma-Aldrich

15. Amersham Biosciences

16. Packard

17. Benzyl-Viologène

à 10^{-1} dans du M63. Les cellules sont perméabilisées par addition de quelques gouttes de toluène suivie d'une agitation vigoureuse sur un appareil vortex pendant 1 min puis maintenues dans la glace jusqu'au dosage. Ce procédé permet aux petites molécules de substrat de pénétrer dans la cellule où elles seront accessibles aux enzymes. Le dosage s'effectue à 30°C . De 5 à $100\ \mu\text{l}$ d'extrait cellulaire sont ajoutés et le volume est complété à $900\ \mu\text{l}$ par du tampon Z (Na_2HPO_4 60 mM; NaH_2PO_4 40 mM; KCl 10 mM; MgSO_4 1 mM; β -mercaptoéthanol 50 mM pH 7) pour le dosage β -galactosidase ou de tampon M63 pour le dosage β -glucuronidase [313]. La réaction est déclenchée par l'addition de $100\ \mu\text{l}$ de substrat ONPG ou PNP et la quantité de produit libéré coloré ONP ou PNP est mesurée à 420 nm pour les dosages β -galactosidase ou à 405 nm pour les dosages β -glucuronidase. Le dosage spectrophotométrique se fait en cinétique directe par variation de l'absorbance due à l'hydrolyse enzymatique du substrat incolore en un produit coloré en jaune au maximum d'absorption. Le coefficient d'extinction molaire ϵ de l'ONPG et du PNP est de $4500\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. L'activité spécifique est exprimée en nmol de PNP ou d'ONP $\text{apparu}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSB.

11.3.5 Dosage de l'activité oxydase

Les cultures sont réalisées en aérobiose comme précédemment décrit jusqu'en milieu de phase exponentielle ($D_{O_{600nm}} \approx 0,6$) dans 5 ml de milieu LB supplémenté ou non par $500\ \mu\text{M}$ de CuSO_4 ou de NiSO_4 . Les bactéries sont récoltées par centrifugation puis la fraction périplasmique est extraite au chloroforme. Le dosage d'activité est adapté de celui de Outten *et al.* [223]. L'extrait protéique est dilué dans du tampon acétate de sodium $100\ \mu\text{M}$, pH 5,5 et $1,6\ \text{mM}$ de substrat synthétique 3,3-diméthoxybenzidine¹⁸ est ajouté. Le mélange est incubé 5 min à 37°C puis la moitié de l'échantillon est transféré dans deux volumes de H_2SO_4 9 N pour stopper la réaction. L'absorbance est mesurée à 540 nm tandis que le reste du mélange est incubé pendant 16 h à 37°C puis transféré dans deux volumes de H_2SO_4 et mesuré. Les résultats sont exprimés en pmol de substrat oxydé. mg^{-1} de PSB. min^{-1} . Pour les dosages sur protéine purifiée, les conditions sont identiques. Suite à l'ajout du cuivre, les protéines sont passées sur des colonnes de dessalage PD-10¹⁹ pour éliminer les ions Cu^{2+} non fixés puis incubés avec le substrat.

11.3.6 Dosage de protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode est fondée sur le décalage de la longueur d'onde d'absorbance maximale de 465 à 595 nm d'une solution acide de bleu brillant de Coomassie G-250 suite à la fixation de protéines. Le réactif colorant concentré 5 fois est en solution dans de l'acide phosphorique et du méthanol. La procédure suivie est la microméthode, le volume réactionnel final de 1 ml, permet de doser de 1 à $20\ \mu\text{g}$ de protéine par essai. En parallèle est toujours réalisée une gamme de concentration de BSA²⁰ pour étalonnage. L'échantillon protéique à doser est ajouté dans de l'eau pour un volume final de $800\ \mu\text{l}$ auxquels sont ajoutés $200\ \mu\text{l}$ de réactif coloré concentré. L'incubation à température ambiante est menée durant 20 min à l'obscurité. Le coefficient directeur de la droite d'étalonnage permet de calculer les concentrations protéiques des échantillons.

11.3.7 Séparation des protéines par électrophorèse

Electrophorèse dénaturante des protéines sur gel SDS-PAGE

Cette méthode, décrite par Laemmli [354], permet une séparation des protéines sur gel de polyacrylamide, essentiellement en fonction de leur taille. Avant le dépôt, les échantillons protéiques sont chauffés 5 min à 95°C , en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol. Les gels à 12 ou 15 % d'acrylamide utilisés sont coulés en deux temps : gel de séparation puis gel de concentration dans lequel un peigne a été inséré. La polymérisation débute par l'addition de persulfate d'ammonium et de TEMED. La migration s'effectue dans du tampon SDS-PAGE (Tris base 25 mM, glycine 186 mM, SDS 0,1 % pH 8,5) à environ 80 V pendant 1 à 2 h²¹. Le gel est ensuite plongé dans une solution de coloration (bleu de Coomassie 0,25 %, éthanol 40 %, acide acétique 10 %). Le bleu de Coomassie fixé de manière aspécifique est éliminé par plusieurs bains dans une solution de décoloration (éthanol 40 %, acide acétique 10 %).

Electrophorèse en gel Tris tricine

Le protocole suivi est celui mis au point par Schagger et Von jagow [355]. Le gel de polyacrylamide à 15 % est préparé en tampon Tris HCl 3 M à pH 8,45 en présence de 0,3 % de SDS. Le tampon anode utilisé lors de la migration est composé de Tris HCl 0,2 M pH 8,8 et le tampon à la cathode se compose de Tris HCl 0,1 M, Tricine 0,1 M et SDS 0,1 % pH 8,25. L'électrophorèse est conduite à 50 puis 100 V pendant environ 2 h.

11.3.8 Purification de la protéine RcnB

Surproduction de RcnB

Le gène *rcnB* cloné dans le vecteur de surexpression pET30²² est placé sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase

18. Sigma-Aldrich

19. Amersham Biosciences

20. Bovine Serum Albumin

21. appareil protean, Biorad

22. Novagen

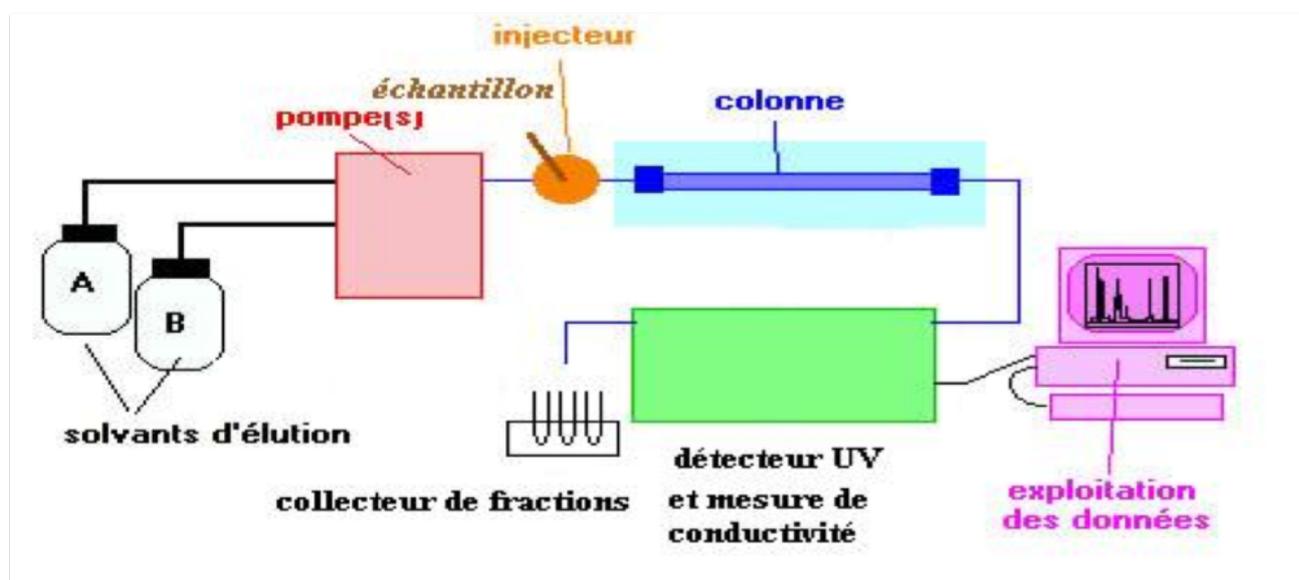


Figure 72 – Schéma de l'appareil FPLC utilisé

Les tampons utilisés sont stockés dans les réservoirs A et B et circulent grâce à l'action de pompes péristaltiques paramétrables. L'injecteur situé en amont de la colonne permet de choisir la solution qui va être éluée. La quantité de protéines reflétée par l'absorbance à 280 nm et l'osmolarité de l'éluat sont mesurées en temps réel à la sortie de la colonne. L'appareil est couplé à un collecteur de fractions pour récupérer celles qui contiennent les protéines d'intérêt.

du phage T7, la production de cette enzyme étant placée sous le contrôle de l'opérateur *lac* inductible par l'IPTG²³. Une culture de 500 ml de LB de la souche BL21 ayant intégrée le vecteur pET*rcnB* est menée sous agitation à 37°C jusqu'à DO₆₀₀ ≈ 0,6 puis est induite par addition d'IPTG 1 mM final. Après 4 h d'induction, les cellules sont centrifugées et le culot est conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

Purification de RcnB

Le culot contenant les bactéries ayant surproduites RcnB est repris dans 5 à 10 ml de tampon Tris HCl 50 mM pH 8 + 1,5 M de sulfate d'ammonium. Les cellules sont ensuite explosées par 3 passages à la presse de French puis les débris cellulaires sont culottés par centrifugation (10 min, 10000 rpm, 4°C). Le surnageant est filtré à 0,45 µm avant de poursuivre la purification. Après plusieurs essais de mise au point, une formule en trois étapes est apparue comme le meilleur procédé de purification.

Chromatographie d'interactions hydrophobes

La colonne utilisée est ici une HiTrap Phenyl²⁴ monté sur un appareil FPLC²⁵ comme décrit sur la figure 72. Le débit est maintenu constant à 1 ml.min⁻¹ pendant toute la chromatographie pour une pression de ≈ 20 psi. La colonne est préalablement rincée par au moins l'équivalent de 5 volumes de colonne de tampon Tris HCl 50 mM pH 7 puis équilibrée par 3 volumes du même tampon Tris HCl + 1,5 M de (NH₄)₂SO₄. L'échantillon est alors injecté puis élué par un gradient linéaire de 1,5 M à 0 M de (NH₄)₂SO₄. Pour plus d'efficacité de cette étape, l'éluion peut se faire avec un palier à 0,75 M. Les fractions de 2 ml récoltées sont testées pour la présence de RcnB en déposant un aliquot de 10 µl + 4 µl de bleu de dépôt de chaque sur gel Tris-Tricine 15 %.

Dialyse

Les fractions contenant la protéine RcnB sont rassemblées dans un ou plusieurs boudins de dialyse selon le volume. La membrane Spectra/Por Biotech²⁶ utilisée possède un seuil de coupure à 8 kDa. L'échantillon est dialysé pendant 16 h à 4°C contre 4 l de tampon Tris HCl 50 mM pH 7 pour bien éliminer toute trace de (NH₄)₂SO₄.

Chromatographie d'échange d'anions

La colonne utilisée est une Uno-Q1²⁷ montée sur le même appareil FPLC. Le débit est maintenu constant à 1 ml.min⁻¹ pendant tout le processus pour une pression de ≈ 200 psi. La colonne est préalablement rincée par au moins 5 volumes de tampon Tris HCl 50 mM pH 7 + 1 M de NaCl puis équilibrée par 3 volumes du tampon Tris HCl sans sel. L'échantillon est chargé puis élué par un gradient de 0 à 1 M NaCl. Les fractions récoltées de 2 ml sont testées pour la présence de RcnB en déposant un aliquot de 10 µl + 4 µl de bleu de dépôt de chaque sur gel Tris-Tricine 15 %. La protéine RcnB n'a aucune affinité pour la colonne et est donc éluée en premier alors que toutes les autres protéines restent fixées à la colonne. A la fin de ce processus de purification, la protéine RcnB pure est concentrée sur centricons vivaspin et stockée à -80°C jusqu'à utilisation.

11.3.9 Immunodétection (=Western Blot)

Après séparation électrophorétique en gel SDS-PAGE ou Tris tricine, les protéines peuvent être transférées sur une membrane PVDF, membrane apolaire hydrophobe dont le faible potentiel de surface diminue les forces électrostatiques de répulsion et favorise le transfert d'acides nucléiques ou protéines. La révélation spécifique d'une ou plusieurs des protéines du gel se fera ensuite à l'aide d'anticorps. Le transfert est effectué²⁸ en tampon glycine (glycine 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375 %, éthanol 20 %). La membrane est ensuite saturée dans du TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) contenant 5 % de lait, pendant 1 h à température ambiante. Plusieurs lavages de la membrane saturée sont réalisés dans du tampon T-TBS (TBS 1X, Tween 20 à 0,1 %). Puis la membrane est incubée sur la nuit en présence d'anticorps primaires dirigés contre la protéine étudiée après dilution (du 1/1000^{ème} au 1/10000^{ème} selon la protéine) dans du TBS lait 1,67 %. L'excès d'anticorps primaires est éliminé par 3 lavages en T-TBS et les anticorps secondaires, anti-IgG de lapin ou de souris selon l'anticorps primaire, marqués à la peroxydase et dilués au 1/10000^{ème} en TBS lait 1,67 %, sont ensuite ajoutés. Après incubation d'1 h à température ambiante, la membrane est rincée dans du T-TBS puis séchée. L'immunorévélation par détection de l'activité peroxydasique est effectuée à l'aide du kit ECL²⁹. Un substrat contenant du luminol est mis en contact avec la membrane; une émission de lumière brève³⁰, conséquence de l'oxydation du substrat par la peroxydase éventuellement présente sera détectée par exposition d'un film autoradiographique.

23. isopropyl β-D thiogalactopyranoside

24. GE Healthcare

25. Fast Protein Liquid Chromatography, appareil BioLogic HR, Biorad

26. Spectrumlabs

27. Biorad

28. appareil mini trans blot cell, Biorad

29. Millipore

30. atteinte du maximum après 5 min puis stabilité pendant ≈ 20 min avant la décroissance progressive du signal

11.3.10 Chromatographie par Gel-Filtration

La colonne utilisée est une superdex HR 10/30³¹. La protéine RcnB purifiée est diluée à une concentration finale de 1 mM dans du tampon Tris HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8 en présence ou non d'un excès de cuivre (5 mM). 500 μ l de l'échantillon sont injectés sur la colonne préalablement équilibrée par du tampon Tris 50 μ M, NaCl 50 mM, pH 7 puis élués par ce même tampon. Le débit est fixé à 2,5 ml.min⁻¹ et les fractions recueillies sont de 5 ml. L'absorbance à 280 nm est suivie en continu et permet de localiser les fractions dans lesquelles la protéine RcnB est éluée.

11.3.11 Dialyses

Vérification des membranes et préparation de la protéine

Un boudin de la membrane de dialyse disposant d'un seuil de coupure de 8 kDa est remplie par 1 ml de solution contenant la protéine RcnB à une concentration de 25 μ M diluée dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7. Celui-ci est dialysé sur la nuit contre 3 l de tampon Tris HCl 50 mM pH 7 + EDTA 1 mM puis dialysé 2 fois pendant 4 h contre 3 l de tampon Tris HCl 50 mM pH 7. Après dialyse, la concentration de la protéine est redéterminée. Pour RcnB, la perte d'échantillon est inférieure à 2 %. Une manipulation identique a été effectuée sur les cellules slide-a-lyser ayant un seuil de coupure à 5 kDa³² et a montré des résultats identiques.

Dialyse à l'équilibre

La cellule de dialyse slide-a-lyser est préalablement rincée dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7. 50 μ l de protéine pure à 12 μ M sont déposés dans cette cellule puis celle-ci est plongée dans 5 ml de tampon Tris HCl 50 mM pH 7. Une quantité croissante de ⁶³NiCl₂ est ajoutée (0 à 4 équivalents) puis le mélange est équilibré pendant 48 h à température ambiante. Un aliquot de la cellule et du tampon extérieur sont prélevés et la radioactivité est quantifiée comme pour la dialyse en flux continu. La différence entre la radioactivité de la cellule et celle du tampon permet d'estimer la quantité de métal fixé par la protéine.

11.3.12 Dot Blot

La membrane de PVDF 0,22 μ m est préparée en l'imbibant d'éthanol 70 % puis en la plongeant dans de l'eau avant de l'équilibrer dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7. Celle-ci est ensuite montée sur le support et les échantillons sont déposés avant qu'elle ne sèche. La protéine est utilisée à une concentration de 1 μ M. Celle-ci est incubée 1 h à température ambiante en présence de 0, 1 ou 10 μ M de ⁶³NiCl₂. 50 μ l de chaque échantillon sont déposés en triplicata sur la membrane. Celle-ci est rincée 8 fois par du tampon puis séchée, découpée et la quantité de métal retenu et donc fixé à la protéine RcnB est déterminée par l'ajout de liquide scintillant OCS et comptage. Les résultats sont exprimés en quantité de ⁶³Ni liée en fonction de la quantité totale de ⁶³Ni (exprimée par rapport à celle des protéines).

11.4 Techniques biophysiques de caractérisation des biomolécules

11.4.1 Techniques spectroscopiques

Spectroscopie UV-Visible

L'appareil utilisé pour étudier les interactions protéine/métal est un Nicolet Evolution 100³³. La protéine RcnB purifiée est diluée dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7 dans une micro-cuve en quartz d'une contenance de 100 μ l pour une concentration finale de 300 μ M. Les ions métalliques sont ajoutés équivalent par équivalent dans un volume n'excédant pas 1/100^{ème} du volume final (1 μ l) afin d'éviter la dilution de l'échantillon et donc la diminution d'absorbance ainsi que la précipitation de la protéine. Après 10 min d'équilibration à température ambiante, le spectre d'absorbance compris entre 250 et 700 nm est enregistré et la manipulation peut être répétée avec un équivalent supplémentaire.

Dosage de la fusion *rcnA-gfp* par spectrofluorométrie

Ce dosage permet de quantifier l'importance de la production de la protéine fluorescente codée par le gène rapporteur *gfp* mais n'est pas basée sur l'activité enzymatique de la protéine, la fluorescence étant intrinsèque. Les cultures des souches ayant intégrées le plasmide p157 sont réalisées comme précédemment décrit. A intervalles réguliers, un aliquot de 3 ml est prélevé stérilement et l'absorbance à 600 nm est déterminée. Le même aliquot sert également pour la détermination de l'intensité de fluorescence. Celui-ci est transféré dans un spectrofluorimètre SFM 23/B³⁴ et excité par un faisceau lumineux de $\lambda = 490$ nm. La fluorescence est enregistrée à $\lambda = 510$ nm. Les résultats sont exprimés par le rapport entre l'intensité de fluorescence et la quantité de bactéries. Pour vérifier les résultats, l'observation des bactéries au microscope à épifluorescence a été réalisée. Pour cela, 5 μ l de bactéries sont déposées sur une lame d'observation. Les bactéries sont ensuite fixées en

31. Pharmacia

32. Pierce

33. Thermo Scientific

34. Kontron

passant la lame à la flamme après ajout de 1 ml d'éthanol 70 %. Après séchage, 50 μl d'eau sont déposés sur la lame puis recouverts d'une lamelle avant l'observation.

Etude de l'interaction RcnB/Cu par extinction de fluorescence

La protéine RcnB purifiée est diluée dans du tampon Bis Tris propane 100 mM pH 6 à une concentration finale de 5 μM . Dans un premier temps, la longueur d'onde maximale d'excitation (λ_{max} exc) est déterminée en fixant arbitrairement la longueur d'onde d'émission (λ em) à 330 nm. Un balayage de longueurs d'onde d'excitation est effectué entre 250 et 350 nm et le pic du spectre ainsi obtenu correspond à λ_{max} exc. Pour RcnB, λ_{max} exc = 280 nm. Cette longueur d'onde correspond à l'excitation du résidu tryptophane³⁵ qui génère un signal beaucoup plus important que les autres acides aminés aromatiques. Cette valeur de λ_{max} exc est conservée et un balayage de longueurs d'onde d'émission est effectué entre 300 et 400 nm. Le pic du spectre ainsi obtenu correspond à λ_{max} em. Pour RcnB, λ_{max} em = 319 nm. Toutes les mesures sont donc effectuées avec λ exc = 280 nm et λ em = 319 nm pour générer le meilleur signal possible. Ensuite, un excès de métal (100 μM = 20 équivalents) est ajouté puis un spectre d'émission est enregistré après 5 min d'équilibration à température ambiante. Pour le cuivre (CuII), la manipulation est effectuée en ajoutant des quantités croissantes de solution CuSO_4 . Pour le cuivre Cu(I), des conditions spéciales réductrices doivent être utilisées afin de garder le métal sous forme Cu(I). Ainsi, la solution métallique est préparée par dissolution de poudre de Tetrakis copper(I) hexafluorophosphate dans de l'acétonitrile dégazée sous atmosphère d'azote dans un flacon hermétiquement clos. Ce composé est un donneur de Cu(I). La présence de Cu(I) en solution peut être testée par l'ajout de BCS qui est un agent chélatant du Cu(I) émettant un signal caractéristique à $\lambda = 483$ nm en présence de cet espèce [193]. Le tampon utilisé pour la titration est lui aussi dégazé et l'intégralité de la manipulation s'effectue dans une cuve bouchée hermétiquement. Les résultats sont présentés sous forme de rapport de fluorescence enregistrée sur la fluorescence initiale (F/F0) en fonction de la quantité de métal.

Spectrométrie de masse

Cette manipulation a été effectuée par David Lemaire au centre du CEA à Cadarache. L'appareil utilisé est un ESI-Q-TOF³⁶. Les spectres de la protéine RcnB pure avec et sans ajout de cuivre ont été réalisés en conditions natives et dénaturantes. Pour les conditions natives, la protéine est diluée à une concentration finale de 5 μM dans une solution d'ions NH_4^+ 20 mM. En conditions dénaturantes, 0,2 % d'acide formique sont ajoutés. Un spectre de masse est alors enregistré puis 10 équivalents d'ions CuSO_4 sont ajoutés et un deuxième spectre est enregistré. Les spectres obtenus peuvent alors être traités puis superposés.

Dosage des métaux par ICP-OES

Le dosage par ICP-OES³⁷ permet de quantifier précisément les métaux présents dans un échantillon. Les cultures des différentes souches sont effectuées comme précédemment décrit en gros volumes (250 ml) jusqu'à $D_{600nm} \approx 0,6$. Les bactéries sont récoltées par centrifugation puis lavées une fois par du tampon phosphate 50 mM pH 7 + EDTA 1 mM et deux fois par du tampon phosphate seul. Le culot est ensuite lyophilisé et pesé avant d'être dissous dans 2 ml d'acide nitrique HNO_3 concentrée. La minéralisation est effectuée au digesteur micro-ondes (Programme : 15 min de montée en température jusqu'à 180°C puis 30 min à 180°C). Les échantillons sont par la suite complétés à 8 ml par de l'eau ultrapure avant d'être analysés³⁸. Une gamme de métaux purs est réalisée en parallèle. Tous les dosages sont effectués en triplicata. Les résultats sont exprimés en μg de métaux. g^{-1} de PSB³⁹.

11.4.2 Essais de cristallisation

Ces manipulations ont été effectuées au centre du CEA de Cadarache⁴⁰ selon la méthode de la goutte suspendue. Des cribles de kit commerciaux ont été réalisés comme approche globale. La protéine RcnB purifiée est plus ou moins concentrée (1, 5, 10 et 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) puis 1 μl de cette solution est mélangé avec 1 μl d'une solution à tester et déposée sur une lamelle. Celle-ci est retournée puis fixée au dessus d'un réservoir contenant 1 ml de la solution à tester. Ensuite, les boîtes sont incubées à 5 ou 20°C de 1 semaine à plusieurs mois pour permettre la croissance des cristaux éventuels. Après cette première série, le laboratoire d'accueil s'est doté d'un robot de cristallisation. Une deuxième série de tests a donc été effectuée selon la méthode de la goutte assise. Outre le gain de temps, le robot permet de faire des gouttes de moindre volume (0,5 μl) ce qui permet d'économiser le stock de protéine pure.

11.4.3 Dichroïsme circulaire

Cette manipulation a été effectuée à l'IBCP de Lyon. La protéine RcnB pure est utilisée à une concentration de 15 ou 20 μM dans du tampon phosphate 10 mM pH 7. Le spectre est enregistré sur un appareil Chirascan⁴¹ à température

35. la séquence de RcnB mature possède 2 résidus W

36. Electrospray couplé à un quadripôle ainsi qu'un tube de vol

37. Ionised Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy

38. appareil ICP JY138 ULTRACE, Jobin Yvon Instruments S.A

39. parties par millions ou ppm

40. Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire

41. Applied Photophysics

ambiante entre les longueurs d'onde 180 et 260 nm. Le contrôle de la saturation du signal est effectué en suivant la tension du récepteur. Les spectres sont ensuite lissés et la valeur du tampon est retranchée. La déconvolution des spectres entre 185 et 260 nm est effectuée via le serveur Dichroweb⁴². Les 4 méthodes disponibles, SELCON3, CONTIN, CDSSTR et K2D sont utilisées en parallèle.

11.4.4 Identification de protéines

Cette manipulation de LC-MS/MS a été effectuée par la plateforme Marseille Protéomique de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée. La bande contenant la protéine à identifier est excisée du gel SDS-PAGE ou Tris-Tricine et placée dans un microtube pour être analysée. L'échantillon subit un cycle de Réduction / Alkylation / Digestion à la trypsine⁴³ sur 8 h et extraction des peptides. Ceux-ci sont ensuite séchés au speed vacuum puis repris dans 10 μ l d'eau / acide TriFluoroAcétique 0,1 %. Puis, les échantillons sont dessalés sur colonne ZipTip⁴⁴ selon le protocole du fabricant. Enfin, les échantillons sont analysés par un spectromètre de masse⁴⁵. L'assignation des pics est faite automatiquement par la machine puis vérifiée manuellement. Pour l'identification des protéines, une recherche contre les bases de données Mascot⁴⁶ et MS-Fit⁴⁷ réduites à *E. coli* est effectuée.

11.5 Outils bioinformatiques

11.5.1 Alignements de génomes

Les génomes de différentes espèces bactériennes peuvent être comparés grâce à la base de données MBGD⁴⁸. Cet outil permet entre autres d'aligner les génomes qui possèdent le gène ciblé par la requête et d'étudier l'environnement de celui-ci. Chaque gène environnant est annoté et des informations le concernant peuvent être consultées.

11.5.2 Alignements de séquences protéiques

La séquence de la protéine RcnB a été récupérée dans la base de données SWISSPROT⁴⁹ sous le numéro d'accèsion P64534 YOHN_ECOLI. En plus de la séquence primaire de la protéine, cette base de données permet de déterminer quelques caractéristiques théoriques comme le point isoélectrique pI, la composition en acides aminés, la masse moléculaire ou encore le coefficient d'extinction molaire ϵ . La recherche de protéines homologues a été effectuée grâce à l'algorithme BLAST⁵⁰ disponible en ligne sur le site du NCBI⁵¹. Ce programme permet de comparer des séquences protéiques et génère des résultats sous forme de pourcentage de similarité; plus la valeur (*e-value*) est faible, plus le risque que la similitude entre deux séquences protéiques soit liée au hasard est faible. Les différentes séquences mises en valeur par BLAST peuvent ensuite être alignées par un outil de type Clustal⁵² et le résultat est visualisé par le logiciel CLC viewer.

11.5.3 Prédiction de topologie protéique

Le serveur SignalP 3.0⁵³ permet de rechercher la présence de peptides d'adressage dans les séquences protéiques et indique leur site de clivage probable avec un coefficient de probabilité.

11.5.4 Recherche de domaines protéiques

La recherche de domaines caractéristiques a été effectuée sur la séquence de RcnB grâce au serveur InterProScan⁵⁴. Les domaines ainsi obtenus sont référencés dans la base de données Pfam⁵⁵. L'interrogation de celle-ci permet de retrouver les bactéries possédant des protéines contenant ces domaines et potentiellement caractérisées.

42. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>

43. Promega

44. Millipore

45. appareil nano ESI-IT LCQ-DecaXP, ThermoFinnigan

46. <http://www.matrixscience.com>

47. <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>

48. <http://mbgd.genome.ad.jp/>

49. <http://expasy.org/sprot/>

50. Basic Local Alignment Sequence Tool

51. National Center for Biotechnology Information : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

52. <http://www.ebi.ac.uk/ClustalW/>

53. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

54. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

55. <http://pfam.sanger.ac.uk/>

Cinquième partie

Bibliographie

Bibliographie

- [1] Lewis, G. N. *Valence and Structure of Atoms and Molecules* (Chemical Catalog Company, N.Y., 1923).
- [2] Housecroft, C. E. & Constable, E. C. *Chemistry, 3rd edn.* (Pearson Education, Essex, UK, 2006).
- [3] Pearson, R. G. Acids and bases. *Science* **151**, 172–177 (1966).
- [4] Irving, H. M. N. H. & Williams, R. J. P. The stability of transition-metal complexes. *J Chem Soc* 3192–3210 (1953).
- [5] Hobman, J. L., Yamamoto, K. & Oshima, T. Transcriptomic responses of bacterial cells to sublethal metal ion stress. *Microbiol Monogr* **6**, 74–115 (2007).
- [6] Nieboer, E. & Richardson, D. H. S. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Env Poll* **1**, 3–26 (1980).
- [7] Hughes, M. N. & Poole, R. K. *Metals and microorganisms* (Chapman and Hall, London, U.K., 1989).
- [8] Milazzo, G., Caroli, S. & Sharma, V. K. *Tables of Standard Electrode Potentials* (Wiley, Chichester, UK, 1978).
- [9] Weast, R. C. *CRC handbook of chemistry and physics, 64th edn.* (CRC, Boca Raton, Florida, 1984).
- [10] Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D. & Robinson, N. J. Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**, 823–830 (2009).
- [11] Williams, R. J. P. & Frausto da Silva, J. J. R. *The chemistry of Evolution : The development of our ecosystem* (Elsevier, Amsterdam, 2006).
- [12] Saito, M. A., Sigman, D. M. & Morel, F. M. M. The bioinorganic chemistry of the ancient ocean : the co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the archean proterozoic boundary? *Inorg. Chim. Acta* **356**, 308–318 (2003).
- [13] Rulisek, L. & Vondrasek, J. Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺) in metalloproteins. *J Inorg Biochem* **71**, 115–127 (1998).
- [14] Kasting, J. F. & Siefert, J. L. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* **296**, 1066–1068 (2002).
- [15] Sessions, A. L., Doughty, D. M., Welander, P. V., Summons, R. E. & Newman, D. K. The continuing puzzle of the great oxidation event. *Curr Biol* **19**, 567–574 (2009).
- [16] Crichton, R. R. & Pierre, J. L. Old iron, young copper : from Mars to Venus. *Biomaterials* **14**, 99–112 (2001).
- [17] Schalk, I. J. Metal trafficking via siderophores in gram-negative bacteria : specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem* **102**, 1159–1169 (2008).
- [18] Strzepek, R. F. & Harrison, P. J. Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature* **431**, 689–692 (2004).
- [19] Konhauser, K. O., Pecoits, E., Lalonde, S. V., Papineau, D., Nisbet, E. G., Barley, M. E., Arndt, N. T., Zahnle, K. & Kamber, B. S. Oceanic nickel depletion and a methanogen famine before the great oxidation event. *Nature* **458**, 750–753 (2009).
- [20] Saito, M. A. Biogeochemistry : Less nickel for more oxygen. *Nature* **458**, 714–715 (2009).
- [21] Catling, D. C., Claire, M. W. & Zahnle, K. J. Anaerobic methanotrophy and the rise of atmospheric oxygen. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **365**, 1867–1888 (2007).
- [22] Outten, C. E. & O'Halloran, T. V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**, 2488–2492 (2001).
- [23] Heldal, M., Norland, S. & Tumyr, O. X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Appl Environ Microbiol* **50**, 1251–1257 (1985).
- [24] Nies, D. H. Bacterial transition metal homeostasis. *Microbiol Monogr* **6**, 117–142 (2007).
- [25] Prescott, L., Harly, J. P. & Klein, D. A. *Microbiologie* (DeBoeck Universite, De Boeck Wesmael S.A., Bruxelles, Belgium, 1995).
- [26] Smith, M. A., Pirrat, P., Pearson, A. R., Kurtis, C. R. P., Trinh, C. H., Gaule, T. G., Knowles, P. F., Phillips, S. E. V. & McPherson, M. J. Exploring the roles of the metal ions in *Escherichia coli* copper amine oxidase. *Biochemistry* **49**, 1268–1280 (2010).
- [27] Ma, Z., Cowart, D. M., Scott, R. A. & Giedroc, D. P. Molecular insights into the metal selectivity of the copper(I)-sensing repressor CsoR from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **48**, 3325–3334 (2009).
- [28] *Enzyme Nomenclature* (Academic Press, San Diego, California, 1992).
- [29] Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L. & Thornton, J. M. Metal ions in biological catalysis : from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* **13**, 1205–1218 (2008).
- [30] Waldron, K. J. & Robinson, N. J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* **7**, 25–35 (2009).
- [31] Lane, T. W. & Morel, F. M. M. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4627–4631 (2000).
- [32] Nikaido, H. & Vaara, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* **49**, 1–32 (1985).
- [33] Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, S. L., Robinson, C. V., Ilag, L. L., von Heijne, G. & Daley, D. O. Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *J Biol Chem* **280**, 34409–34419 (2005).
- [34] Danelon, C., Suenaga, A., Winterhalter, M. & Yamato, I. Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin : single channel conductances vs. free energy calculation. *Biophys Chem* **104**, 591–603 (2003).
- [35] Ferguson, A. D. & Deisenhofer, J. TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* **1565**, 318–332 (2002).
- [36] Schauer, K., Gouget, B., Carriere, M., Labigne, A. & de Reuse, H. Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol Microbiol* **63**, 1054–1068 (2007).
- [37] Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L. & Smith, J. A. C. Secondary transporters for nickel and cobalt ions : theme and variations. *Biomaterials* **18**, 399–405 (2005).
- [38] Wu, L. F., Navarro, C., de Pina, K., Quenard, M. & Mandrand, M. A. Antagonistic effect of nickel on the fermentative growth of *Escherichia coli* K12 and comparison of nickel and cobalt toxicity on the aerobic and anaerobic growth. *Environ Health Perspect* **102**, 297–300 (1994).
- [39] Wu, L. F. & Mandrand-Berthelot, M. A. Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie* **68**, 167–179 (1986).
- [40] Wu, L. F., Navarro, C. & Mandrand-Berthelot, M. A. The *hydC* region contains a multi-cistronic operon *nik* involved in nickel transport in *Escherichia coli*. *Gene* **107**, 37–42 (1991).
- [41] Navarro, C., Wu, L. F. & Mandrand-Berthelot, M. A. The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol Microbiol* **9**, 1181–1191 (1993).
- [42] de Pina, K., Navarro, C., McWalter, L., Boxer, D. H., Price, N. C., Kelly, S. M., Mandrand-Berthelot, M. A. & Wu, L. F. Purification and characterization of the periplasmic nickel-binding protein NikA of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* **227**, 857–865 (1995).
- [43] Allan, C. B., Wu, L. F., Gu, Z., Choudhury, S. B., Al-Mjeni, F., Sharma, M. L., Mandrand-Berthelot, M. A. & Maroney, M. J. An X-ray absorption spectroscopic structural investigation of the nickel site in *Escherichia coli* NikA protein. *Inorg. Chem.* **37**, 5952–5955 (1998).
- [44] Heddle, J., Scott, D. J., Unzai, S., Park, S. Y. & Tame, J. R. H. Crystal structures of the liganded and unliganded nickel-binding protein NikA from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**, 50322–50329 (2003).

- [45] Cherrier, M. V., Martin, L., Cavazza, C., Jacquamet, L., Lemaire, D., Gaillard, J. & Fontecilla-Camps, J. C. Crystallographic and spectroscopic evidence for high affinity binding of FeEDTA(H₂O) to the periplasmic nickel transporter NikA. *J Am Chem Soc* **127**, 10075–10082 (2005).
- [46] Cherrier, M. V., Cavazza, C., Bochet, C., Lemaire, D. & Fontecilla-Camps, J. C. Structural characterization of a putative endogenous metal chelator in the periplasmic nickel transporter NikA. *Biochemistry* **47**, 9937–9943 (2008).
- [47] Addy, C., Ohara, M., Kawai, F., Kidera, A., Ikeguchi, M., Fuchigami, S., Osawa, M., Shimada, I., Park, S. Y., Tame, J. R. H. & Heddle, J. G. Nickel binding to NikA : an additional binding site reconciles spectroscopy, calorimetry and crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 221–229 (2007).
- [48] Higgins, C. F. ABC transporters : from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67–113 (1992).
- [49] Jubier-Maurin, V., Rodrigue, A., Ouahrani-Bettache, S., Layssac, M., Mandrand-Berthelot, M. A., Kohler, S. & Liautard, J. P. Identification of the *nik* gene cluster of *Brucella suis* : regulation and contribution to urease activity. *J Bacteriol* **183**, 426–434 (2001).
- [50] Sebbane, F., Mandrand-Berthelot, M. A. & Simonet, M. Genes encoding specific nickel transport systems flank the chromosomal urease locus of pathogenic *Yersinia*. *J Bacteriol* **184**, 5706–5713 (2002).
- [51] Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Gelfand, M. S. & Eitinger, T. Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters : evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *J Bacteriol* **188**, 317–327 (2006).
- [52] Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Eudes, A., ter Beek, J., Rodionova, I. A., Erkens, G. B., Slotboom, D. J., Gelfand, M. S., Osterman, A. L., Hanson, A. D. & Eitinger, T. A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J Bacteriol* **191**, 42–51 (2009).
- [53] Chen, Y. Y. M. & Burne, R. A. Identification and characterization of the nickel uptake system for urease biogenesis in *Streptococcus salivarius* 57I. *J Bacteriol* **185**, 6773–6779 (2003).
- [54] Eitinger, T. & Mandrand-Berthelot, M. A. Nickel transport systems in microorganisms. *Arch Microbiol* **173**, 1–9 (2000).
- [55] Eitinger, T. & Friedrich, B. Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high-affinity nickel transport gene from *Alcaligenes eutrophus*. *J Biol Chem* **266**, 3222–3227 (1991).
- [56] Eitinger, T. & Friedrich, B. A topological model for the high-affinity nickel transporter of *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* **12**, 1025–1032 (1994).
- [57] Eitinger, T., Wolfram, L., Degen, O. & Anthon, C. A Ni²⁺ binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease. *J Biol Chem* **272**, 17139–17144 (1997).
- [58] Komeda, H., Kobayashi, M. & Shimizu, S. A novel transporter involved in cobalt uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 36–41 (1997).
- [59] Mobley, H. L., Garner, R. M. & Bauerfeind, P. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene *nixA* : synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol Microbiol* **16**, 97–109 (1995).
- [60] Cole, S. T. & Barrell, B. G. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp* **217**, 160–72 ; discussion 172–7 (1998).
- [61] Degen, O. & Eitinger, T. Substrate specificity of nickel/cobalt permeases : insights from mutants altered in transmembrane domains I and II. *J Bacteriol* **184**, 3569–3577 (2002).
- [62] Brito, B., Prieto, R. I., Cabrera, E., Mandrand-Berthelot, M. A., Imperial, J., Ruiz-Argueso, T. & Palacios, J. M. *Rhizobium leguminosarum* *hupE* encodes a nickel transporter required for hydrogenase activity. *J Bacteriol* **192**, 925–935 (2010).
- [63] Zhu, W., Marr, A. C., Wang, Q., Neese, F., Spencer, D. J. E., Blake, A. J., Cooke, P. A., Wilson, C. & Schroder, M. Modulation of the electronic structure and the Ni-Fe distance in heterobimetallic models for the active site in [NiFe]hydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18280–18285 (2005).
- [64] Forzi, L. & Sawers, R. G. Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biomaterials* **20**, 565–578 (2007).
- [65] Zirngibl, C., Dongen, W. V., Schworer, B., Bunau, R. V., Richter, M., Klein, A. & Thauer, R. K. H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur J Biochem* **208**, 511–520 (1992).
- [66] Vignais, P. M. & Billoud, B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases : an overview. *Chem Rev* **107**, 4206–4272 (2007).
- [67] Lyon, E. J., Shima, S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K. & Thauer, R. K. UV_A/blue-light inactivation of the metal-free hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur J Biochem* **271**, 195–204 (2004).
- [68] Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580–587 (1995).
- [69] Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A. & Albracht, S. P. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, biology's way to activate H₂. *J Biol Chem* **274**, 3331–3337 (1999).
- [70] Stephenson, M. & Stickland, L. H. Hydrogenase : a bacterial enzyme activating molecular hydrogen : The properties of the enzyme. *Biochem J* **25**, 205–214 (1931).
- [71] Ballantine, S. P. & Boxer, D. H. Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* **163**, 454–459 (1985).
- [72] Li, Y. & Zamble, D. B. Nickel homeostasis and nickel regulation : an overview. *Chem Rev* **109**, 4617–4643 (2009).
- [73] Sawers, R. G., Ballantine, S. P. & Boxer, D. H. Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K12 : evidence for a third isoenzyme. *J Bacteriol* **164**, 1324–1331 (1985).
- [74] Lukey, M. J., Parkin, A., Roessler, M. M., Murphy, B. J., Harmer, J., Palmer, T., Sargent, F. & Armstrong, F. A. How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *J Biol Chem* **285**, 3928–3938 (2010).
- [75] Sargent, F., Ballantine, S. P., Rugman, P. A., Palmer, T. & Boxer, D. H. Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit - identification of a soluble precursor of the small subunit in a *hypB* mutant. *Eur J Biochem* **255**, 746–754 (1998).
- [76] Dubini, A., Pye, R. L., Jack, R. L., Palmer, T. & Sargent, F. How bacteria get energy from hydrogen ? a genetic analysis of periplasmic hydrogen oxidation in *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1413–1420 (2002).
- [77] Rodrigue, A., Boxer, D. H., Mandrand-Berthelot, M. A. & Wu, L. F. Requirement for nickel of the transmembrane translocation of NiFe-hydrogenase 2 in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **392**, 81–86 (1996).
- [78] Giel, J. L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F. R. & Kiley, P. J. IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **60**, 1058–1075 (2006).
- [79] Richard, D. J., Sawers, G., Sargent, F., McWalter, L. & Boxer, D. H. Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe] hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli*. *Microbiology* **145**, 2903–2912 (1999).
- [80] Brondsted, L. & Atlung, T. Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 *hya* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 5423–5428 (1994).
- [81] King, P. W. & Przybyla, A. E. Response of *hya* expression to external pH in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 5250–5256 (1999).
- [82] Rossmann, R., Sawers, G. & Bock, A. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH : definition of the formate regulon. *Mol Microbiol* **5**, 2807–2814 (1991).
- [83] Bohm, R., Sauter, M. & Bock, A. Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol Microbiol* **4**, 231–243 (1990).

- [84] Hedderich, R. & Forzi, L. Energy-converting [NiFe] hydrogenases : more than just H₂ activation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**, 92–104 (2005).
- [85] Andrews, S. C., Berks, B. C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P. & Guest, J. R. A 12-cistron *Escherichia coli* operon *hypF* encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* **143**, 3633–3647 (1997).
- [86] Skibinski, D. A. G., Golby, P., Chang, Y. S., Sargent, F., Hoffman, R., Harper, R., Guest, J. R., Attwood, M. M., Berks, B. C. & Andrews, S. C. Regulation of the hydrogenase 4 operon of *Escherichia coli* by the σ 54-dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. *J Bacteriol* **184**, 6642–6653 (2002).
- [87] Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P. & Karplus, P. A. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* **268**, 998–1004 (1995).
- [88] Lutz, S., Jacobi, A., Schlenz, V., Bohm, R., Sawers, G. & Bock, A. Molecular characterization of an operon *hyp* necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 123–135 (1991).
- [89] Jacobi, A., Rossmann, R. & Bock, A. The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **158**, 444–451 (1992).
- [90] Hube, M., Blokesch, M. & Bock, A. Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli* : role of accessory proteins HypA and HybF. *J Bacteriol* **184**, 3879–3885 (2002).
- [91] Menon, N. K., Chatelus, C. Y., Dervartanian, M., Wendt, J. C., Shanmugam, K. T., Peck, H. D. & Przybyla, A. E. Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyp* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. *J Bacteriol* **176**, 4416–4423 (1994).
- [92] Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S. & Bock, A. Taming of a poison : biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science* **299**, 1067–1070 (2003).
- [93] Paschos, A., Bauer, A., Zimmermann, A., Zehelein, E. & Bock, A. HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J Biol Chem* **277**, 49945–49951 (2002).
- [94] Blokesch, M., Paschos, A., Bauer, A., Reissmann, S., Drapal, N. & Bock, A. Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *Eur J Biochem* **271**, 3428–3436 (2004).
- [95] Rangarajan, E. S., Asinas, A., Proteau, A., Munger, C., Baardsnes, J., Iannuzzi, P., Matte, A. & Cygler, M. Structure of [NiFe] hydrogenase maturation protein HypE from *Escherichia coli* and its interaction with HypF. *J Bacteriol* **190**, 1447–1458 (2008).
- [96] Blokesch, M., Albracht, S. P. J., Matzanke, B. F., Drapal, N. M., Jacobi, A. & Bock, A. The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *J Mol Biol* **344**, 155–167 (2004).
- [97] Drapal, N. & Bock, A. Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. *Biochemistry* **37**, 2941–2948 (1998).
- [98] Magalon, A. & Bock, A. Analysis of the HypC-HycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *J Biol Chem* **275**, 21114–21120 (2000).
- [99] Atanassova, A. & Zamble, D. B. *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *J Bacteriol* **187**, 4689–4697 (2005).
- [100] Blokesch, M., Rohmoser, M., Rode, S. & Bock, A. HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation. *J Bacteriol* **186**, 2603–2611 (2004).
- [101] Leach, M. R., Sandal, S., Sun, H. & Zamble, D. B. Metal binding activity of the *Escherichia coli* hydrogenase maturation factor HypB. *Biochemistry* **44**, 12229–12238 (2005).
- [102] Maier, T., Jacobi, A., Sauter, M. & Bock, A. The product of the *hypB* gene, which is required for nickel incorporation into hydrogenases, is a novel guanine nucleotide-binding protein. *J Bacteriol* **175**, 630–635 (1993).
- [103] Gasper, R., Scrima, A. & Wittinghofer, A. Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *J Biol Chem* **281**, 27492–27502 (2006).
- [104] Leach, M. R., Zhang, J. W. & Zamble, D. B. The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD. *J Biol Chem* **282**, 16177–16186 (2007).
- [105] Zhang, J. W., Butland, G., Greenblatt, J. F., Emili, A. & Zamble, D. B. A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **280**, 4360–4366 (2005).
- [106] Rodrigue, A., Batia, N., Muller, M., Fayet, O., Bohm, R., Mandrand-Berthelot, M. A. & Wu, L. F. Involvement of the GroE chaperonins in the nickel-dependent anaerobic biosynthesis of NiFe-hydrogenases of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 4453–4460 (1996).
- [107] Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F. & Bock, A. Maturation of the large subunit HycE of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur J Biochem* **220**, 377–384 (1994).
- [108] Rossmann, R., Maier, T., Lottspeich, F. & Bock, A. Characterisation of a protease from *Escherichia coli* involved in hydrogenase maturation. *Eur J Biochem* **227**, 545–550 (1995).
- [109] Theodoratou, E., Paschos, A., Magalon, A., Fritsche, E., Huber, R. & Bock, A. Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. *Eur J Biochem* **267**, 1995–1999 (2000).
- [110] Dubini, A. & Sargent, F. Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases : identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Lett* **549**, 141–146 (2003).
- [111] Clugston, S. L., Barnard, J. F., Kinach, R., Miedema, D., Ruman, R., Daub, E. & Honek, J. F. Overproduction and characterization of a dimeric non-zinc glyoxalase I from *Escherichia coli* : evidence for optimal activation by nickel ions. *Biochemistry* **37**, 8754–8763 (1998).
- [112] Sumner, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J Biol Chem* **69**, 435–441 (1926).
- [113] Dixon, N. E., Gazzola, T. C., Blakeley, R. L. & Zerner, B. Letter : Jack bean urease (EC 3.5.1.5). a metalloenzyme. a simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc* **97**, 4131–4133 (1975).
- [114] Nakano, M., Iida, T., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Takahashi, A., Tsukamoto, T., Yasunaga, T., Hayashi, T. & Honda, T. Association of the urease gene with enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains irrespective of their serogroups. *J Clin Microbiol* **39**, 4541–4543 (2001).
- [115] Collins, C. M. & D’Orazio, S. E. Bacterial ureases : structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol Microbiol* **9**, 907–913 (1993).
- [116] Todd, M. J. & Hausinger, R. P. Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes*. *J Biol Chem* **262**, 5963–5967 (1987).
- [117] Lee, M. H., Mulrooney, S. B., Renner, M. J., Markowicz, Y. & Hausinger, R. P. *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster : sequence of *ureD* and demonstration that four accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, and *ureG*) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. *J Bacteriol* **174**, 4324–4330 (1992).
- [118] Kim, J. K., Mulrooney, S. B. & Hausinger, R. P. Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins. *J Bacteriol* **187**, 7150–7154 (2005).
- [119] Park, I. S., Carr, M. B. & Hausinger, R. P. *In vitro* activation of urease apoprotein and role of UreD as a chaperone required for nickel metallocenter assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3233–3237 (1994).
- [120] Park, I. S. & Hausinger, R. P. Evidence for the presence of urease apoprotein complexes containing UreD, UreF, and UreG in cells that are competent for *in vivo* enzyme activation. *J Bacteriol* **177**, 1947–1951 (1995).
- [121] Moncrief, M. B. & Hausinger, R. P. Purification and activation properties of UreD-UreF-urease apoprotein complexes. *J Bacteriol* **178**, 5417–5421 (1996).

- [122] Mehta, N., Benoit, S. & Maier, R. J. Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient *Helicobacter pylori* colonization. *Microb Pathog* **35**, 229–234 (2003).
- [123] Moncrief, M. B. & Hausinger, R. P. Characterization of UreG, identification of a UreD-UreF-UreG complex, and evidence suggesting that a nucleotide-binding site in UreG is required for in vivo metallocenter assembly of *Klebsiella aerogenes* urease. *J Bacteriol* **179**, 4081–4086 (1997).
- [124] Stola, M., Musiani, F., Mangani, S., Turano, P., Safarov, N., Zambelli, B. & Ciurli, S. The nickel site of *Bacillus pasteurii* UreE, a urease metallo-chaperone, as revealed by metal-binding studies and X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* **45**, 6495–6509 (2006).
- [125] Mulrooney, S. B., Ward, S. K. & Hausinger, R. P. Purification and properties of the *Klebsiella aerogenes* UreE metal-binding domain, a functional metallochaperone of urease. *J Bacteriol* **187**, 3581–3585 (2005).
- [126] Lee, M. H., Pankratz, H. S., Wang, S., Scott, R. A., Finnegan, M. G., Johnson, M. K., Ippolito, J. A., Christianson, D. W. & Hausinger, R. P. Purification and characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein : a nickel-binding protein that functions in urease metallocenter assembly. *Protein Sci* **2**, 1042–1052 (1993).
- [127] Musiani, F., Zambelli, B., Stola, M. & Ciurli, S. Nickel trafficking : insights into the fold and function of UreE, a urease metallochaperone. *J Inorg Biochem* **98**, 803–813 (2004).
- [128] Thornalley, P. J. Glyoxalase I structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans* **31**, 1343–1348 (2003).
- [129] Hou, S. M., Nori, P., Fang, J. L. & Vaca, C. E. Methylglyoxal induces HPRT mutation and DNA adducts in human T-lymphocytes *in vitro*. *Environ Mol Mutagen* **26**, 286–291 (1995).
- [130] Lo, T. W., Westwood, M. E., McLellan, A. C., Selwood, T. & Thornalley, P. J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. a kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, N alpha-acetyllysine and bovine serum albumin. *J Biol Chem* **269**, 32299–32305 (1994).
- [131] Aronsson, A. C., Marmstal, E. & Mannervik, B. Glyoxalase I, a zinc metalloenzyme of mammals and yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 1235–1240 (1978).
- [132] Rhee, H., Murata, K. & Kimura, A. Molecular cloning of the *Pseudomonas putida* glyoxalase I gene in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **147**, 831–838 (1987).
- [133] Cameron, A. D., Olin, B., Ridderstrom, M., Mannervik, B. & Jones, T. A. Crystal structure of human glyoxalase I evidence for gene duplication and 3D domain swapping. *EMBO J* **16**, 3386–3395 (1997).
- [134] Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J. & Jahn, D. Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 275–285 (2002).
- [135] Reynolds, P. R., Mottur, G. P. & Bradbeer, C. Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*. some observations on the roles of the gene products of BtuC and TonB. *J Biol Chem* **255**, 4313–4319 (1980).
- [136] DeVeaux, L. C. & Kadner, R. J. Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli* : cloning of the *btuCD* region. *J Bacteriol* **162**, 888–896 (1985).
- [137] Cadieux, N., Bradbeer, C., Reeger-Schneider, E., Koster, W., Mohanty, A. K., Wiener, M. C. & Kadner, R. J. Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 706–717 (2002).
- [138] Borths, E. L., Locher, K. P., Lee, A. T. & Rees, D. C. The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16642–16647 (2002).
- [139] Youn, H. D., Kim, E. J., Roe, J. H., Hah, Y. C. & Kang, S. O. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J* **318**, 889–896 (1996).
- [140] Wuerges, J., Lee, J. W., Yim, Y. I., Yim, H. S., Kang, S. O. & Djinovic-Carugo, K. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8569–8574 (2004).
- [141] Bonam, D. & Ludden, P. W. Purification and characterization of carbon monoxide dehydrogenase, a nickel, zinc, iron-sulfur protein, from *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* **262**, 2980–2987 (1987).
- [142] Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R. & Meyer, O. Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* **293**, 1281–1285 (2001).
- [143] Kerby, R. L., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. *In vivo* nickel insertion into the carbon monoxide dehydrogenase of *Rhodospirillum rubrum* : molecular and physiological characterization of *cooCTJ*. *J Bacteriol* **179**, 2259–2266 (1997).
- [144] Kaluarachchi, H., Chung, K. C. C. & Zamble, D. B. Microbial nickel proteins. *Nat Prod Rep* **27**, 681–694 (2010).
- [145] Doukov, T. I., Iverson, T. M., Seravalli, J., Ragsdale, S. W. & Drennan, C. L. A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science* **298**, 567–572 (2002).
- [146] Thauer, R. K. & Bonacker, L. G. Biosynthesis of coenzyme F430, a nickel porphyrinoid involved in methanogenesis. *Ciba Found Symp* **180**, 210–222; discussion 222–7 (1994).
- [147] Dai, Y., Wensink, P. C. & Abeles, R. H. One protein, two enzymes. *J Biol Chem* **274**, 1193–1195 (1999).
- [148] Pochapsky, T. C., Sondej-Pochapsky, S., Ju, T., Mo, H., Al-Mjeni, F. & Maroney, M. J. Modeling and experiment yields the structure of acireductone dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Struct Biol* **9**, 966–972 (2002).
- [149] Andreini, C., Bertini, I. & Rosato, A. Metalloproteomes : a bioinformatic approach. *Acc Chem Res* **42**, 1471–1479 (2009).
- [150] Kosman, D. J. Multicopper oxidases : a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *J Biol Inorg Chem* **15**, 15–28 (2010).
- [151] Park, M. H., Wong, B. B. & Lusk, J. E. Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli* : genetics and physiology. *J Bacteriol* **126**, 1096–1103 (1976).
- [152] Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D. H., Kucharski, L. M., Maguire, M. E. & Rensing, C. The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* **187**, 1604–1611 (2005).
- [153] Roth, J. R., Lawrence, J. G. & Bobik, T. A. Cobalamin (coenzyme B12) : synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* **50**, 137–181 (1996).
- [154] Ben-Bassat, A., Bauer, K., Chang, S. Y., Myambo, K., Boosman, A. & Chang, S. Processing of the initiation methionine from proteins : properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J Bacteriol* **169**, 751–757 (1987).
- [155] D'souza, V. M. & Holz, R. C. The methionyl aminopeptidase from *Escherichia coli* can function as an iron(II) enzyme. *Biochemistry* **38**, 11079–11085 (1999).
- [156] Oganessian, V. S., White, G. F., Field, S., Marritt, S., Gennis, R. B., Yap, L. L. & Thomson, A. J. Nitroxide spin labels as EPR reporters of the relaxation and magnetic properties of the heme-copper site in cytochrome *bo3* of *E. coli*. *J Biol Inorg Chem* (2010).
- [157] Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. Occurrence of copper proteins through the three domains of life : a bioinformatic approach. *J Proteome Res* **7**, 209–216 (2008).
- [158] Huffman, D. L. & O'Halloran, T. V. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* **70**, 677–701 (2001).
- [159] Davis, A. V. & O'Halloran, T. V. A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol* **4**, 148–151 (2008).
- [160] Solomon, E. I., Szilagyi, R. K., George, S. D. & Basumallick, L. Electronic structures of metal sites in proteins and models : contributions to function in blue copper proteins. *Chem Rev* **104**, 419–458 (2004).

- [161] Sakurai, T. & Kataoka, K. Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2642–2656 (2007).
- [162] Ryden, L. & Lundgren, J. O. On the evolution of blue proteins. *Biochimie* **61**, 781–790 (1979).
- [163] Quintanar, L., Stoj, C., Taylor, A. B., Hart, P. J., Kosman, D. J. & Solomon, E. I. Shall we dance? how a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. *Acc Chem Res* **40**, 445–452 (2007).
- [164] Beinert, H. Copper A of cytochrome c oxidase, a novel, long-embattled, biological electron-transfer site. *Eur J Biochem* **245**, 521–532 (1997).
- [165] Turski, M. L. & Thiele, D. J. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling and disease. *J Biol Chem* **284**, 717–721 (2009).
- [166] Tottey, S., Rich, P. R., Rondet, S. A. & Robinson, N. J. Two Menkes-type ATPases supply copper for photosynthesis in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* **276**, 19999–20004 (2001).
- [167] Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R. & Solioz, M. An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*. *Ann N Y Acad Sci* **671**, 484–486 (1992).
- [168] Lewinson, O., Lee, A. T. & Rees, D. C. A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4677–4682 (2009).
- [169] Chillappagari, S., Miethke, M., Trip, H., Kuipers, O. P. & Marahiel, M. A. Copper acquisition is mediated by YcnJ and regulated by YcnK and CsoR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **191**, 2362–2370 (2009).
- [170] Koster, W. Iron(III) hydroxamate transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biol Met* **4**, 23–32 (1991).
- [171] Ozenberger, B. A., Nahlik, M. S. & McIntosh, M. A. Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 3638–3646 (1987).
- [172] Staudenmaier, H., Hove, B. V., Yaraghi, Z. & Braun, V. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**, 2626–2633 (1989).
- [173] Cao, J., Woodhall, M. R., Alvarez, J., Cartron, M. L. & Andrews, S. C. EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K12 but functional in *E. coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **65**, 857–875 (2007).
- [174] Cartron, M. L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C. J. & Andrews, S. C. Feo-transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**, 143–157 (2006).
- [175] Grass, G., Wong, M. D., Rosen, B. P., Smith, R. L. & Rensing, C. ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 864–866 (2002).
- [176] Patzer, S. I. & Hantke, K. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**, 1199–1210 (1998).
- [177] Ridge, P. G., Zhang, Y. & Gladyshev, V. N. Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS One* **3**, e1378 (2008).
- [178] Branden, G., Gennis, R. B. & Brzezinski, P. Transmembrane proton translocation by cytochrome C oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1052–1063 (2006).
- [179] Ueda, J., Takai, M., Shimazu, Y. & Ozawa, T. Reactive oxygen species generated from the reaction of copper(II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. *Arch Biochem Biophys* **357**, 231–239 (1998).
- [180] Cabiscol, E., Tamarit, J. & Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3**, 3–8 (2000).
- [181] Stadtman, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **62**, 797–821 (1993).
- [182] Kasprzak, K. S. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **32**, 958–967 (2002).
- [183] Aertsen, A. & Michiels, C. W. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit Rev Microbiol* **30**, 263–273 (2004).
- [184] Haferburg, G., Kloess, G., Schmitz, W. & Kothe, E. Ni-struvite - a new biomineral formed by a nickel resistant *Streptomyces acidiscabies*. *Chemosphere* **72**, 517–523 (2008).
- [185] Fouquet, Y., Stackelberg, U. V., Charlou, J. L., Donval, J. P., Erzinger, J., Foucher, J. P., Herzig, P., Muheparall, R., Soakai, S., Wiedicke, M. & Whitechurch, H. Hydrothermal activity and metallogenesis in the Lau back-arc basin. *Nature* **349**, 778–781 (1991).
- [186] Rouch, D. A., Lee, B. T. & Morby, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents : a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J Ind Microbiol* **14**, 132–141 (1995).
- [187] Bruins, M. R., Kapil, S. & Oehme, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **45**, 198–207 (2000).
- [188] Faber, F., Egli, T. & Harder, W. Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiol Lett* **111**, 189–195 (1993).
- [189] Turner, J. S. & Robinson, N. J. Cyanobacterial metallothioneins : biochemistry and molecular genetics. *J Ind Microbiol* **14**, 119–125 (1995).
- [190] Robinson, N. J., Whitehall, S. K. & Cavet, J. S. Microbial metallothioneins. *Adv Microb Physiol* **44**, 183–213 (2001).
- [191] Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Parkinson, J. A., Bowness, P. W., Sadler, P. J. & Robinson, N. J. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol Microbiol* **45**, 1421–1432 (2002).
- [192] Higham, D. P., Sadler, P. J. & Scawen, M. D. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* **225**, 1043–1046 (1984).
- [193] Gold, B., Deng, H., Bryk, R., Vargas, D., Eliezer, D., Roberts, J., Jiang, X. & Nathan, C. Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nat Chem Biol* **4**, 609–616 (2008).
- [194] Scott, J. A. & Palmer, S. J. Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.* **10**, 21–24 (1988).
- [195] Barkay, T., Miller, S. M. & Summers, A. O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 355–384 (2003).
- [196] Wilson, J. R., Leang, C., Morby, A. P., Hobman, J. L. & Brown, N. L. MerF is a mercury transport protein : different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? *FEBS Lett* **472**, 78–82 (2000).
- [197] Engst, S. & Miller, S. M. Rapid reduction of Hg(II) by mercuric ion reductase does not require the conserved C-terminal cysteine pair using HgBr₂ as the substrate. *Biochemistry* **38**, 853–854 (1999).
- [198] Mukhopadhyay, R. & Rosen, B. P. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect* **110**, 745–748 (2002).
- [199] Mitra, R. S. & Bernstein, I. A. Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd²⁺. *J Bacteriol* **133**, 75–80 (1978).
- [200] Mitra, R. S. & Bernstein, I. A. Nature of the repair process associated with the recovery of *Escherichia coli* after exposure to Cd²⁺. *Biochem Biophys Res Commun* **74**, 1450–1455 (1977).
- [201] Nies, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 313–339 (2003).
- [202] Silver, S. & Walderhaug, M. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev* **56**, 195–228 (1992).
- [203] Seeger, M. A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Friederichs, K. & Pos, K. M. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**, 1295–1298 (2006).
- [204] Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A. & Saier, M. H. The RND permease superfamily : an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 107–125 (1999).

- [205] Goldberg, M., Pribyl, T., Juhnke, S. & Nies, D. H. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem* **274**, 26065–26070 (1999).
- [206] Andersen, C., Hughes, C. & Koronakis, V. Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 412–416 (2001).
- [207] Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S. & Saier, M. H. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 1–8 (1997).
- [208] Dong, Q. & Mergeay, M. *czc/cnr* efflux : a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein. *Mol Microbiol* **14**, 185–187 (1994).
- [209] van der Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Baeyens, W., Mergeay, M. & Nies, D. H. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* **23**, 493–503 (1997).
- [210] Hoch, J. A. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–171 (2000).
- [211] Ferhat, M., Atlan, D., Vianney, A., Lazzaroni, J. C., Doublet, P. & Gilbert, C. The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. *PLoS One* **4**, e7732 (2009).
- [212] Lu, M., Chai, J. & Fu, D. Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1063–1067 (2009).
- [213] Saier, M. H. Families of proteins forming transmembrane channels. *J Membr Biol* **175**, 165–180 (2000).
- [214] Anton, A., Grosse, C., Reissmann, J., Pribyl, T. & Nies, D. H. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia sp.* strain CH34. *J Bacteriol* **181**, 6876–6881 (1999).
- [215] Anton, A., Weltrowski, A., Haney, C. J., Franke, S., Grass, G., Rensing, C. & Nies, D. H. Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 7499–7507 (2004).
- [216] Lu, M. & Fu, D. Structure of the zinc transporter YiiP. *Science* **317**, 1746–1748 (2007).
- [217] Ma, Z., Jacobsen, F. E. & Giedroc, D. P. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem Rev* **109**, 4644–4681 (2009).
- [218] Fagan, M. J. & Saier, M. H. P-type ATPases of eukaryotes and bacteria : sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol* **38**, 57–99 (1994).
- [219] Fan, B. & Rosen, B. P. Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *J Biol Chem* **277**, 46987–46992 (2002).
- [220] Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B. & Rosen, B. P. CopA : An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 652–656 (2000).
- [221] Tsai, K. J., Lin, Y. F., Wong, M. D., Yang, H. H. C., Fu, H. L. & Rosen, B. P. Membrane topology of the P1258 CadA Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-translocating P-type ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **34**, 147–156 (2002).
- [222] Bal, N., Mintz, E., Guillaing, F. & Catty, P. A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd²⁺-ATPase. *FEBS Lett* **506**, 249–252 (2001).
- [223] Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A. & O'Halloran, T. V. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**, 30670–30677 (2001).
- [224] Franke, S., Grass, G., Rensing, C. & Nies, D. H. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**, 3804–3812 (2003).
- [225] Kittleson, J. T., Loftin, I. R., Hausrath, A. C., Engelhardt, K. P., Rensing, C. & McEvoy, M. M. Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both Cu(I) and Ag(I). *Biochemistry* **45**, 11096–11102 (2006).
- [226] Xue, Y., Davis, A. V., Balakrishnan, G., Stasser, J. P., Staehlin, B. M., Focia, P., Spiro, T. G., Penner-Hahn, J. E. & O'Halloran, T. V. Cu(I) recognition via cation- π and methionine interactions in CusF. *Nat Chem Biol* **4**, 107–109 (2008).
- [227] Loftin, I. R., Blackburn, N. J. & McEvoy, M. M. Tryptophan Cu(I)- π interaction fine-tunes the metal binding properties of the bacterial metallochaperone CusF. *J Biol Inorg Chem* **14**, 905–912 (2009).
- [228] Bagai, I., Rensing, C., Blackburn, N. J. & McEvoy, M. M. Direct metal transfer between periplasmic proteins identifies a bacterial copper chaperone. *Biochemistry* **47**, 11408–11414 (2008).
- [229] Rensing, C. & Grass, G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 197–213 (2003).
- [230] Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B. P. & Mitra, B. The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 3873–3878 (2000).
- [231] Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H. & Munkelt, D. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* **183**, 9–18 (2005).
- [232] Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H. & Rensing, C. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 4664–4667 (2001).
- [233] Rodrigue, A., Effantin, G. & Mandrand-Berthelot, M. A. Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 2912–2916 (2005).
- [234] Ranquet, C., de Choudens, S. O., Loiseau, L., Barras, F. & Fontecave, M. Cobalt stress in *Escherichia coli*. the effect on the iron-sulfur proteins. *J Biol Chem* **282**, 30442–30451 (2007).
- [235] Fantino, J. R., Py, B., Fontecave, M. & Barras, F. A genetic analysis of the response of *Escherichia coli* to cobalt stress. *Environ Microbiol* **12** (2010).
- [236] Grass, G., Grosse, C. & Nies, D. H. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia sp.* strain CH34. *J Bacteriol* **182**, 1390–1398 (2000).
- [237] Stahler, F. N., Odenbreit, S., Haas, R., Wilrich, J., Vliet, A. H. M. V., Kusters, J. G., Kist, M. & Bereswill, S. The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. *Infect Immun* **74**, 3845–3852 (2006).
- [238] Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Lemke, K., Schlegel, H. G. & Rensing, C. NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J Bacteriol* **183**, 2803–2807 (2001).
- [239] Marrero, J., Auling, G., Coto, O. & Nies, D. H. High-level resistance to cobalt and nickel but probably no transenvelope efflux : Metal resistance in the cuban *Serratia marcescens* strain C-1. *Microb Ecol* **53**, 123–133 (2007).
- [240] Haritha, A., Sagar, K. P., Tiwari, A., Kiranmayi, P., Rodrigue, A., Mohan, P. M. & Singh, S. S. MrdH, a novel metal resistance determinant of *Pseudomonas putida* KT2440, is flanked by metal-inducible mobile genetic elements. *J Bacteriol* **191**, 5976–5987 (2009).
- [241] Contreras, M., Thiberge, J. M., Mandrand-Berthelot, M. A. & Labigne, A. Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **49**, 947–963 (2003).
- [242] Ge, R., Watt, R. M., Sun, X., Tanner, J. A., He, Q. Y., Huang, J. D. & Sun, H. Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn : potential for Ni²⁺ storage in *Helicobacter pylori*. *Biochem J* **393**, 285–293 (2006).
- [243] Zeng, Y. B., Zhang, D. M., Li, H. & Sun, H. Binding of Ni²⁺ to a histidine and glutamine rich protein, Hpn-like. *J Biol Inorg Chem* **13**, 1121–1131 (2008).
- [244] Roberts, S. A., Wildner, G. F., Grass, G., Weichsel, A., Ambrus, A., Rensing, C. & Montfort, W. R. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *J Biol Chem* **278**, 31958–31963 (2003).

- [245] Linder, M. C. & Hazegh-Azam, M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* **63**, 797S–811S (1996).
- [246] Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V. & Mondragon, A. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* **301**, 1383–1387 (2003).
- [247] Macomber, L., Rensing, C. & Imlay, J. A. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 1616–1626 (2007).
- [248] Macomber, L. & Imlay, J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8344–8349 (2009).
- [249] Grass, G. & Rensing, C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 902–908 (2001).
- [250] Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C. & Montfort, W. R. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 7815–7817 (2004).
- [251] Solomon, E. I., Sundaram, U. M. & Machonkin, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* **96**, 2563–2606 (1996).
- [252] Cole, A. P., Root, D. E., Mukherjee, P., Solomon, E. I. & Stack, T. D. A trinuclear intermediate in the copper-mediated reduction of O₂ : four electrons from three coppers. *Science* **273**, 1848–1850 (1996).
- [253] Zhang, L., Koay, M., Maher, M. J., Xiao, Z. & Wedd, A. G. Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. crystal structures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms. *J Am Chem Soc* **128**, 5834–5850 (2006).
- [254] Wu, M. Y., Suryanarayanan, K., van Ooij, W. J. & Oerther, D. B. Using microbial genomics to evaluate the effectiveness of silver to prevent biofilm formation. *Water Sci Technol* **55**, 413–419 (2007).
- [255] Stoyanov, J. V. & Brown, N. L. The *Escherichia coli* copper-responsive *copA* promoter is activated by gold. *J Biol Chem* **278**, 1407–1410 (2003).
- [256] Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. & Brown, N. L. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* **39**, 502–511 (2001).
- [257] Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W. & O'Halloran, T. V. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* **182**, 5864–5871 (2000).
- [258] Tetaz, T. J. & Luke, R. K. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **154**, 1263–1268 (1983).
- [259] Lee, S. M., Grass, G., Rensing, C., Barrett, S. R., Yates, C. J. D., Stoyanov, J. V. & Brown, N. L. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 616–620 (2002).
- [260] Mellano, M. A. & Cooksey, D. A. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J Bacteriol* **170**, 2879–2883 (1988).
- [261] Rouch, D. A. & Brown, N. L. Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. *Microbiology* **143**, 1191–1202 (1997).
- [262] Huffman, D. L., Huyett, J., Outten, F. W., Doan, P. E., Finney, L. A., Hoffman, B. M. & O'Halloran, T. V. Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential components of *Escherichia coli* *pco* copper resistance operon. *Biochemistry* **41**, 10046–10055 (2002).
- [263] Djoko, K. Y., Xiao, Z. & Wedd, A. G. Copper resistance in *E. coli* : the multicopper oxidase PcoA catalyzes oxidation of copper(I) in Cu(I)Cu(II)-PcoC. *Chembiochem* **9**, 1579–1582 (2008).
- [264] Silver, S. Bacterial silver resistance : molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 341–353 (2003).
- [265] Cobine, P. A., George, G. N., Jones, C. E., Wickramasinghe, W. A., Solioz, M. & Dameron, C. T. Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn(II)CopY : metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry* **41**, 5822–5829 (2002).
- [266] Solioz, M. & Odermatt, A. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **270**, 9217–9221 (1995).
- [267] Odermatt, A., Krapf, R. & Solioz, M. Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺, and Ag⁺ extrusion by CopB. *Biochem Biophys Res Commun* **202**, 44–48 (1994).
- [268] Lu, Z. H., Dameron, C. T. & Solioz, M. The *Enterococcus hirae* paradigm of copper homeostasis : copper chaperone turnover, interactions, and transactions. *Biometals* **16**, 137–143 (2003).
- [269] Magnani, D. & Solioz, M. Copper chaperone cycling and degradation in the regulation of the *cop* operon of *Enterococcus hirae*. *Biometals* **18**, 407–412 (2005).
- [270] Multhaup, G., Strausak, D., Bissig, K. D. & Solioz, M. Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of *Enterococcus hirae* assessed by surface plasmon resonance. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 172–177 (2001).
- [271] Giedroc, D. P. & Arunkumar, A. I. Metal sensor proteins : nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Trans* **29**, 3107–3120 (2007).
- [272] Wu, J. & Rosen, B. P. Metalloregulated expression of the *ars* operon. *J Biol Chem* **268**, 52–58 (1993).
- [273] O'Halloran, T. V. & Walsh, C. Metalloregulatory DNA-binding protein encoded by the *merR* gene : isolation and characterization. *Science* **235**, 211–214 (1987).
- [274] Utschig, L. M., Bryson, J. W. & O'Halloran, T. V. ¹⁹⁹Hg NMR of the metal receptor site in MerR and its protein-DNA complex. *Science* **268**, 380–385 (1995).
- [275] Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 145–163 (2003).
- [276] Hobman, J. L. MerR family transcription activators : similar designs, different specificities. *Mol Microbiol* **63**, 1275–1278 (2007).
- [277] Song, L., Teng, Q., Phillips, R. S., Brewer, J. M. & Summers, A. O. ¹⁹F-NMR reveals metal and operator-induced allostery in MerR. *J Mol Biol* **371**, 79–92 (2007).
- [278] Schreiter, E. R., Wang, S. C., Zamble, D. B. & Drennan, C. L. NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13676–13681 (2006).
- [279] Abed, N., Bickle, M., Mari, B., Schapira, M., Sanjuan-Espana, R., Sermesant, K. R., Moncorgé, O., Mouradian-Garcia, S., Barbry, P., Rudkin, B. B., Fauvarque, M. O., Michaud-Soret, I. & Colas, P. A comparative analysis of perturbations caused by a gene knock-out, a dominant negative allele, and a set of peptide aptamers. *Mol Cell Proteomics* **6**, 2110–2121 (2007).
- [280] Ahn, B. E., Cha, J., Lee, E. J., Han, A. R., Thompson, C. J. & Roe, J. H. Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **59**, 1848–1858 (2006).
- [281] Baichoo, N. & Helmann, J. D. Recognition of DNA by Fur : a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**, 5826–5832 (2002).
- [282] D'Autreaux, B., Pecqueur, L., de Peredo, A. G., Diederix, R. E. M., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E. & Michaud-Soret, I. Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* Fur protein. *Biochemistry* **46**, 1329–1342 (2007).
- [283] Pecqueur, L., D'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I. & Bersch, B. Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* **281**, 21286–21295 (2006).
- [284] Hamed, M. Y. Binding of the ferric uptake regulation repressor protein Fur to Mn(II), Fe(II), Co(II), and Cu(II) ions as co-repressors : electronic absorption, equilibrium, and ⁵⁷Fe Mossbauer studies. *J Inorg Biochem* **50**, 193–210 (1993).
- [285] Hantke, K. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 172–177 (2001).
- [286] de Pina, K., Desjardin, V., Mandrand-Berthelot, M. A., Giordano, G. & Wu, L. F. Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 670–674 (1999).

- [287] Chivers, P. T. & Sauer, R. T. NikR is a ribbon-helix-helix DNA-binding protein. *Protein Sci* **8**, 2494–2500 (1999).
- [288] Schreiter, E. R., Sintchak, M. D., Guo, Y., Chivers, P. T., Sauer, R. T. & Drennan, C. L. Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat Struct Biol* **10**, 794–799 (2003).
- [289] Chivers, P. T. & Sauer, R. T. NikR repressor : high-affinity nickel binding to the C-terminal domain regulates binding to operator DNA. *Chem Biol* **9**, 1141–1148 (2002).
- [290] Diederix, R. E. M., Fauquant, C., Rodrigue, A., Mandrand-Berthelot, M. A. & Michaud-Soret, I. Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II). *Chem Commun (Camb)* **15**, 1813–1815 (2008).
- [291] Bloom, S. L. & Zamble, D. B. Metal-selective DNA-binding response of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* **43**, 10029–10038 (2004).
- [292] Wang, S. C., Li, Y., Ho, M., Bernal, M. E., Sydor, A. M., Kagzi, W. R. & Zamble, D. B. The response of *Escherichia coli* NikR to nickel : A second Ni(II)-binding site. *Biochemistry* **49**, 6635–6645 (2010).
- [293] Zambelli, B., Bellucci, M., Danielli, A., Scarlato, V. & Ciurli, S. The Ni²⁺ binding properties of *Helicobacter pylori* NikR. *Chem Commun (Camb)* **35**, 3649–3651 (2007).
- [294] Bahlawane, C., Dian, C., Muller, C., Round, A., Fauquant, C., Schauer, K., de Reuse, H., Terradot, L. & Michaud-Soret, I. Structural and mechanistic insights into *Helicobacter pylori* NikR activation. *Nucleic Acids Res* **38**, 3106–3118 (2010).
- [295] Tal, N. & Schuldiner, S. A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9051–9056 (2009).
- [296] Rouault, T. & Klausner, R. Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Curr Top Cell Regul* **35**, 1–19 (1997).
- [297] Tang, Y. & Guest, J. R. Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. *Microbiology* **145**, 3069–3079 (1999).
- [298] Alen, C. & Sonenshein, A. L. *Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10412–10417 (1999).
- [299] Masse, E. & Gottesman, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4620–4625 (2002).
- [300] Afonyushkin, T., Vecerek, B., Moll, I., Blasi, U. & Kamberin, V. R. Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA *ryhB*. *Nucleic Acids Res* **33**, 1678–1689 (2005).
- [301] Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. & Yamaguchi, A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**, 173–179 (2006).
- [302] Kim, B. E., Nevitt, T. & Thiele, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* **4**, 176–185 (2008).
- [303] Tottey, S., Waldron, K. J., Firbank, S. J., Reale, B., Bessant, C., Sato, K., Cheek, T. R., Gray, J., Banfield, M. J., Dennison, C. & Robinson, N. J. Protein folding location can regulate manganese binding versus copper or zinc binding. *Nature* **455**, 1138–1142 (2008).
- [304] Kim, H. J., Graham, D. V., DiSpirito, A. A., Alterman, M. A., Galeva, N., Larive, C. K., Asunskis, D. & Sherwood, P. M. A. Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. *Science* **305**, 1612–1615 (2004).
- [305] Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S. & Wikstrom, M. The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat Struct Biol* **7**, 910–917 (2000).
- [306] Kamau, P. & Jordan, R. B. Kinetic study of the oxidation of catechol by aqueous copper(II). *Inorg Chem* **41**, 3076–3083 (2002).
- [307] Grass, G., Thakali, K., Klebba, P. E., Thieme, D., Muller, A., Wildner, G. F. & Rensing, C. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 5826–5833 (2004).
- [308] Blaha, D., Arous, S., Bleriot, C., Dorel, C., Mandrand-Berthelot, M.-A. & Rodrigue, A. The *Escherichia coli* metallo-regulator RcnR represses *rcnA* and *rcnR* transcription through binding on a shared operator site : Insights into regulatory specificity towards nickel and cobalt. *Biochimie* **93**, 434–439 (2011).
- [309] Iwig, J. S., Rowe, J. L. & Chivers, P. T. Nickel homeostasis in *Escherichia coli* - the *rcnR-rcnA* efflux pathway and its linkage to NikR function. *Mol Microbiol* **62**, 252–262 (2006).
- [310] Koch, D., Nies, D. H. & Grass, G. The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli* : a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *Biometals* **20**, 759–771 (2007).
- [311] Iwig, J. S., Leitch, S., Herbst, R. W., Maroney, M. J. & Chivers, P. T. Ni(II) and Co(II) sensing by *Escherichia coli* RcnR. *J Am Chem Soc* **130**, 7592–7606 (2008).
- [312] Iwig, J. S. & Chivers, P. T. DNA recognition and wrapping by *Escherichia coli* RcnR. *J Mol Biol* **393**, 514–526 (2009).
- [313] Bardonnet, N. & Blanco, C. *uidA* antibiotic resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol Lett* **72**, 243–247 (1992).
- [314] Wu, L. F., Mandrand-Berthelot, M. A., Waugh, R., Edmonds, C. J., Holt, S. E. & Boxer, D. H. Nickel deficiency gives rise to the defective hydrogenase phenotype of *hydC* and *fnr* mutants in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **3**, 1709–1718 (1989).
- [315] Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. *Science* **277**, 1453–1462 (1997).
- [316] Grass, G. & Rensing, C. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 2145–2147 (2001).
- [317] Masuoka, J., Hegenauer, J., Van Dyke, B. R. & Saltman, P. Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of zinc(II) and copper(II) to the high affinity site of serum albumin. *J Biol Chem* **268**, 21533–21537 (1993).
- [318] Iwig, J. S. & Chivers, P. T. Coordinating intracellular nickel-metal-site structure-function relationships and the NikR and RcnR repressors. *Nat Prod Rep* **27**, 658–667 (2010).
- [319] Okamoto, S., van Petegem, F., Patrauchan, M. A. & Eltis, L. D. AnhE, a metallochaperone involved in the maturation of a cobalt-dependent nitrile hydratase. *J Biol Chem* **285**, 25126–25133 (2010).
- [320] Hiron, A., Posteraro, B., Carriere, M., Remy, L., Delporte, C., Sorda, M. L., Sanguinetti, M., Juillard, V. & Borezee-Durant, E. A nickel ABC-transporter of *Staphylococcus aureus* is involved in urinary tract infection. *Mol Microbiol* (2010).
- [321] Tian, J., Wu, N., Li, J., Liu, Y., Guo, J., Yao, B. & Fan, Y. Nickel-resistant determinant from *Leptospirillum ferriphilum*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2364–2368 (2007).
- [322] Park, J. E., Schlegel, H. G., Rhie, H. G. & Lee, H. S. Nucleotide sequence and expression of the *ncr* nickel and cobalt resistance in *Hafnia alvei* 5-5. *Int Microbiol* **7**, 27–34 (2004).
- [323] Ren, Y., Ren, Y., Zhou, Z., Guo, X., Li, Y., Feng, L. & Wang, L. Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* type strain ATCC 13047. *J Bacteriol* **192**, 2463–2464 (2010).
- [324] Tetsch, L. & Jung, K. How are signals transduced across the cytoplasmic membrane? transport proteins as transmitter of information. *Amino Acids* **37**, 467–477 (2009).
- [325] Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunesekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R. & Bateman, A. The pfam protein families database. *Nucleic Acids Research Database Issue* **38**, 211–222 (2010).
- [326] Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. & O'Halloran, T. V. Undetectable intracellular free copper : the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805–808 (1999).

- [327] Zhou, L., Singleton, C. & Brun, N. E. L. High Cu(I) and low proton affinities of the CXXC motif of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochem J* **413**, 459–465 (2008).
- [328] Jackson, G. S., Murray, I., Hosszu, L. L., Gibbs, N., Waltho, J. P., Clarke, A. R. & Collinge, J. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8531–8535 (2001).
- [329] Monchy, S., Benotmane, M. A., Wattiez, R., van Aelst, S., Auquier, V., Borremans, B., Mergeay, M., Taghavi, S., van der Lelie, D. & Vallaeyts, T. Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Microbiology* **152**, 1765–1776 (2006).
- [330] Chong, L. X., Ash, M. R., Maher, M. J., Hinds, M. G., Xiao, Z. & Wedd, A. G. Unprecedented binding cooperativity between Cu(I) and Cu(II) in the copper resistance protein CopK from *Cupriavidus metallidurans* CH34 : implications from structural studies by NMR spectroscopy and X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* **131**, 3549–3564 (2009).
- [331] Sarret, G., Favier, A., Coves, J., Hazemann, J. L., Mergeay, M. & Bersch, B. CopK from *Cupriavidus metallidurans* CH34 binds Cu(I) in a tetrathioether site : characterization by X-ray absorption and NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **132**, 3770–3777 (2010).
- [332] Pontel, L. B. & Soncini, F. C. Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in gram negative bacteria. *Mol Microbiol* **73**, 212–225 (2009).
- [333] Osman, D., Waldron, K. J., Denton, H., Taylor, C. M., Grant, A. J., Mastroeni, P., Robinson, N. J. & Cavet, J. S. Copper homeostasis in *Salmonella* is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. *J Biol Chem* **285**, 25259–25268 (2010).
- [334] Rienzo, F. D., Gabdoulline, R. R., Wade, R. C., Sola, M. & Menziani, M. C. Computational approaches to structural and functional analysis of plastocyanin and other blue copper proteins. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1123–1142 (2004).
- [335] Rajasekaran, M. B., Nilapwar, S., Andrews, S. C. & Watson, K. A. EfeO-cupredoxins : major new members of the cupredoxin superfamily with roles in bacterial iron transport. *Biomaterials* **23**, 1–17 (2010).
- [336] Kasprzak, K. S., Sunderman, F. W. & Salnikow, K. Nickel carcinogenesis. *Mutat Res* **533**, 67–97 (2003).
- [337] Egler, M., Grosse, C., Grass, G. & Nies, D. H. Role of the extracytoplasmic function protein family σ factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 2297–2307 (2005).
- [338] Perrin, C., Briandet, R., Jubelin, G., Lejeune, P., Mandrand-Berthelot, M. A., Rodrigue, A. & Dorel, C. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K12 strains that produce curli. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1723–1733 (2009).
- [339] Tree, J. J., Ulett, G. C., Hobman, J. L., Constantini-dou, C., Brown, N. L., Kershaw, C., Schembri, M. A., Jennings, M. P. & McEwan, A. G. The multicopper oxidase (CueO) and cell aggregation in *Escherichia coli*. *Environ Microbiol* **9**, 2110–2116 (2007).
- [340] Hasman, H., Chakraborty, T. & Klemm, P. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J Bacteriol* **181**, 4834–4841 (1999).
- [341] Kjaergaard, K., Schembri, M. A., Hasman, H. & Klemm, P. Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **182**, 4789–4796 (2000).
- [342] Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113–130 (1986).
- [343] Woodcock, D. W., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469–3478 (1989).
- [344] Bachmann, B. J. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol Rev* **36**, 525–557 (1972).
- [345] Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a *Mulac* bacteriophage : in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4530–4533 (1979).
- [346] Gough, J. A. & Murray, N. E. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* **166**, 1–19 (1983).
- [347] Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103–119 (1985).
- [348] Miller, W. G., Leveau, J. H. & Lindow, S. E. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1243–1250 (2000).
- [349] Miller, J. H. *Experiments in molecular genetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1972).
- [350] Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–1523 (1979).
- [351] Vogelstein, B. & Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615–619 (1979).
- [352] Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli* : transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172–2175 (1989).
- [353] Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640–6645 (2000).
- [354] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- [355] Schagger, H. & Jagow, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368–379 (1987).

Sixième partie

Annexes

Annexes

Publications

The *Escherichia coli* metallo-regulator RcnR represses *rcnA* and *rcnR* transcription through binding on a shared operator site : insights into regulatory specificity towards nickel and cobalt

Article paru dans la revue *Biochimie* **93**, p 434-439 (2011).

RcnB is a periplasmic protein essential for maintaining Ni and Co intracellular concentrations in *Escherichia coli*.

Article paru dans la revue *Journal of bacteriology* **193**, p 3785-3793 (2011).

Poster

The periplasmic protein RcnB is involved in nickel and cobalt homeostasis in *Escherichia coli*.

Poster présenté lors des congrès : Young Scientists Forum & 35th FEBS Congress - Molecules of Life à Göteborg en Suède du 23 juin au 4 juillet 2010



Research paper

The *Escherichia coli* metallo-regulator RcnR represses *rcnA* and *rcnR* transcription through binding on a shared operator site: Insights into regulatory specificity towards nickel and cobalt

Didier Blaha^{1,2}, Safia Arous¹, Camille Blériot, Corinne Dorel, Marie-Andrée Mandrand-Berthelot, Agnès Rodrigue*

Université de Lyon, Lyon France, UMR5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie, CNRS, INSA Lyon, Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 September 2010

Accepted 20 October 2010

Available online 30 October 2010

Keywords:

Repressor proteins

Convergent promoters

Nickel

Cobalt

Homeostasis

ABSTRACT

RcnA is an efflux pump responsible for Ni and Co detoxification in *Escherichia coli*. The expression of *rcnA* is induced by Ni and Co via the metallo-regulator RcnR. In the present work, the functioning of the promoter–operator region of *rcnR* and *rcnA* was investigated using primer extension and DNase I footprinting experiments. We show that the promoters of *rcnR* and *rcnA* are convergent and that apo-RcnR binds on symmetrically located sequences in this intergenic region. Moreover, RcnR DNA binding is specifically modulated by one Ni or Co equivalent and not by other metals. In addition to *rcnA*, RcnR controls expression of its own gene in response to Ni and Co, but the two genes are differentially expressed.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Nickel and, to a lesser extent, cobalt are obligate nutrients in bacteria because they fulfill important biological functions [1,2]. The intrinsic properties of these metals make them unique catalysts for a subset of specialized, vital functions. Biological systems have overcome the reactivity of these metals by evolving a large set of metal-coordinating proteins dedicated to metal transport and insertion [3]. Ni and Co are ubiquitous and are often co-localized in natural environments [4]. When present in excess concentrations, both metals are expelled out of the bacterial cell to ensure detoxification. In *Escherichia coli*, one Ni and Co export system, the RcnA efflux pump, has been reported. RcnA confers resistance to Ni and Co, and its expression is induced by these two metals and not by other divalent cations [5]. The *rcnR* gene, which is located upstream of the *rcnA* gene and is divergently transcribed, encodes a repressor that controls *rcnA* expression in response to Ni and Co [6].

RcnR binds the intergenic *rcnR*–*rcnA* region on the palindromic sequence TACT-G6-N-AGTA, which is repeated twice and interacts

with flanking DNA regions, possibly resulting in DNA wrapping [7]. RcnR is thought to act as a tetramer, composed of a dimer of dimers [7] and to bind one Ni or Co ion per monomer, these metals being coordinated by a set of common residues as well as specific ligands [6]. RcnR is structurally similar to CsoR, a Cu-sensing repressor whose crystallographic structure reveals a homodimeric state in which Cu(I) is coordinated at the interface of the two monomers [8]. CsoR from *Bacillus subtilis* binds Ni(II), Zn(II) and Co(II) with high affinity *in vitro*. However, this binding does not affect the DNA binding affinity of CsoR, as these metals are coordinated at different positions relative to that of Cu(I) [9]. The metal specificity of the RcnR regulatory pathway was not clearly defined and the promoter elements of the *rcnR*–*rcnA* intergenic region were not determined. The aim of the present work was therefore to gain insight into the regulatory features of the *rcnR* and *rcnA* genes via RcnR by using a combination of genetics and biochemistry.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and oligonucleotides

The *E. coli* strains, plasmids and oligonucleotides used in this study are listed in Table 1. Gene deletions of *rcnR* and *rcnA* were constructed in the *E. coli* BW25113 strain according to [10] using the primers listed in Table 1. For phenotypical analysis, the *rcnR* deletion was transferred in *E. coli* NM522 by P1 phage transduction.

* Corresponding author at: MAP UMR 5240, Bat Lwoff – 10 rue Dubois, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel.: +33 472447980; fax: +33 472431584.

E-mail address: agnes.rodrigue@insa-lyon.fr (A. Rodrigue).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Present address: Université de Lyon, Lyon, France, UMR5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, CNRS, and VetAgro Sup, ISPB, Lyon, France.

Table 1
Bacterial strains, plasmids and primers used in this study.

Strain or plasmids	Genotype or description	Source, reference
Strains		
BW25113	<i>lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33}ΔrhaBAD_{LD78}</i>	[10]
NM522	<i>Δ(lac-proAB), thi, hsdS, supE, [P_{proAB}+, lacI, lacZ ΔM15]</i>	Stratagene
B834	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal [dcm] met (DE3)</i>	[20]
DB150	<i>As NM522, ΔrcnR-cat</i>	This study
ARY023	<i>As MC4100, rcnA::uidA-Kan^R</i>	[5]
ARY024	<i>As NM522, rcnA::uidA-Kan^R</i>	P1 transduction from ARY023
Plasmids		
pGEM-T Easy	Cloning vector, Amp ^R	Promega
pET30	Overexpression vector, T7 promoter, Kan ^R	Novagen
pDB1	<i>rcnR</i> cloned into pET30	This study
pDB2	<i>rcnRA</i> regulatory region cloned into pGEM-T Easy	This study
pAR123	<i>yohL-yohN</i> region in pUC18	[5]
p127	<i>rcnA::gfp</i> in pPROBE	[21]
Primers		
Youp	Sequence 5'–3' CGAGTCGTTTGCATCCGATGATGATAAATCG	Purpose Cloning of <i>rcnR</i>
Yolup	AGGTGTCATATGTCTCATAC	Cloning of <i>rcnR</i>
Yompromdwn	GCTGAAGAAGAGTTGTAATTCGG	PrcnRA probe
yompromup	TCACTTCCCGCATCAGACC	PrcnRA probe
yolFRTup1	ATTTGATATATGAATCCAGCACCTTCAGAACCACATCCAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>rcnR</i> mutant
yolFRTdwn1	AAGAAATGCTCGACGAGCCGACCAATGCGCTGCGATTTTCATATGAATATCTCTCTTAG	<i>rcnR</i> mutant
YoMATG	AATTCGGTCATGATAAATTC	Primer ext. <i>rcnA</i>
Yol4	CACGTTTTAGCTCATCCC	Primer ext. <i>rcnR</i>
Rpob1FQ	GAAGGGCAGTATGGTCTGGA	qRT-PCR <i>rpoB</i>
Rpob1RQ	TCACCAGACGCAGTTTAACC	qRT-PCR <i>rpoB</i>
Rpoa 1FQ	TGATGTCGAAATCGTCAAGC	qRT-PCR <i>rpoA</i>
Rpoa 1RQ	TGTAGGCAATACGCTCCAC	qRT-PCR <i>rpoA</i>
Yohm2FQ	GAAACGCCTGGTTTCTTCATCC	qRT-PCR <i>rcnA</i>
Yohm2RQ	AGGCAATTAACCAGACCACTG	qRT-PCR <i>rcnA</i>
yohl1FQ	TCGGCAATCTGATTCTACTCC	qRT-PCR <i>rcnR</i>
yohl1RQ	CTGGCCCTGAATCTTACTGG	qRT-PCR <i>rcnR</i>

2.2. Overexpression and purification of the RcnR Protein

The coding region of *rcnR* was cloned into pET30 using primers Youp and Yolup to generate pDB1 (Table 1). Overproduction of the native RcnR was carried out in *E. coli* B834 strain. Cells were grown at 29 °C in LB medium containing ampicillin until OD 600 nm reached 0.6, 1 mM IPTG was added and cells were grown for an additional 6 h at 29 °C. Cells were collected by centrifugation, washed and resuspended in 10 mM sodium phosphate pH 7 (binding buffer). Crude protein extracts were obtained by disrupting the bacterial cells with a French pressure cell (Aminco) and the lysed cells were centrifuged at 20000 × *g* for 30 min to obtain clear lysates. The protein solution was first applied to a 5 ml HiTrap heparin column HP (GE Healthcare), the loaded column was washed with the binding buffer and bound proteins were eluted using a NaCl linear gradient (0.1–2.5 M). RcnR eluted in the 0.3 M NaCl fraction. The RcnR fraction dialysed against 50 mM sodium phosphate pH 6.5 was loaded onto 1 ml HiTrap cation exchange column (GE Healthcare). The bound proteins were eluted with NaCl linear gradient (0.1–1 M) in 50 mM sodium phosphate pH 6.5. The RcnR protein was efficiently eluted with 0.2 M of NaCl, this fraction was buffer-exchanged on NAP-10 column (Amersham Biosciences) into complexation buffer (24 mM Hepes, 8 mM Tris–HCl, 140 mM KCl, 10% glycerol, pH 7.4). The protein concentration was determined by the method of Bradford (BioRad kit) and by measurement of OD at 280 nm ($\epsilon = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3. In vitro DNA–protein interaction

The *E. coli rcnR–rcnA* regulatory region (RRrcnA) was amplified by PCR using the yompromdwn and yompromup primers. The

resulting 325-bp amplification product was cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega). The RRrcnA DNA fragment obtained by a restriction digest with *Sall* and *SacII* was end labeled by filling the *SacII* end in the presence of (α -³²P) dCTP and DNA polymerase. DNase I footprinting was performed using a modified version of a procedure previously described [11]. About 50 000 cpm of DNA probe was incubated for 15 min at 30 °C with 10–200 nM of RcnR into complexation buffer. The reaction mixtures were adjusted to 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂ and 0.1% (v/v) Nonidet P-40 (Roche Applied Science), supplemented with metals at the concentrations indicated in the figures and incubated for 15 min at 30 °C. DNase I was added (5×10^{-3} units; Roche) and incubated at 30 °C for 15 s. The digestion was blocked by the addition of 25 μ l of stop solution (100 mM EDTA, pH 8), and 50 μ l of ice-cold TE (50 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) was then added to increase the volume of the mixture. After phenol–chloroform extraction, DNA fragments were ethanol precipitated, resuspended in 10 μ l of formamide–dye mixture and separated by electrophoresis on a 6% polyacrylamide sequencing gel. Bands were detected by autoradiography.

2.4. Primer extension

Total RNA was extracted from *E. coli* NM522 cells by the TRIzol reagent method (Invitrogen). Total RNA was treated by DNase (Ambion), and 5 μ g RNA was annealed with approximately 6×10^4 cpm of a ³²P-end-labeled 19–20-mer oligonucleotide (YoMATG for *rcnA* and Yol4 for *rcnR*) in annealing buffer (Invitrogen). Extension reactions were performed with 1 μ l of SuperscriptII RT (Invitrogen), and products were fractionated on sequencing gels. Dideoxy sequencing reactions performed with the

same oligonucleotide and the plasmid pAR123 were used as size markers.

2.5. cDNA synthesis and real-time PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen). RNA was treated with DNase (Ambion). cDNA synthesis was performed with the SuperscriptII kit (Invitrogen). The real-time PCR experiments were performed using the Master^{PLUS} SYBRGreen I kit (Roche Applied Science). The *rpoB* and *rpoA* genes were chosen as reference genes for data normalization. Amplification and detection of the specific products were carried out with the LightCycler System, and data analysis was performed with the Lightcycler Relative Quantification software (Roche Applied Science). Relative expression was calculated as the ratio of the normalized value of each

sample relative to that of the corresponding untreated wild-type cells according to [12].

3. Results

3.1. Transcription of *rcnA* and *rcnR*: convergent promoters for a shared operator

The *E. coli rcnA* and *rcnR* genes are divergently orientated. Their translation start codons are separated by 120 bp. The transcription start site for each gene was mapped by primer extension experiments. A single primer extension product was detected for *rcnA* or *rcnR* (Fig. 1A, B). The *rcnA* start site is located 90 bp upstream of the ATG, and the *rcnR* start site is located 107 bp upstream from the ATG. The two transcript starts are thus separated by 75 bp. A striking feature of these genes is that the two promoters are

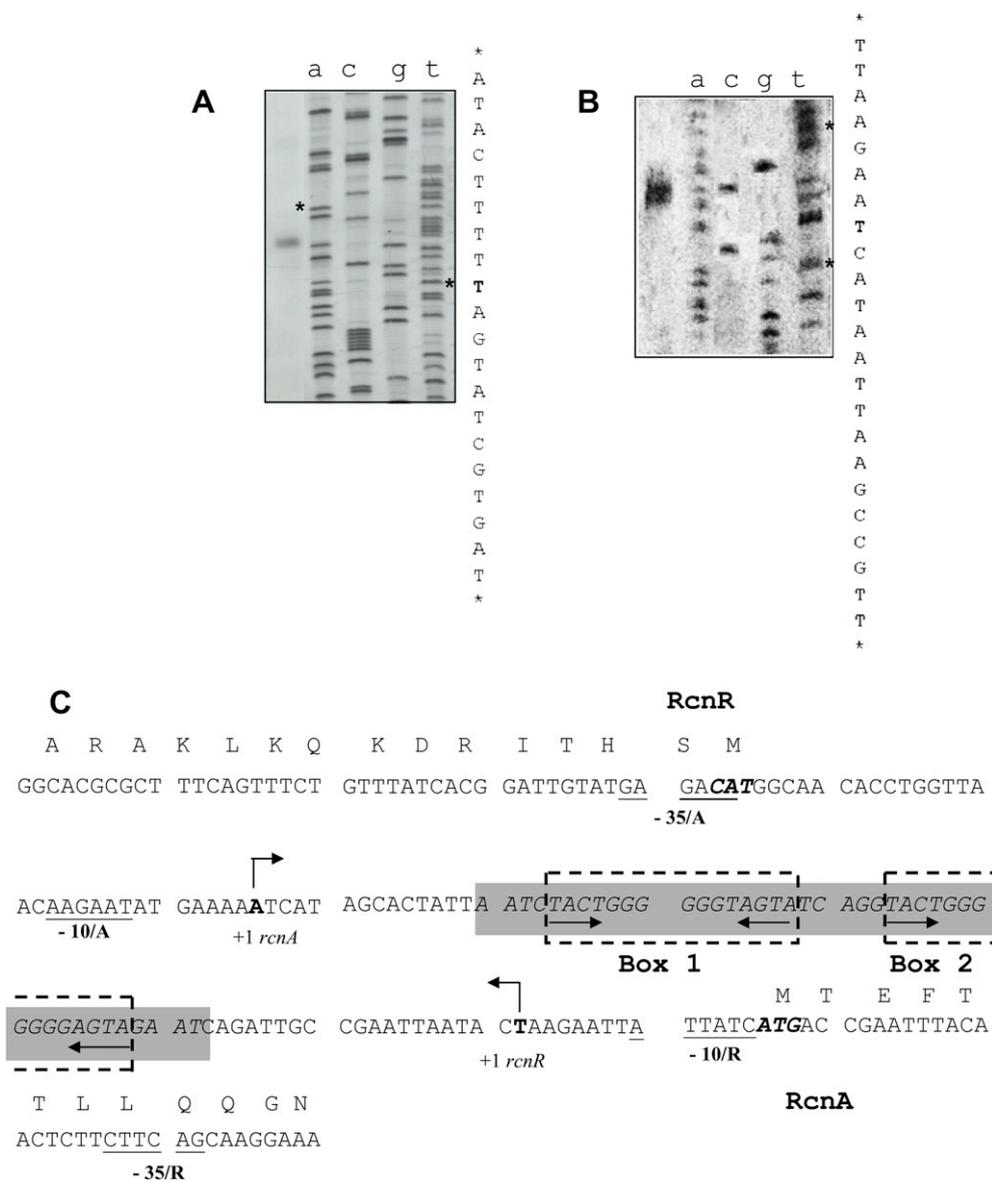


Fig. 1. Intergenic region organization of *rcnA* and *rcnR*. Determination of transcription initiation start sites of (A) *rcnA* and (B) *rcnR* using primer extension experiments. The DNA sequence surrounding the initiation site is written on the right, the +1 is in bold letter. (C) Sequence and organization of the region. The transcription start sites are indicated by bent arrows. The deduced -10 and -35 sequences are underlined (/A refers to *rcnA* and/R refers to *rcnR*). The protected region in the footprinting experiments is shaded gray (see Fig. 2A). Inverted repeated sequences are underlined with arrows. The two repeated RcnR binding boxes are framed with dashed lines.

convergent, an unusual topology among divergently transcribed genes.

The sequence surrounding the two start sites contains a palindromic sequence, TACT-N7-AGTA recognized by RcnR [7], which is repeated twice, with the two directly repeated dyad symmetry sequences separated by 5 bp. These two repeated sequences are located in between the *rcnA* and *rcnR* + 1, downstream of each site (Fig. 1C). DNase I footprints in the presence of purified RcnR confirmed the occupancy of a 43-bp region covering the two boxes (Fig. 2A) using here a 325-bp probe located from –166 to +159 bp relative to the ATG of *rcnR* [7]. Our determination of the transcription start sites highlights the symmetrical organization of RcnR binding sites towards the *rcnA* and *rcnR* promoters. The fact that RcnR binds downstream of both transcription start sites suggests that repression of transcription hampers RNA polymerase progression in both directions.

3.2. Transcriptional control of *rcnA* and *rcnR* genes by Ni and Co via *rcnR*

DNase I experiments were further carried out in the presence of Ni or Co (Fig. 2A). As expected, RcnR dissociates from its cognate binding site upon the addition of one or the other metal. This dissociation has been previously shown but using EMSA experiments and in the presence of a large excess of Ni or Co ([metal]/[protein] > 10³) [13]. In the present work, after the addition of one metal equivalent of either metal, a release of 80–100% of RcnR from P_{*rcnR-A*} was assessed by profile density image analysis. Ni or Co binding by RcnR was monitored using UV–visible spectroscopy.

The primary band for Co binding was at 308 nm, and the primary band for Ni binding was at 278 nm. We observed a stoichiometry of one Ni(II) or Co(II) binding to each RcnR monomer (data not shown), in agreement with data published elsewhere [6]. Overall, these results show that RcnR responds similarly to Ni and Co *in vitro*.

The respective expression of *rcnA* and *rcnR* in the presence of either metal was assessed at the mRNA level by quantitative real-time PCR (Fig. 3). Cells were grown in LB medium in the presence of either Ni or Co from the start of the culture until mid-log phase. The chosen concentrations of Ni and Co (1 mM NiSO₄ and 0.1 mM CoCl₂) gave the highest responses with the *rcnA::uidA* gene reporter fusion ([5] and data not shown). This difference between effective concentrations of Ni and Co has been reported elsewhere [14] and may be explained in terms of actual free metal concentrations in the cytoplasm. As expected, the expression of *rcnA* in a wild-type background was induced by either Ni or Co (Fig. 3). The induction by these two metals was nearly the same, approximately tenfold. In the Δ *rcnR* derivative, similar expression ratios were obtained for *rcnA* in the three tested conditions, LB, LB +Ni, LB +Co, reaching the level of expression obtained in the wt strain grown in LB supplemented with either Ni or Co. This confirms that *rcnA* regulation by Ni or Co is mediated by RcnR at the transcriptional level. In the wt strain, the addition of Ni or Co led to a similar level of induction (approximately fivefold) of *rcnR*. Interestingly, in an *rcnR* mutant, *rcnR* expression was the same for the three conditions (LB, LB +Ni, LB +Co), but the levels of expression were twofold higher than that of the wt strain grown in the presence of either Ni or Co. Thus, full expression of *rcnR* is only attained in the absence of

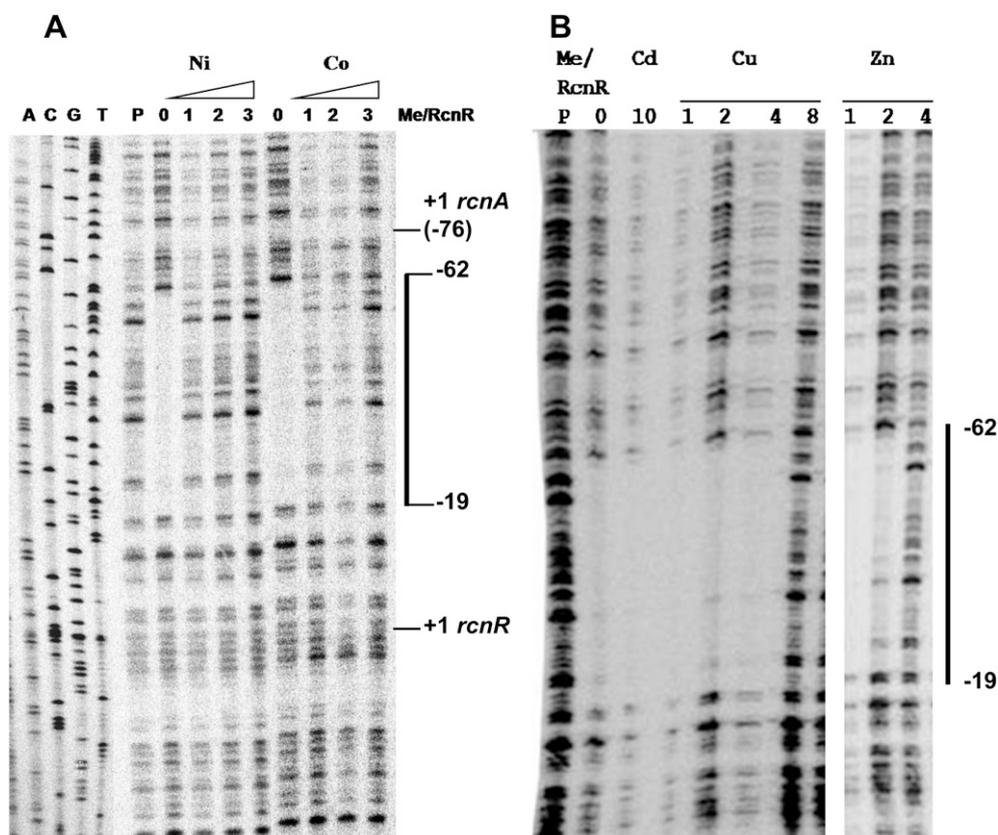


Fig. 2. RcnR dissociation from cognate DNA upon metal binding. A) Footprinting experiments in the presence of Ni or Co. Lane P: probe, lanes 0–3: probe + 200 nM RcnR + 0, 1, 2 or 3 equivalents of Ni or Co. The region protected by RcnR (–62 to –19) is indicated relative to *rcnR* transcription start site. B) RcnR metal specificity testing. Footprinting experiments in the presence of Cd, Cu or Zn. Lane P: probe, lanes 0, 1, 2, 4, 8, 10: probe + 200 nM RcnR + 0, 1, 2, 4, 8 or 10 metal equivalents, with the corresponding metal indicated above.

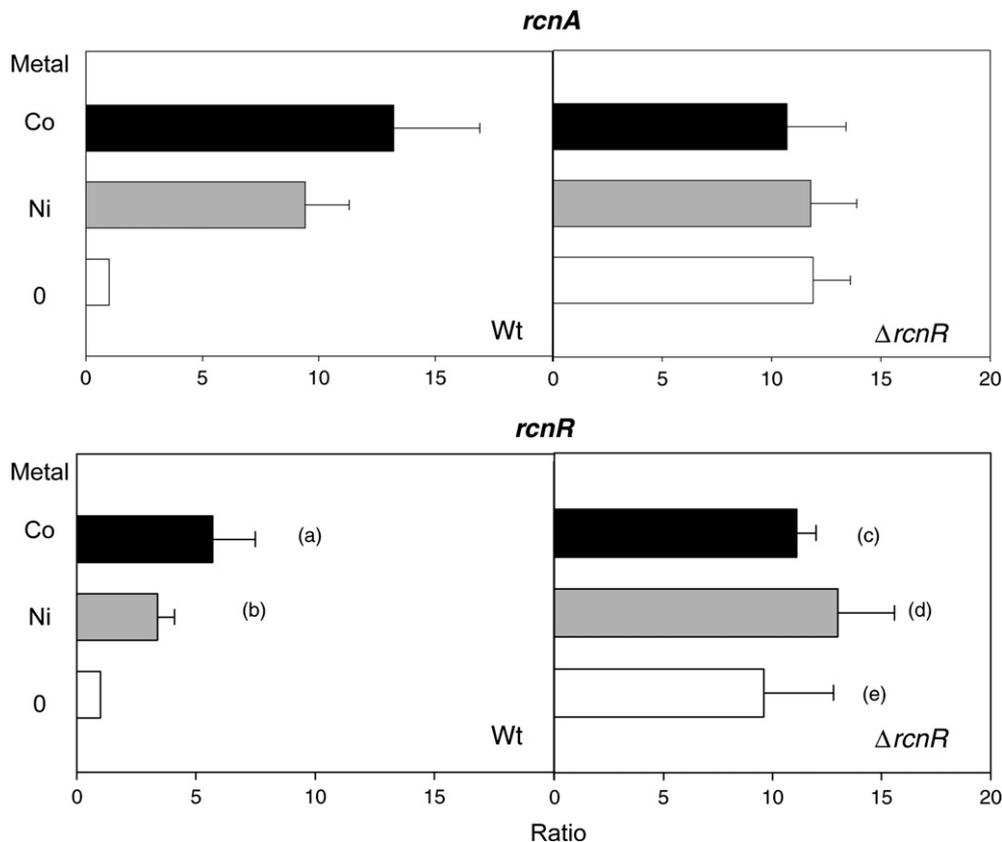


Fig. 3. Expression of *rcnR* and *rcnA* in response to Ni and Co. Quantification of the expression of the *rcnR* and *rcnA* genes was performed by qRT-PCR after growth of the wild-type strain NM522 and its $\Delta rcnR$ derivative until mid-log phase in LB (white bars), LB + 1 mM NiSO₄ (gray bars) or LB + 0.1 mM CoCl₂ (black bars). Expression ratios are relative to the data obtained with the wild-type cells grown in LB. Data are the mean of at least three independent datasets, SD are presented in the figure. There were significantly different values between groups (a, b) and (c, d, e), with *P*-values: (a, c) = 1.4×10^{-4} ; (b, d) = 4×10^{-7} ; (b, e) = 0.01.

RcnR and is not attained by the sole addition of Ni or Co, as observed for *rcnA*. This shows that RcnR controls its own expression and suggests that supplementary regulatory events may control the expression of *rcnR* and therefore metal efflux.

3.3. Regulation of the divergent operon is highly specific to Ni and Co

We have previously reported that *in vivo* regulation of the expression of the transcriptional *rcnA::uidA* fusion is specifically induced by Ni or Co and that addition of Cd, Cu or Zn did not have any effect on the transcription of *rcnA* [5]. To test the *in vitro* specificity of the system, footprinting experiments were performed in the presence of Cd, Cu or Zn (Fig. 2B). As expected the addition of up to 10 metal equivalents of Cd triggered no release of RcnR from the *rcnR-rcnA* intergenic region. For Cu and Zn, RcnR dissociated from the probe with the addition of 8 and 4 metal equivalents, respectively.

4. Discussion

We demonstrate in this work that *rcnA* and *rcnR* are coordinately expressed in *E. coli* via RcnR and we provide insight into the molecular mechanism of this process. We have previously shown that the *in vivo* induction of *rcnA* is dependent on Ni or Co ions [5]. Here, using *in vitro* footprint experiments, we present evidence that addition of one Ni or Co equivalent leads to the release of RcnR interaction from the two recognition sites lying in the *rcnR-rcnA*

promoter–operator region. Furthermore, the other transition metals Cd, Cu and Zn were not able to regulate *rcnR-rcnA* operator DNA binding or were active at far higher concentrations which may not be physiologically compatible. These results are in full agreement with the phenotypes associated with *rcnA* mutants, namely resistance to Ni and Co and not to other divalent cations [5]. At both functional and regulatory levels, this system is dedicated to the detoxification of Ni and Co. Until recently, *E. coli* RcnA was the only described member of this family of efflux pumps. However a new member, MdrH, has recently been described in *Pseudomonas putida* which confers resistance to Cd, Zn and Ni; its expression is induced by Cd, Ni, Zn and Co [15]. The *mdrH* gene is thought to be regulated by the upstream gene *mreA*, which has the same expression pattern as the target gene. The RcnA family might therefore have broad substrate specificity and may have co-evolved as a metal transporter and a dedicated metallo-regulator.

We show here that the induction of *rcnR* transcription occurs by direct binding of Ni or Co on RcnR. Each monomer of RcnR can accommodate either one Ni or one Co ion, as reported here and elsewhere [6]. However, *in vivo* Co concentrations tenfold lower than those of Ni induced comparable effects on transcription. It can be hypothesized that the cellular requirement for Co differs from that of Ni. Co is indeed much less used by biological systems than Ni, especially in *E. coli* where Co utilization seems restricted to vitamin B12 import and use [2,16]. This was further supported by measuring the increase of the *rcnA::uidA* gene fusion after growth in LB medium supplemented by Ni or Co. An increase in the β -glucuronidase activity was observed for Ni concentrations up

to 1 mM, whereas the maximum was reached for 0.03 mM Co. The toxic effect of these ions on the bacterial growth was recorded for Co and Ni concentrations greater than 0.1 mM and 0.5 mM respectively (data not shown). These data indicate that a similar amount of Ni or Co added to the growth medium results in different intracellular concentrations. Another clue is the respective harmfulness of the two metals. Although the effects of these two metals at the molecular level are not yet fully understood, one striking difference is the capacity for Co to compete with Fe in Fe-metal-locenters, leading for instance to inactivation of iron–sulfur clusters [17]. The bacterial cell might therefore be inclined to control Co levels closely and export excess of the metal cation.

Transcription of *rcnA* was induced tenfold by Ni or Co, as observed from qRT-PCR experiments. The same induction level was observed in the *rcnR* mutant, indicating that saturating concentrations of Ni or Co fully alleviate repression via unbinding of Ni- or Co-loaded RcnR. The regulation of *rcnR* seems more complex than regulation of *rcnA*. Indeed, induction levels with Ni or Co reached roughly fivefold. The difference in induction level of *rcnA* and *rcnR* might be due to different properties of each promoter, such as promoter strength. However, when measured in an *rcnR* background, the induction level of *rcnR* increased tenfold, indicating that this regulation is mediated by RcnR. Thus, transcription of *rcnR* includes an additional layer of regulation relative to the transcription of *rcnA*. Previous work has suggested that iron might induce *rcnR*, but in a *fur*-independent pathway [14]; this point needs further investigation.

The peculiar topology of the *rcnR* and *rcnA* promoters could also shed light on our understanding of these differential patterns of expression. We show here that the two promoters are convergent and that the two RcnR DNA binding boxes are symmetrically located from each transcription start site. This topology is not frequent and provides functional constraints on the transcription of the divergent genes. Convergent promoters in themselves were shown to trigger transcriptional interference of one gene over the divergent one, leading to increased expression of one of the genes and resulting in so-called “weak” and “strong” promoters. The competition between the “weak” and the “strong” promoters might be the result of two phenomena: (i) RNAP bound to one promoter decreases the interaction between RNAP and the second promoter and (ii) when both promoters are occupied by RNAP, transcription initiation occurs faster on one of the promoters [18,19]. We identified this kind of conserved promoter organization in *rcnA/rcnR* systems of beta, gamma and delta Proteobacteria (data not shown). However the topology of the RcnR binding box is diverse as genes under its control may also be transcribed in the same orientation. Similarly tandem repeats of RcnR binding site is not an absolute rule, a single site being present in many cases (not shown). It has been shown experimentally that RcnR from *E. coli* can bind one site *in vitro* when the other one is missing [7]. The diversity in operator site organization may thus provide diversity in gene regulation among RcnR homologs which are involved in metal sensing and in oxidative stress response.

This work provides new insights on molecular mechanisms of transcriptional control of the efflux pump RcnA, but our genetics data suggest that additional yet unknown effectors modulate the regulation of *rcnR*. Further work is needed to identify these factors.

Acknowledgements

This work was supported by an Environmental Nuclear Toxicology grant from the Centre National de la Recherche Scientifique. We thank G. Effantin, S. Alvares and A. Campan for technical assistance, V. James for correction of the English.

Appendix. Supplementary information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.biochi.2010.10.016.

References

- [1] Y. Li, D.B. Zamble, Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4617–4643.
- [2] M. Kobayashi, S. Shimizu, Cobalt proteins, *Eur. J. Biochem.* 261 (1999) 1–9.
- [3] Z. Ma, F.E. Jacobsen, D.P. Giedroc, Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4644–4681.
- [4] P. Gikas, Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review, *J. Hazard. Mater.* 159 (2008) 187–203.
- [5] A. Rodrigue, G. Effantin, M.A. Mandrand-Berthelot, Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 2912–2916.
- [6] J.S. Iwig, S. Leitch, R.W. Herbst, M.J. Maroney, P.T. Chivers, Ni(II) and Co(II) sensing by *Escherichia coli* RcnR, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 7592–7606.
- [7] J.S. Iwig, P.T. Chivers, DNA recognition and wrapping by *Escherichia coli* RcnR, *J. Mol. Biol.* 393 (2009) 514–526.
- [8] T. Liu, A. Ramesh, Z. Ma, S.K. Ward, L. Zhang, G.N. George, A.M. Talaat, J.C. Sacchettini, D.P. Giedroc, CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 60–68.
- [9] Z. Ma, D.M. Cowart, R.A. Scott, D.P. Giedroc, Molecular insights into the metal selectivity of the copper(I)-sensing repressor CsoR from *Bacillus subtilis*, *Biochemistry* 48 (2009) 3325–3334.
- [10] K.A. Datsenko, B.L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 6640–6645.
- [11] D.J. Galas, A. Schmitz, DNase footprinting: a simple method for the detection of protein–DNA binding specificity, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 3157–3170.
- [12] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [13] J.S. Iwig, J.L. Rowe, P.T. Chivers, Nickel homeostasis in *Escherichia coli* – the *rcnR-rcnA* efflux pathway and its linkage to NikR function, *Mol. Microbiol.* 62 (2006) 252–262.
- [14] D. Koch, D.H. Nies, G. Grass, The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis, *Biometals* 20 (2007) 759–771.
- [15] A. Haritha, K.P. Sagar, A. Tiwari, P. Kiranmayi, A. Rodrigue, P.M. Mohan, S.S. Singh, MrdH, a novel metal resistance determinant of *Pseudomonas putida* KT2440, is flanked by metal-inducible mobile genetic elements, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 5976–5987.
- [16] S.B. Mulrooney, R.P. Hausinger, Nickel uptake and utilization by microorganisms, *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 239–261.
- [17] C. Ranquet, S. Ollagnier-de-Choudens, L. Loiseau, F. Barras, M. Fontecave, Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 30442–30451.
- [18] B.P. Callen, K.E. Shearwin, J.B. Egan, Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter, *Mol. Cell* 14 (2004) 647–656.
- [19] A. Protsenko, M. Zakharova, M. Nagornyykh, A. Solonin, K. Severinov, Transcription regulation of restriction-modification system Ecl18kl, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 5322–5330.
- [20] F.W. Studier, A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, J.W. Dubendorff, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60–89.
- [21] C. Perrin, R. Briandet, G. Jubelin, P. Lejeune, M.A. Mandrand-Berthelot, A. Rodrigue, C. Dorel, Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 1723–1733.

RcnB Is a Periplasmic Protein Essential for Maintaining Intracellular Ni and Co Concentrations in *Escherichia coli*[†]

Camille Blériot,¹ Géraldine Effantin,¹ Florence Lagarde,²
Marie-Andrée Mandrand-Berthelot,¹ and Agnès Rodrigue^{1*}

Université de Lyon, INSA Lyon, F-69621 Villeurbanne, and CNRS, UMR5240, Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne, France,¹ and Université de Lyon, Lyon 1, Laboratoire des Sciences Analytiques, UMR 5180, CNRS, CPE, 69622 Villeurbanne, France²

Received 10 April 2011/Accepted 29 May 2011

Nickel and cobalt are both essential trace elements that are toxic when present in excess. The main resistance mechanism that bacteria use to overcome this toxicity is the efflux of these cations out of the cytoplasm. RND (resistance-nodulation-cell division)- and MFS (major facilitator superfamily)-type efflux systems are known to export either nickel or cobalt. The RcnA efflux pump, which belongs to a unique family, is responsible for the detoxification of Ni and Co in *Escherichia coli*. In this work, the role of the gene *yohN*, which is located downstream of *rcnA*, is investigated. *yohN* is cotranscribed with *rcnA*, and its expression is induced by Ni and Co. Surprisingly, in contrast to the effect of deleting *rcnA*, deletion of *yohN* conferred enhanced resistance to Ni and Co in *E. coli*, accompanied by decreased metal accumulation. We show that YohN is localized to the periplasm and does not bind Ni or Co ions directly. Physiological and genetic experiments demonstrate that YohN is not involved in Ni import. YohN is conserved among proteobacteria and belongs to a new family of proteins; consequently, *yohN* has been renamed *rcnB*. We show that the enhanced resistance of *rcnB* mutants to Ni and Co and their decreased Ni and Co intracellular accumulation are linked to the greater efflux of these ions in the absence of *rcnB*. Taken together, these results suggest that RcnB is required to maintain metal ion homeostasis, in conjunction with the efflux pump RcnA, presumably by modulating RcnA-mediated export of Ni and Co to avoid excess efflux of Ni and Co ions via an unknown novel mechanism.

Nickel and cobalt are both essential trace elements. Co is incorporated into a subset of proteins; in *Escherichia coli*, it is present in vitamin B₁₂, which is involved in many crucial biological functions (28). Ni is a catalytic cofactor of eight prokaryotic enzymes involved in both redox and nonredox reactions, the best-characterized enzymes being hydrogenase and urease (27). However, using improved predictive and analytical methods, the assignment or reassignment of the metal content in proteins is still in progress. For instance, two new Ni-containing enzymes have been identified recently: a cupin/putative sugar-binding protein and an alanyl-tRNA editing hydrolase (8).

In eubacteria, Co import occurs via NiCoT secondary transporters (16) or via recently characterized ECF-type ATP binding cassette (ABC) importers, such as the cobalt uptake system CbiMNQO (41). *E. coli* lacks a specific Co importer but possesses a vitamin B₁₂ (or cobalamin) uptake system. BtuB is the outer membrane protein that, by a TonB-dependent mechanism, imports cobalamin into the periplasm (5). The transmembrane component of the BtuCDF ABC importer, BtuC, and the nucleotide binding protein, BtuD (30), function to-

gether with the periplasmic solute-binding protein BtuF (4) to import cobalamin into the cytoplasm.

Ni import is mediated either by ABC transporters or by NiCoT permease (15). In *E. coli*, specific Ni uptake occurs via the NikABCDE system of the ABC family. NikBC are channel-forming transmembrane proteins, NikDE are nucleotide-binding proteins (34), and NikA is a periplasmic solute binding protein (13). In some organisms, the same importer accomplishes the uptake of both Ni and Co. A member of the NiCoT family, NhlF from *Rhodococcus rhodochrous* J1, has been shown to import both metals, although with different affinities, with Co being a better substrate than Ni (11). Mutagenesis studies have shown that the transport mechanism is conserved among NiCoT members and that the specificity relies on a few residues, some being shared for Ni and Co coordination (10). Similarly, the FecDE and CeuE ABC transporter has been shown recently to import both Ni and Co in *Helicobacter mustelae* (49), in parallel with the NiCoT Ni importer NixA. Apart from these dedicated specific uptake systems, under conditions where the concentration of metals is high, nonspecific import is an important source of metal entry in bacteria. In *E. coli*, both Ni and Co are transported through the Mg(II) transporter CorA (35). For Ni, mutation of the *nik* genes results in a complete loss of hydrogenase activity (54). In this case, the enzyme is synthesized normally, but it lacks the Ni required for maturation (42) and eventual translocation to the periplasm (43). Addition of excess Ni to the growth medium restores hydrogenase activity (53), owing to nonspecific Ni uptake by CorA. However, when the *nik* and *corA* genes are mutated,

* Corresponding author. Mailing address: MAP UMR 5240, Bat Lwoff—10 rue Dubois, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. Phone: (33) 472447980. Fax: (33) 472431584. E-mail: agnes.rodrigue@insa-lyon.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jba.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 10 June 2011.

nickel sensitivity is not fully abolished, suggesting the existence of an as-yet-unidentified supplementary transporter (34). Similarly, Co uptake can occur via an alternative transporter, ZupT, which is primarily involved in Zn uptake (20), and active Co uptake can be detected in the absence of CorA and ZupT (29).

Like many other transition metals, Ni and Co are toxic in excess, causing growth arrest and cell death (19, 55). The molecular mechanisms of nickel toxicity need to be reevaluated, but Ni mainly causes oxidative stress (52). A recent transcriptomic study in *E. coli* revealed that the toxicity of Co occurs primarily by impairing the biogenesis of Fe/S clusters and secondarily by decreasing iron availability (17). The most widespread mechanism that bacteria use to resist metal toxicity is the efflux of the ions out of the cell (36), although alternative mechanisms, such as biomineralization (22) or biofilm formation (38), have also been described. Ni and Co are often expelled by the same efflux pumps. In *E. coli*, the only identified mechanism of resistance to Ni or Co is executed by the RcnA efflux pump. RcnA (formerly YohM) is a six-transmembrane-domain protein of a novel family, and it is thought to function as a secondary transporter (44). The expression of *rcnA* is induced by Ni and Co and not by other divalent cations (44). Other members of the RcnA family have been identified in *Pseudomonas syringae*, RcnA_{Psy}, and in *Pseudomonas putida*, MdrH (23). RcnA_{Psy} confers resistance to Ni and Co, whereas MdrH confers resistance to Ni, Zn, and Cd, but not to Co, and its expression is induced by Ni, Zn, Cd, and Co (23). Interestingly, MdrH exhibits a chimeric structure encompassing a domain similar to that of CzcB of the resistance-nodulation-cell division (RND) efflux family.

In order to better understand the efflux mechanism of the RcnA family, in the present work, we have investigated the role of the *yohN* gene in *E. coli*. *yohN* lies directly downstream of *rcnA*, and we show here that it is coexpressed with *rcnA* and that its expression is induced by Ni and Co via RcnR. Surprisingly, in contrast to the effect of deleting *rcnA*, deletion of the *yohN* gene confers increased resistance to Ni and Co, which is accompanied by reduced intracellular Ni and Co pools. We show that *yohN* is not involved in Ni uptake and that it encodes a periplasmic protein. Finally, we find that in the *yohN* mutant, the efflux of Ni is considerably increased. These results indicate that YohN is essential for maintaining a proper Ni and Co homeostasis in *E. coli*, most likely in connection with the efflux pump RcnA. Based on these results, *yohN* has been renamed *rcnB*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and culture conditions. The strains used in this work are summarized in Table S1A in the supplemental material and are all derivatives of *Escherichia coli* K-12. Bacterial cells were grown in LB medium or M63 minimal medium supplemented with 0.4% glucose. Anaerobic conditions were obtained with liquid cultures by filling bottles to the top or by placing petri dishes in a GasPak jar, according to the manufacturer's instructions (BD). Cultures were incubated at 37°C unless otherwise stated. Where required, antibiotics purchased from Sigma were used at the following concentrations: chloramphenicol at 20 µg/ml, kanamycin at 50 µg/ml, ampicillin at 100 µg/ml, and spectinomycin at 100 µg/ml.

Construction of mutant and gene reporter strains. Standard genetic methods were used (46). Insertional inactivation of *yohN* was accomplished using the one-step mutagenesis method in strain BW25113(pKD46) (9), using the primers yoNFRTup and yoNFRTdwn2 (see Table S1B in the supplemental material) to

amplify the *cat* cassette from plasmid pKD3. The *cat* gene was inserted antisense to *yohN*. The *yohN-cat* fusion was transferred from strain BW25113 into other strains via generalized phage transduction using P1 *vir*, as described by Miller (32). The same procedure was used to construct a $\Delta rcnA$ -*cat* strain using primers rcnAFRTup1 and rcnAFRTdwn2. The transcriptional *rcnA-uidA* fusion, carried by strain ARY023 (44), was moved into W3110 or NM522 strains using P1 phage transduction.

RT-PCR assays. Total RNA was isolated from cultured cells with the RNeasy kit (Qiagen) and treated twice with DNase (Ambion) for 30 min at 37°C. The absence of DNA contamination was verified by direct PCR. RNA was quantified by measuring the optical density at 260 nm (OD₂₆₀), and its integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis. RNA was reverse transcribed using the Access reverse transcriptase PCR (RT-PCR) kit (Promega) using the primers RTMup and RTMdn, YoN2up and Yodwn2, and Yodwn2 and RTMup for amplification of the *yohM*, *yohN*, and *yohMN* transcripts, respectively. Controls were treated as samples, but reverse transcriptase (RT) was omitted. PCR and RT-PCR products were visualized on a 2% agarose gel.

cDNA synthesis and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Total RNA was extracted, as described above, from 10 ml of log-phase cultures. cDNA synthesis was performed using 2 µg of RNA with Superscript II RT (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using Master Plus SYBR green I (Roche Applied Science) to quantify the expression level of the *rcnA* and *rcnB* genes. The *rpoB* and *rpoA* genes were chosen as reference genes for data normalization. Primers were designed with the Primer 3 software. Amplification and detection of the specific products were conducted with the LightCycler system, and data analysis was performed with the LightCycler relative quantification software (Roche Applied Science). Relative expression was calculated as the ratio of the normalized value of each sample to that of the corresponding untreated control, with a correction for individual PCR efficiency according to the work of Pfaffl (39). All real-time PCRs were performed on cDNA obtained from at least three independent cultures.

Nickel and cobalt susceptibility testing. Metal sensitivity assays were conducted as follows. First, bacteria were grown to mid-log phase in LB medium. A 10-fold serial dilution of the cultures in M63 medium was performed, and 5 µl was spotted onto 0.4% glucose-M63 minimal medium plates containing increasing concentrations of each metal. Plates were incubated at 37°C for 24 to 48 h under aerobic conditions or for 48 to 72 h under anaerobic conditions.

Enzymatic assays. β-Glucuronidase and β-galactosidase activities were measured on toluenized extracts by monitoring the degradation of synthetic substrates (Sigma): orthonitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG) for β-galactosidase assays or paranitrophenyl-β-D-glucuronide (PNPU) for β-glucuronidase assays.

For fluorescence quantification, cells were grown to stationary phase, and fluorescence was measured with an SFM 23/B spectrofluorometer (Kontron Instruments).

For hydrogenase activity assays, 25 ml of anaerobic cultures (OD₆₀₀ = 0.5) in LBSM medium (LB supplemented with 2 µM sodium selenite and 2 µM sodium molybdate) at 37°C was harvested by centrifugation and washed twice with a wash buffer consisting of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄). Bacteria were resuspended in 1/10 volume of the wash buffer. Toluenized extracts were assayed for the oxidation of benzyl viologen as previously described (42).

Overexpression and purification of the RcnB protein. Strain BL21, harboring the pETRCB plasmid, was grown to mid-log phase in LB medium. Next, 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to induce the expression of RcnB. After 4 h at 30°C, cells were harvested by centrifugation and either frozen at -80°C for later use or diluted in 50 mM Tris-HCl, pH 7, supplemented with 1.5 M ammonium sulfate, and lysed by 3 passages through a French press in the presence of Halt protease inhibitor (Thermo). The supernatant was filtered through a 0.45-µm filter and loaded onto a phenyl HP column (HiTrap; GE Healthcare). Elution followed a linear gradient, from 1.5 M to 0 M ammonium sulfate in 50 mM Tris-HCl, pH 7, and fractions containing the RcnB protein (0.7 M ammonium sulfate) were pooled and dialyzed against 50 mM Tris-HCl, pH 7, to remove the ammonium sulfate. The fraction containing RcnB was loaded onto an anion-exchange UnoQ1 column (Bio-Rad). Under these conditions, RcnB was not retained on the column, in contrast to the contaminating proteins present in the loaded fraction. The purity of RcnB was verified on a 15% Tris-Tricine polyacrylamide gel. When necessary, purified RcnB was concentrated using 6-kDa-cutoff Vivaspin 6 concentrators (Sartorius). RcnB was quantified either by measuring OD₂₇₈ using an ϵ of 21,430 M⁻¹ cm⁻¹ or by using the Bradford protein assay kit (Bio-Rad).

Immunodetection of proteins. Polyclonal antibodies against RcnB were obtained from Covalab (Villeurbanne, France) by immunization of a rabbit with the purified protein. For Western blot analysis, periplasmic extracts of cells grown in

the presence of 0.1% lactose were fractionated from whole cells using the chloroform extraction procedure (13). To control for contamination of the periplasmic fraction with cytoplasmic proteins, β -galactosidase activity was measured on crude and periplasmic extracts. After migration on a 15% Tris-Tricine PAGE gel, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Anti-RcnB antibodies were used at a dilution of 1/3,000, and anti-BlaM antibodies were used at a 1/5,000 dilution. Detection was performed using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Sigma) and Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore).

Metal-protein interactions. Filter binding assays were conducted as described in reference 14. Purified RcnB, in 50 mM Tris-HCl, pH 7, was incubated overnight with increasing quantities of radiolabeled $^{63}\text{NiCl}_2$ and was subsequently immobilized on a buffer-equilibrated 0.2- μm Westran PVDF membrane (Millipore). The membrane was washed thoroughly with buffer, and radioactivity was quantified by immersing dried filters in 5 ml of OCS scintillation liquid (Amersham Biosciences). Background radioactivity (in the absence of protein) was subtracted.

ICP-OES assays. Strains were grown to mid-log phase in 250 ml LB medium supplemented with 500 μM NiSO_4 or 50 μM CoCl_2 or in minimal medium containing 50 μM NiSO_4 or 15 μM CoCl_2 ; cells were subsequently harvested by centrifugation, washed once with phosphate buffer plus 1 mM EDTA, and then washed twice with phosphate buffer alone. The bacterial pellet was vacuum dried and weighed (typically circa 0.100 g was obtained) before being dissolved in 2 ml of 10 M nitric acid (Traceselect; Fluka). Digestion was conducted in a Mars XPress microwave device (CEM Corporation) by applying a linear temperature gradient from room temperature to 180°C over 15 min, followed by 30 min at 180°C. After cooling, mineralized samples were diluted to 8 ml with ultrapure water and analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) using an axial JY 138 Ultracore prototype spectrometer (Horiba, Longjumeau, France) operating at 1,075 W and equipped with a Meinhard-type nebulizer and a Scott spray chamber. Compressed air was used as shear gas. Flow rates were as follows: plasma gas, 12 liters min^{-1} ; nebulizer gas, 0.7 liter min^{-1} ; sheath gas, 0.1 liter min^{-1} . Integration time was set at 2 s, and the wavelength was set to 221.65 nm for Ni and 228.62 nm for Co.

^{63}Ni uptake assay. Cells were grown in LB medium in the presence of 500 μM NiSO_4 at 37°C under aerobic conditions to mid-log phase ($\text{OD}_{600} = 0.6$); cells were subsequently harvested and washed once with a buffer consisting of 66 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 6.8) and 0.4% glucose. Bacteria were resuspended in 1/5 volume of the wash buffer. Transport assays were conducted by adding $^{63}\text{Ni}^{2+}$ to a final concentration of 5 μM , with filtration performed at the indicated times. Nitrocellulose filters (0.45- μm pore size; Millipore) were washed twice with the same buffer containing 10 mM EDTA. Filters were dried and immersed in 5 ml scintillation fluid (OCS; Amersham Biosciences). Radioactivity was counted with a Tri-Carb Packard Bell scintillation counter. $^{63}\text{NiCl}_2$ (396 Ci/mol) was acquired from Amersham Biosciences.

^{63}Ni efflux assay. The ^{63}Ni efflux assay procedure was adapted from the work of Pimentel et al (40). Cells were grown in M63 medium containing 0.4% glucose (medium A) in the presence of 5 μM NiSO_4 at 37°C under aerobic conditions until early log phase ($\text{OD}_{600} = 0.4$); cells were subsequently harvested and washed twice with prewarmed medium A and resuspended in 1/10 volume of the same medium. $^{63}\text{NiCl}_2$ (5 μM) was added, and the cells were incubated for 15 min at 37°C. Aliquots of 200 μl were diluted in 20 ml 50 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7.2, and incubated at 37°C. At various time points, 1-ml aliquots were filtered, and the filters were washed and radioactivity was counted as described above.

RESULTS

***rcnB* is part of the *rcn* operon.** We have previously reported on the role of RcnA as an efflux pump involved in Co and Ni detoxification (44). In *E. coli*, *rcnA* is followed by the *yohN* gene, which is transcribed in the same direction. In order to assess the possible cotranscription of *rcnA* and *yohN*, mRNA was isolated from strain NM522 after growth in LB medium supplemented with 0.25 mM NiSO_4 , conditions that are known to induce the expression of *rcnA* (44). After a reverse transcription step, amplification of cDNA using *rcnA*- and *yohN*-specific primers (see Table S1B in the supplemental material) yielded 720-bp and 300-bp products, respectively, indicating that *yohN* is transcribed under the growth conditions used (see

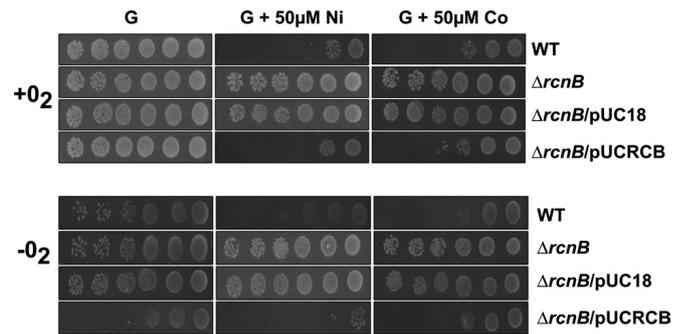


FIG. 1. *rcnB* is involved in Ni and Co resistance. The wild-type strain (W3110), the $\Delta rcnB$ isogenic mutant (WRCB1), WRCB1 \times pUC18, and WRCB1 \times pUCRCB (*rcnB* in pUC18) were grown in LB medium to mid-log phase. A 10-fold serial dilution of the cultures was performed, and 5 μl was spotted on M63 minimal medium supplemented with 0.4% glucose (G), 0.4% glucose plus 50 μM NiSO_4 , or 0.4% glucose plus 50 μM CoCl_2 and grown aerobically (top) or anaerobically (bottom) at 37°C in petri dishes. Spots corresponding to 10⁷ (rightmost column) to 10² (leftmost column) bacteria are shown.

Fig. S1A in the supplemental material). Using primers complementary to the 5' end of *rcnA* and the 3' end of *yohN*, a 1,300-bp PCR product was detected, indicating that *rcnA* and *yohN* are cotranscribed. It has been previously shown that the transcription of *rcnA* is induced by Ni or Co (44) via the metalloregulator RcnR (3, 26). Quantitative real-time PCR assays were performed to monitor the expression of the *yohN* mRNA in NM522 cells grown in LB medium alone or medium supplemented with 1 mM NiSO_4 or 0.1 mM CoCl_2 . These metal ion concentrations induced the highest expression of the *rcnA::uidA* gene reporter fusion (44). Under these conditions, the expression of *yohN* was similarly induced by Ni or Co, leading to a 10-fold increase in expression, compared to cells grown in LB medium alone (see Fig. S1B). When assayed in the *rcnR* mutant strain, DB150, the level of expression of *yohN* was 8-fold higher than that of the wild-type (WT) strain, and the addition of Ni or Co to the growth medium had no significant effect ($P > 0.5$), indicating that *yohN* is negatively regulated by *rcnR*. The same pattern of mRNA expression has been previously obtained for *rcnA* (3), reaffirming the fact that *rcnA* and *yohN* are coexpressed and coregulated. For these reasons, *yohN* has been renamed *rcnB*.

***rcnB* is involved in Ni and Co resistance.** Because *rcnB* forms an operon with *rcnA*, we naturally investigated its function in Ni and Co metabolism. For that purpose, an *rcnB* deletion mutant was constructed from the WT strain, W3110, giving rise to strain WRCB1. Serial dilutions of fresh cultures grown in LB medium were spotted on M63 minimal medium plates supplemented with 0.4% glucose and, as required, with 50 μM NiSO_4 or CoCl_2 , followed by incubation at 37°C under aerobic or anaerobic growth conditions. After aerobic culture, growth of the WT strain was observed only for the two most concentrated bacterial dilutions when either Ni or Co was present in the medium (Fig. 1, upper panel). In contrast, the growth of the *rcnB* mutant was not influenced by Ni or Co because growth could be observed throughout the dilution range, similar to the growth observed in the absence of metals. This metal resistance phenotype is fully linked to the absence of *rcnB* because complementation of the *rcnB* mutant by a

TABLE 1. Ni and Co contents of a $\Delta rcnB$ mutant^a

Growth medium	Metal assayed	Mean (SD) for strain:		
		WT	$\Delta rcnB$ mutant	$\Delta rcnB/rcnB$ mutant
LB + Ni	Ni	14.3 (0.2)	11.8 (0.2)	18.6 (0.1)
LB + Co	Co	11.9 (0.5)	6.9 (0.1)	16.2 (0.1)
M63 + Ni	Ni	88 (13)	14 (0.5)	ND
M63 + Co	Co	114 (25)	37 (0.4)	ND

^a The wild-type strain (W3110), the $\Delta rcnB$ isogenic mutant (WRCB1), and the $\Delta rcnB$ mutant complemented by *rcnB* (WRCB1/pUCRCB) were grown in LB medium supplemented with 500 μ M NiSO₄ or 50 μ M CoCl₂ or in 0.4% glucose-M63 minimal medium supplemented with 50 μ M Ni or 15 μ M Co. Values (μ g/g dry weight) are the means of at least three independent ICP-OES measurements performed on independent cultures. ND, not determined.

plasmid-borne copy of the gene restored the wild-type phenotype. Under anaerobic growth conditions, similar results were obtained, with the exception that growth of the complemented mutant on glucose-supplemented medium was impaired, which will be discussed below. Therefore, *rcnB* plays a role in Ni and Co metabolism. Surprisingly, this phenotype is the opposite of what has been observed for the *rcnA* mutant cells, which are sensitive to Ni and Co (44).

***rcnB* mutants show reduced intracellular Ni or Co levels.** As *rcnB* mutants are more resistant to Ni and Co, one possible explanation is the reduced accumulation of these metals in the bacteria. Metal quantification by ICP-OES was first performed on whole, dried bacteria after growth in LB medium supplemented with subinhibitory concentrations of Ni or Co (0.5 mM Ni or 0.05 mM Co). The bacteria were harvested and washed with EDTA-supplemented buffer prior to analysis in order to minimize nonspecific interactions between metals and the bacterial cell envelope. Ni or Co was not detectable after growth in LB medium alone. Compared to the WT strain, the Ni or Co content in the *rcnB* mutant was reduced by 20% and 40%, respectively (Table 1), under the different conditions tested. Small peptides present in LB medium are known to chelate metals and to lower free metal concentrations. The same assays were thus repeated in minimal medium in the presence of 0.05 mM NiSO₄ or 0.015 mM CoCl₂; these conditions inhibited growth of the WT cells by approximately 10-fold (final OD), whereas no change was observed for the *rcnB* mutant. The metal content in the *rcnB* mutant was reduced by 68% for Co and 84% for Ni, compared to WT cells (Table 1). These results are consistent with those of the metal susceptibility test, and they support the proposed role of *rcnB* in Ni and Co metabolism. Complementation of the *rcnB* mutant by *rcnB* hosted on the pUC18 plasmid restored the cellular Ni and Co content to a level higher than what was measured for WT cells, confirming the function of *rcnB* in modulating Ni and Co accumulation. The increased quantity of the two metals present in this case is probably due to the high copy number of the pUC18 plasmid.

Because *rcnB* affects the profile of resistance to Ni and Co, several hypotheses regarding metal sequestration or compartmentalization in the bacterial cell may explain this phenomenon. To gain insights into the mode of action of *rcnB*, we investigated the consequences of changes in intracellular Ni and Co levels in *E. coli*. To achieve this, we took advantage of

the genetic systems utilized in our laboratory, specifically the *rcn* and *nik* systems. *rcnA* expression is induced by Ni and Co (3, 44) via the control of the metalloregulator RcnR (26, 29). A plasmid-borne gene fusion of *rcnA* and green fluorescent protein (*rcnA-gfp*; p157) (38) was used to monitor the level of expression of *rcnA* in LB medium supplemented with increasing concentrations of Ni or Co (Fig. 2A). Within the range of 0 to 1,000 μ M NiSO₄ and 0 to 30 μ M CoCl₂, green fluorescent protein (GFP) levels increased as a function of the concentration of added metal, and thus, this fusion can be used as an *in vivo* sensor of intracellular Ni or Co concentrations. The Ni and Co concentrations chosen thereafter were those providing the maximum response from the reporter gene. When introduced into the $\Delta rcnB$ strain, WRCB1, the level of fluorescence was sharply reduced in the presence of 1,000 μ M NiSO₄ or 100 μ M CoCl₂; the specific activity was 50% of that of the WT strain and was not significantly different from the background level (Fig. 2B). The same types of assays were conducted using a *nikA::lacZ* gene fusion. The *nikABCDE* operon involved in nickel uptake is expressed under anaerobic growth conditions (53), and its expression is specifically repressed by nickel via the metalloregulator NikR (12). As previously shown (54), the expression of the *nikA::lacZ* gene reporter fusion is inversely proportional to the concentration of Ni present. When assayed in the *nikA::lacZ* mutant, the β -galactosidase specific activity was reduced by more than half when 0.05 mM NiSO₄ was added to the growth medium (Fig. 2C, plot 1), and consequently, this concentration was used for further assays. Interestingly, in the $\Delta rcnB$ derivative, the expression of the fusion gene was the same in the absence and in the presence of Ni. Finally, when *rcnB* was expressed *in trans*, the expression profile was restored to the pattern exhibited by the *nikA* mutant. Taken together, these results demonstrate that when *rcnB* is impaired, the total cellular levels of Ni or Co are decreased and, more precisely, that it is the intracellular Ni and Co pools that are reduced.

RcnB is a soluble periplasmic protein. *rcnB* encodes a 112-amino-acid (aa) protein of 12,466 Da. A Sec-type signal peptide is predicted at the N terminus, with a cleavage site located after residue 21, leading to a mature polypeptide of 10,238 Da that presumably localizes to the periplasm. RcnB was overexpressed in *E. coli* and purified. Polyclonal antibodies raised against the purified protein were used for detection by immunoblotting. Periplasmic extracts were prepared and assayed for contamination by cytoplasmic proteins by measuring β -galactosidase activity before analysis by Western blotting. β -Lactamase, BlaM, encoded by vector pUC18, was used as a control for the periplasmic fractionation. RcnB could be detected in the periplasmic fraction of wild-type cells, demonstrating its periplasmic localization (see Fig. S2A, lane 1, in the supplemental material) and was clearly absent in the *rcnB* mutant (Fig. S2A, lane 3). Periplasmic localization was confirmed by N-terminal sequencing. RcnB was purified from the periplasmic fraction, and its N terminus was determined by Edman sequencing. The sequence of the first six amino acids was AGSTNT, corresponding to residues 26 to 31 of the predicted amino acid sequence. Thus, RcnB possesses a cleavable N-terminal signal sequence of 25 aa, leading to the 9,898-Da mature form of RcnB. The experimental cleavage site is 4 aa downstream of the predicted one.

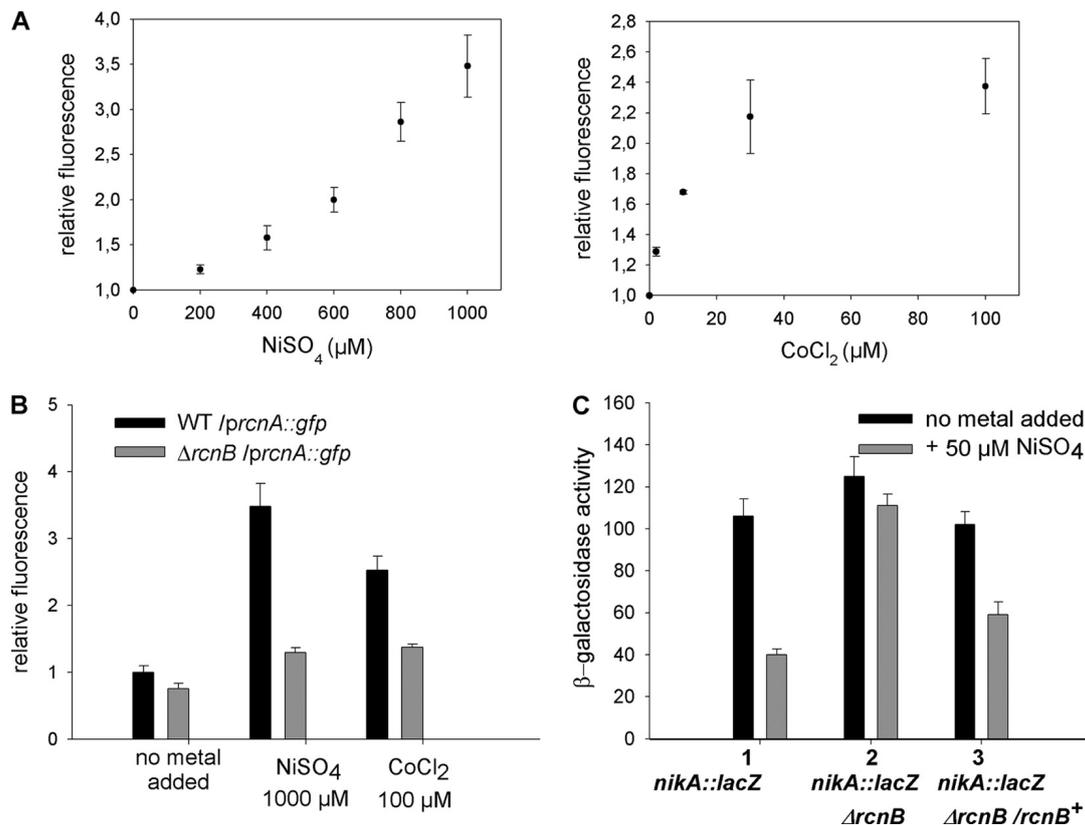


FIG. 2. Ni and Co intracellular concentrations are modified by *rcnB*. (A) Expression of the *rcnA::gfp* fusion in the presence of increasing concentrations of Ni (left) or Co (right). W3110 harboring plasmid p157 (*rcnA::gfp*) was grown aerobically in LB supplemented with the indicated metal concentrations, and the relative fluorescence of the *rcnA::gfp* gene fusion was calculated as follows: the specific fluorescence (F/OD_{600}), recorded in the presence of metals, was divided by the specific fluorescence assayed in the absence of metals. Results are the means of at least three independent experiments. The increases in fluorescence as a function of Ni or Co concentration can be represented by a hyperbolic function (48) with the following parameters: fluorescence of Co [0 to 30 μM] = $-0.0014 [\text{Co}]^2 + 0.0777 [\text{Co}] + 1.0587$, $R^2 = 0.9935$; fluorescence of Ni [0 to 1,000 μM] = $1.781 \times 10^{-6} [\text{Ni}]^2 + 0.0007 [\text{Ni}] + 0.9975$, $R^2 = 0.9946$. (B) The wild-type strain (W3110) or the $\Delta rcnB$ isogenic mutant (WRCB1)-carrying plasmid p157 (WT/*lprcnA::gfp* [black bars] or $\Delta rcnB$ /*lprcnA::gfp* [gray bars]) was grown in LB, LB plus 1,000 μM NiSO₄, or LB plus 100 μM CoCl₂, and fluorescence was assayed as described for panel A. (C) Expression of the *nika::lacZ* fusion. Cells were grown anaerobically in LB (black bars) or in LB plus 50 μM NiSO₄ (gray bars). β -Galactosidase activity is in nmol ONP min⁻¹ mg bacterial dry weight⁻¹. Strains: 1, *nika::lacZ* mutant (HYD72K1); 2, *nika::lacZ* $\Delta rcnB$ mutant (HYRB1); 3, *nika::lacZ* $\Delta rcnB/rcnB^+$ mutant (HYRB1 \times pUCRCB). Data are the means of at least three independent experiments. Standard deviations are presented in the figure.

Sequence comparison retrieved more than 150 homologs of RcnB among alpha-, beta-, and gammaproteobacteria, but none are previously described proteins (see Fig. S2B in the supplemental material). Similarly, no motifs could be detected in the sequence of RcnB using Interproscan (25). Alignment of the RcnB sequence demonstrated that the second half of the sequence is quite well conserved; however, there was no obvious conservation of residues potentially involved in metal liganding, except for H82 and D53 and, to a lesser extent, D95 and H111. Notably, RcnB lacks Cys residues. This is the case for all of the sequences considered, except for Q88FZ8 (*P. putida*) and Q882W6 (*P. syringae*), which do bear Cys within their predicted signal sequences and, consequently, are predicted to be lipoproteins. However, the latter prediction is tentative because the canonical sequence usually shared by lipoproteins is absent. The first half of the alignment exhibits no sequence conservation and a great variability in sequence length, which is due, in part, to the presence of a signal sequence. Concerning synteny, it is very diverse; the *rcnB* gene may lie close to *rcnA*, close to hypothetical efflux pumps, or

close to uncharacterized hypothetical open reading frames (ORFs) or as an orphan gene. Some organisms possess several copies of *rcnB*, for example, entries Q6FEG8 and B5XP92 from *Acinetobacter* sp., D0FUH8 and D0FV83 from *Erwinia pyrifoliae*, B5Y075 and B5XP92 from *Klebsiella pneumoniae*, and Q88FZ8 and Q88RS9 from *P. putida*.

RcnB does not bind Ni or Co directly. In view of its role and its cellular localization, the binding of Ni or Co ions by RcnB needed to be tested, and several different techniques were employed. The metalation of purified RcnB was first monitored by tryptophan fluorescence assays, as RcnB possesses two tryptophan residues that are well conserved in the sequence alignment. No changes in the spectra were observed following the addition of Ni or Co (data not shown). More direct methods were then applied using a ⁶³Ni radioactive isotope. Equilibrium dialysis and flow dialysis demonstrated no nickel binding by RcnB (data not shown). Filter binding assays, which had previously been used successfully to determine the affinity constant of NikR for Ni, were performed (14). When assayed in parallel, purified NikR bound ⁶³Ni, as observed in

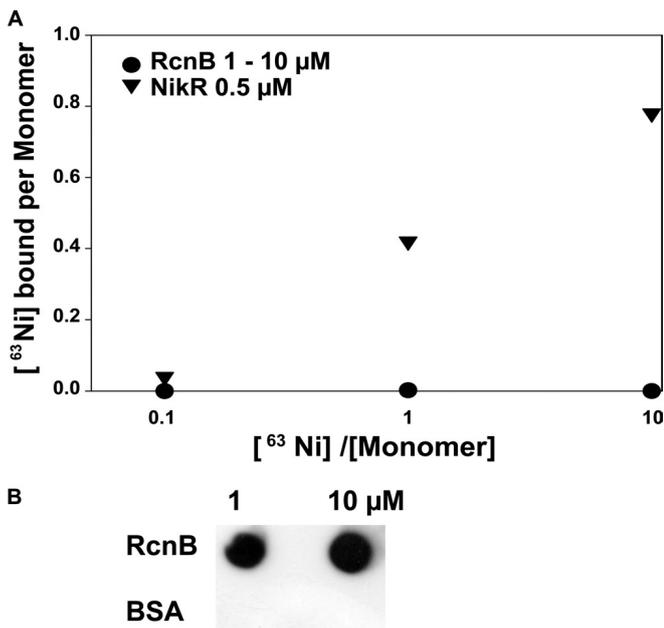


FIG. 3. Interaction of RcnB with Ni. (A) Filter binding assays: 1 μM or 10 μM RcnB (black circles) or 0.5 μM NikR (black triangles) was incubated with the indicated $^{63}\text{NiCl}_2$ concentrations and filtered onto PVDF membranes. ^{63}Ni bound to the membrane is plotted against total Ni concentration. (B) Dot blot assays: 10 μl of 1 or 10 μM RcnB or bovine serum albumin was filtered onto PVDF membranes and detected using anti-RcnB antibodies.

the previous study, whereas purified RcnB exhibited no binding (Fig. 3A). Dot blot and immunodetection showed that RcnB is retained well on the PVDF membrane after filtration (Fig. 3B). The protein and metal concentrations were varied, which indicates that the K_d (dissociation constant) of RcnB for Ni is much greater than 100 μM . Thus, we conclude that RcnB does not bind Ni or Co ions directly under the tested conditions.

RcnB operates independently of Ni entry. When RcnB is absent, *E. coli* strains are more resistant to Ni and Co. This correlates with a decrease in intracellular metal concentration (Fig. 2 and Table 1). As RcnB cannot bind Ni or Co directly, a role for RcnB in the storage of Ni and Co is unlikely. Therefore, we examined the possibility that RcnB acts on Ni and Co entry into the cytoplasm. In *E. coli*, specific Ni uptake occurs via the NikABCDE transporter, which is expressed under anaerobic growth conditions (34). *nik* mutants are defective in Ni-dependent hydrogenase activity, which can be restored when excess Ni is added to the growth medium (42, 54). Apart from the high-capacity magnesium transport system CorA, it has been suggested that another nickel import pathway operates in *E. coli* (34, 45). Therefore, we measured the hydrogenase activity of WT and mutant bacteria that were grown anaerobically in LB medium, either without added Ni or with 50 μM NiSO_4 . The restoration of hydrogenase activity in the *nik* mutants by the addition of nickel has been shown to reach roughly 50% of the level of the WT strain under these conditions (54). As expected, a similar pattern of hydrogenase recovery could be seen here (Fig. 4). In contrast, both the ΔrcnB mutant and the ΔrcnB mutant complemented by the plasmid-

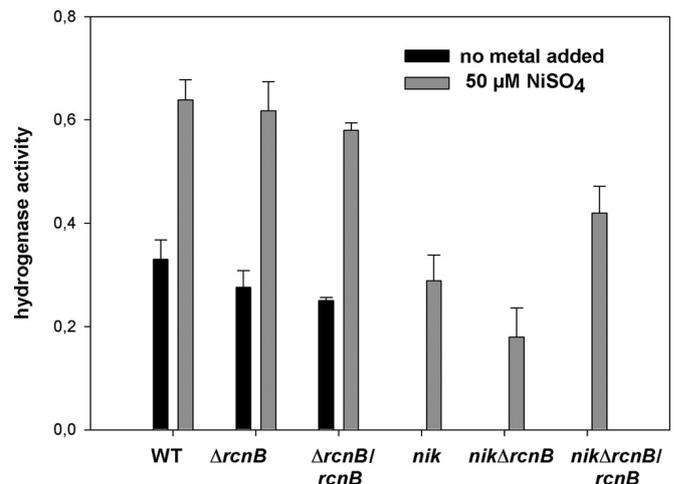


FIG. 4. Effect of *rcnB* on Ni acquisition. Total hydrogenase activity was measured after anaerobic growth in LBSM (black bars) or in LBSM supplemented with 50 μM NiSO_4 (gray bars). Specific hydrogenase activity is in μmol benzyl viologen reduced min^{-1} mg bacterial dry weight $^{-1}$. Strains: wild type (MC4100), ΔrcnB isogenic mutant (MRCB1), $\Delta\text{rcnB}/\text{rcnB}$ mutant (MRCB1/pUCRCB), *nikA::lacZ* isogenic mutant (HYD72K1), *nikA::lacZ* ΔrcnB isogenic mutant (HYRB1), and *nikA::lacZ* $\Delta\text{rcnB}/\text{rcnB}$ mutant (HYRB1 \times pUCRCB). Data are the means of at least three independent experiments. Standard deviations are presented in the figure.

borne *rcnB* allele exhibited levels of hydrogenase activity similar to that of the WT strain, both in the absence and in the presence of nickel. The *nik* ΔrcnB double mutant was constructed by transferring the ΔrcnB deletion into the *nik* mutant. Interestingly, the *nik* ΔrcnB mutant exhibited half the level of hydrogenase activity of the *nik* mutant, and complementation by the *rcnB* allele produced a strong enhancement of hydrogenase activity over that of the *nik* and *nik* ΔrcnB mutants. This result was consistent with the nickel content analysis (Table 1), confirming that RcnB modulates Ni homeostasis and demonstrating that it functions independently of the NikABCDE uptake system. This result also suggests that RcnB interacts poorly with auxiliary Ni uptake systems because no Ni would enter the cell in a *nik* ΔrcnB mutant. As a consequence, the reduction in intracellular Ni concentration associated with RcnB is unlikely to be due to altered Ni acquisition by the cell.

Absence of *rcnB* results in enhanced efflux of Ni. In order to clarify the function of *rcnB* in the dynamics of Ni and Co accumulation by the cell, the accumulation of ^{63}Ni was monitored in a time course assay. Unloaded cells were incubated with ^{63}Ni , and the kinetics of Ni uptake confirmed that a lower level of Ni was accumulated in the *rcnB* mutant than in the WT cells (Fig. 5A). We also analyzed the ΔrcnA mutant. In this mutant, RcnB is synthesized, as confirmed by Western blot experiments (see Fig. S2A in the supplemental material). In this case, ^{63}Ni accumulation was 2-fold higher than that in the parental strain (Fig. 5A), which is in agreement with previously published results (44). We previously used an *rcnA::uidA* insertion mutant, which was revealed by qRT-PCR to be an *rcnAB* double mutant because the *uidA*-Kan^r cassette has a polar effect on the downstream gene *rcnB* (data not shown). When tested, the ΔrcnA and

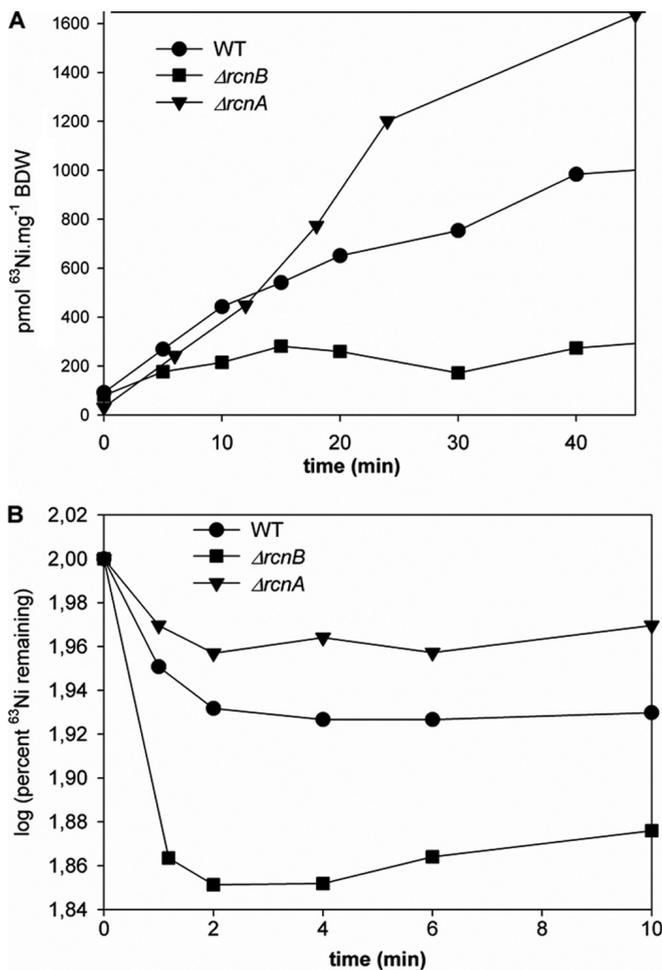


FIG. 5. *rcnB* acts on Ni efflux. (A) ^{63}Ni accumulation kinetics in the wild-type strain and its *rcn* derivatives. Strains: wild type (NM522, circles), $\Delta rcnB$ mutant (NRCB1, squares), and $\Delta rcnA$ mutant (NRCA1, triangles). (B) Effect of *rcnB* mutation on Ni efflux. Efflux was measured at 37°C in *E. coli* strains: wild type (W3110, circles), $\Delta rcnB$ mutant (WRCB1, squares), and $\Delta rcnA$ isogenic mutant (WRCA1, triangles). The experiments were repeated at least three times. The data shown are from a single, representative experiment.

rcnA::uidA mutants showed similar behaviors, with an increased sensitivity to Ni and Co and similar Ni uptake properties (data not shown). This concurs with RcnA being a Ni and Co efflux pump, as previously established (44), and suggests that *rcnA* is epistatic to *rcnB*, as there appears to be no difference between the *rcnA* and *rcnAB* mutants. These data imply that RcnB does not facilitate Ni uptake but, rather, has a possible role in the efflux of Ni.

The role of RcnB was further investigated with regard to Ni efflux. ^{63}Ni -loaded cells were incubated in unlabeled, fresh medium, and the cellular ^{63}Ni content was assayed at various time points. In this context, the rate of Ni efflux in the *rcnB* mutant was considerably higher than that of the WT strain (Fig. 5B). This result clearly demonstrates that RcnB acts on Ni efflux. The $\Delta rcnA$ mutant exhibited an efflux rate much lower than that of the WT strain (Fig. 5B), which is in agreement with RcnA being an efflux pump. Furthermore, this con-

firms the phenotypic dominance of RcnA over RcnB in the efflux of Ni. As the absence of *rcnB* facilitates the efflux of Ni, the role of RcnB is most likely to regulate or balance the efflux of Ni mediated by RcnA.

DISCUSSION

The present work identifies a protein of a new type that influences Ni and Co homeostasis in *E. coli*. The absence of RcnB clearly affected the physiology of the cells by dramatically increasing the resistance of *E. coli* to Ni and Co. We showed that this phenotype is linked to decreased intracellular concentrations of Ni or Co. As previously mentioned, metal trafficking is quite complex, and this may explain the observed differences in the resistance phenotypes between the aerobic and anaerobic growth conditions. The expression in *trans* of *rcnB* rendered the cells more sensitive to the depletion of oxygen (Fig. 1), likely due to increased metal accumulation. This phenomenon is not linked to RcnA, as we have previously shown that *rcnA* is expressed under both conditions (44). However, the existence of multiple import and export systems makes it difficult to demonstrate the role of an isolated protein. For this reason, we used several *E. coli* K-12 strains in this work, and we obtained similar results for all strains. The experimental conditions (medium compositions and metal concentrations) are also important and may explain the discrepancy observed here and in another study, where no phenotype was associated with *rcnB* (29). We also verified our data by performing the experiments on strain JW5346 (BW25113 $\Delta rcnB$ Cm r), obtained from the Keio collection (1), which fully confirmed our conclusions (data not shown).

To date, the only known periplasmic Ni-binding protein in *E. coli* is NikA, whereas none are known to bind Co. RcnB is localized to the periplasm, and there is no evidence that RcnB binds Ni or Co ions directly in the present study. Interestingly, the resolution of several NikA structures has provided breakthroughs in the understanding of metal liganding. An initial report presented the NikA structure as a typical periplasmic binding protein of the ABC family, though the position of Ni in this structure did not take into account its environment (24). A second study resolved the structure of NikA in complex with Fe(III)-EDTA (H_2O) bound at the substrate site, which suggested that NikA binds Ni in complex with a metallophore (7). Finally, the resolution of NikA crystallized after a periplasmic extraction in the absence of EDTA showed that the nickelophore was best modeled as butane-1,2,4-tricarboxylate (6), although its exact nature remains to be established. RcnB could interact with metals in a similar way, by liganding Ni or Co complexed to a prosthetic group.

RcnB could be involved in Ni and Co homeostasis, either by increasing metal import or by decreasing export. We have shown, by monitoring hydrogenase activity (Fig. 4), that RcnB is certainly not involved in importing Ni. This conclusion is further supported by the fact that the expression of *rcnB* is induced by Ni or Co (see Fig. S1C in the supplemental material), which would conflict with a role in importing these toxic compounds.

Homeostasis is primarily the result of a balance between the entry and exit of metals. Hence, the regulation of transporters is under the control of metallosensory regulatory proteins (31).

To avoid excess removal of Ni or Co from the cytoplasm, the transcription of the efflux pump RcnA is under the control of the metallorepressor RcnR (26). The transcription of the NikABCDE importer is repressed by the NikR metalloregulator (12). Induction of *rcnA* and repression of the *nik* operon by Ni have been shown to be sequential, i.e., *PnikA* is repressed by Ni concentrations that are lower than those needed for the activation of *PrcnA* (26). In this study, we demonstrate that RcnB is a soluble periplasmic protein that influences Ni and Co homeostasis. RcnB could be a transmitter in a signal transduction pathway across the cytoplasmic membrane, as is observed for other systems (51). This signal transduction cascade would lead to modifications in the transcription of Ni or Co efflux systems. More precisely, it could be supposed that RcnA is the target because we have shown that the action of RcnB is dependent on the presence of *rcnA* (Fig. 5); in view of the phenotype associated with *rcnB*, when *rcnB* is impaired, *rcnA* would be upregulated. Nevertheless, when assayed in the Δ *rcnB* mutant, the *rcnA-gfp* gene fusion exhibited induction levels that were lower than those in the WT strain in the presence of Ni or Co (Fig. 2B), which contradicts the above hypothesis.

Finally, we clearly show that RcnB is involved in the efflux of Ni. The fact that RcnB does not bind Ni or Co ions and does not influence the transcription of *rcnA* argues in favor of RcnB exerting its function via protein-protein interactions, especially with RcnA. This is further indicated by the fact that, in the absence of *rcnA* and the presence of RcnB, more Ni is accumulated by the cells (Fig. 5). Moreover, *rcnA* and *rcnB* are cotranscribed (see Fig. S1 in the supplemental material). Efflux in bacteria can occur via a wide variety of structurally diverse systems. Members of the CDF, MFS, P-type ATPase, and RND families (for a review, see reference 36) have been shown to export metals with narrow or broad substrate specificities. However, none of the metal efflux systems and, even more generally, none of the efflux systems seem to function with a soluble periplasmic protein, with the possible exception of the RND CusCFBA system of *E. coli*. RND protein complexes transport their substrates from the periplasm to the extracellular space. The *cusCFBA* operon in *E. coli* encodes an RND copper efflux system made up of CusC (OMF), CusB (MFP), and CusA (RND) (37). This RND system comprises an additional small periplasmic protein, CusF (21). Mutation of any of the *cusCFBA* genes leads to enhanced copper sensitivity, although to a lesser extent for *cusF* (18). CusF and CusB interact in a metal-dependent way, and Cu(I) is transferred between CusF and CusB (2). The precise mechanism of efflux is not understood, but this example emphasizes that export is also mediated by periplasmic proteins. A striking difference with the RcnAB efflux system is that mutations in *cusF* or *cusB* diminish Cu export, whereas mutations in *rcnB* enhance Ni and Co efflux. Moreover, no RND system involved in Ni or Co efflux has been identified in *E. coli*. Another interesting feature of RND systems is that they mediate efflux predominantly from the periplasmic space, outside the cell, as emerging evidence suggests that the detoxification of toxic compounds occurs in two steps. The compounds are first transported from the cytoplasm to the periplasm by an inner-membrane efflux system, and then, an RND-type exporter, with overlapping specificity, expels the drugs (50) or the metals (47) from the periplasm to

the extracellular milieu. These examples highlight the importance of the step conducted in the periplasmic space in efflux-mediated resistance mechanisms, and further studies are necessary to establish a role for RcnB as a possible intermediate in these networks.

Another interesting example regarding the pivotal role of a periplasmic transport protein has been recently reported for the sialic acid-specific uptake system in *Haemophilus influenzae*. SiaP is the periplasmic substrate binding protein of the TRAP (tripartite ATP-independent periplasmic transporter) importer SiaPQM. *In vitro* experiments confirmed that SiaP is an essential component of the import system; intriguingly, under some experimental conditions, SiaP was able to trigger the reverse event, i.e., the export of sialic acid by the inner-membrane complex SiaQM (33).

The present work provides compelling evidence of a new biological function and demonstrates the existence of alternative efflux mechanisms. Indeed, from the data collected here, RcnB can be proposed to function as a valve that regulates Ni and Co efflux by RcnA. Further work is required to investigate the interactions between RcnB and other proteins and to understand its control over metal movements.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNRS, IFCPAR grant no. 3709, INSA Lyon BQR. C.B. was supported by a grant from the French Ministry of Research.

We thank G. Condemine for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Baba, T., et al. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**:2006.0008.
- Bagai, I., C. Rensing, N. J. Blackburn, and M. M. McEvoy. 2008. Direct metal transfer between periplasmic proteins identifies a bacterial copper chaperone. *Biochemistry* **47**:11408–11414.
- Blaha, D., et al. 2011. The *Escherichia coli* metallo-regulator RcnR represses *rcnA* and *rcnR* transcription through binding on a shared operator site: insights into regulatory specificity towards nickel and cobalt. *Biochimie* **93**:434–439.
- Cadioux, N., et al. 2002. Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:706–717.
- Cadioux, N., and R. J. Kadner. 1999. Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:10673–10678.
- Cherrier, M. V., C. Cavazza, C. Bochet, D. Lemaire, and J. C. Fontecilla-Camps. 2008. Structural characterization of a putative endogenous metal chelator in the periplasmic nickel transporter NikA. *Biochemistry* **47**:9937–9943.
- Cherrier, M. V., et al. 2005. Crystallographic and spectroscopic evidence for high affinity binding of FeEDTA(H₂O)- to the periplasmic nickel transporter NikA. *J. Am. Chem. Soc.* **127**:10075–10082.
- Cvetkovic, A., et al. 2010. Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature* **466**:779–782.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:6640–6645.
- Degen, O., and T. Eitinger. 2002. Substrate specificity of nickel/cobalt permeases: insights from mutants altered in transmembrane domains I and II. *J. Bacteriol.* **184**:3569–3577.
- Degen, O., M. Kobayashi, S. Shimizu, and T. Eitinger. 1999. Selective transport of divalent cations by transition metal permeases: the *Alcaligenes eutrophus* HoxN and the *Rhodococcus rhodochrous* NhlF. *Arch. Microbiol.* **171**:139–145.
- De Pina, K., V. Desjardin, M. A. Mandrand-Berthelot, G. Giordano, and L. F. Wu. 1999. Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:670–674.
- De Pina, K., et al. 1995. Purification and characterization of the periplasmic nickel-binding protein NikA of *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **227**:857–865.
- Diederix, R. E., C. Fauquant, A. Rodrigue, M. A. Mandrand-Berthelot, and

- I. Michaud-Soret. 2008. Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II). *Chem. Commun. (Camb.)* **15**:1813–1815.
15. Eitinger, T., D. A. Rodionov, M. Grote, and E. Schneider. 2011. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**:3–67.
 16. Eitinger, T., J. Suhr, L. Moore, and J. A. Smith. 2005. Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. *Biometals* **18**:399–405.
 17. Fantino, J. R., B. Py, M. Fontecave, and F. Barras. 2010. A genetic analysis of the response of *Escherichia coli* to cobalt stress. *Environ. Microbiol.* **12**:2846–2857.
 18. Franke, S., G. Grass, C. Rensing, and D. H. Nies. 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:3804–3812.
 19. Gikas, P. 2008. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review. *J. Hazard. Mater.* **159**:187–203.
 20. Grass, G., et al. 2005. The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J. Bacteriol.* **187**:1604–1611.
 21. Grass, G., and C. Rensing. 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2145–2147.
 22. Haferburg, G., G. Kloess, W. Schmitz, and E. Kothe. 2008. “Ni-struvite”—a new biomineral formed by a nickel resistant *Streptomyces acidiscabies*. *Chemosphere* **72**:517–523.
 23. Haritha, A., et al. 2009. MrdH, a novel metal resistance determinant of *Pseudomonas putida* KT2440, is flanked by metal-inducible mobile genetic elements. *J. Bacteriol.* **191**:5976–5987.
 24. Heddle, J., D. J. Scott, S. Unzai, S. Y. Park, and J. R. Tame. 2003. Crystal structures of the liganded and unliganded nickel-binding protein NikA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**:50322–50329.
 25. Hunter, S., et al. 2009. InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res.* **37**:D211–D215.
 26. Iwig, J. S., J. L. Rowe, and P. T. Chivers. 2006. Nickel homeostasis in *Escherichia coli*—the *rcnR-rcnA* efflux pathway and its linkage to NikR function. *Mol. Microbiol.* **62**:252–262.
 27. Kaluarachchi, H., K. C. Chan Chung, and D. B. Zamble. 2010. Microbial nickel proteins. *Nat. Prod. Rep.* **27**:681–694.
 28. Kobayashi, M., and S. Shimizu. 1999. Cobalt proteins. *Eur. J. Biochem.* **261**:1–9.
 29. Koch, D., D. H. Nies, and G. Grass. 2007. The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *Biometals* **20**:759–771.
 30. Locher, K. P., A. T. Lee, and D. C. Rees. 2002. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091–1098.
 31. Ma, Z., F. E. Jacobsen, and D. P. Giedroc. 2009. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* **109**:4644–4681.
 32. Miller, J. H. 1992. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 33. Mulligan, C., et al. 2009. The substrate-binding protein imposes directionality on an electrochemical sodium gradient-driven TRAP transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:1778–1783.
 34. Navarro, C., L. F. Wu, and M. A. Mandrand-Berthelot. 1993. The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol. Microbiol.* **9**:1181–1191.
 35. Niegowski, D., and S. Eshaghi. 2007. The CorA family: structure and function revisited. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**:2564–2574.
 36. Nies, D. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:313–339.
 37. Outten, F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale, and T. V. O’Halloran. 2001. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**:30670–30677.
 38. Perrin, C., et al. 2009. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:1723–1733.
 39. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
 40. Pimentel, B. E., R. Moreno-Sánchez, and C. Cervantes. 2002. Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**:249–254.
 41. Rodionov, D. A., P. Hebbeln, M. S. Gelfand, and T. Eitinger. 2006. Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *J. Bacteriol.* **188**:317–327.
 42. Rodrigue, A., et al. 1996. Involvement of the GroE chaperonins in the nickel-dependent anaerobic biosynthesis of NiFe-hydrogenases of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:4453–4460.
 43. Rodrigue, A., A. Chanal, K. Beck, M. Muller, and L. F. Wu. 1999. Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial *tat* pathway. *J. Biol. Chem.* **274**:13223–13228.
 44. Rodrigue, A., G. Effantin, and M. A. Mandrand-Berthelot. 2005. Identification of *renA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:2912–2916.
 45. Rowe, J. L., G. L. Starnes, and P. T. Chivers. 2005. Complex transcriptional control links NikABCDE-dependent nickel transport with hydrogenase expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:6317–6323.
 46. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 47. Scherer, J., and D. H. Nies. 2009. CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Mol. Microbiol.* **73**:601–621.
 48. Stocker, J., et al. 2003. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ. Sci. Technol.* **37**:4743–4750.
 49. Stoof, J., E. J. Kuipers, G. Klaver, and A. H. M. van Vliet. 2010. An ABC transporter and a TonB ortholog contribute to *Helicobacter mustelae* nickel and cobalt acquisition. *Infect. Immun.* **78**:4261–4267.
 50. Tal, N., and S. Schuldiner. 2009. A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:9051–9056.
 51. Tetsch, L., and K. Jung. 2009. How are signals transduced across the cytoplasmic membrane? Transport proteins as transmitter of information. *Amino Acids* **37**:467–477.
 52. Valko, M., H. Morris, and M. T. Cronin. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12**:1161–1208.
 53. Wu, L. F., and M. A. Mandrand-Berthelot. 1986. Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie* **68**:167–179.
 54. Wu, L. F., et al. 1989. Nickel deficiency gives rise to the defective hydrogenase phenotype of *hydC* and *fir* mutants in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3**:1709–1718.
 55. Wu, L. F., C. Navarro, K. de Pina, M. Quenard, and M. A. Mandrand. 1994. Antagonistic effect of nickel on the fermentative growth of *Escherichia coli* K-12 and comparison of nickel and cobalt toxicity on the aerobic and anaerobic growth. *Environ. Health Perspect.* **102**(Suppl. 3):297–300.

The periplasmic protein RcnB is involved in nickel and cobalt homeostasis in *Escherichia coli*

Camille Blériot, Marie-Andrée Mandrand-Berthelot and Agnès Rodrigue



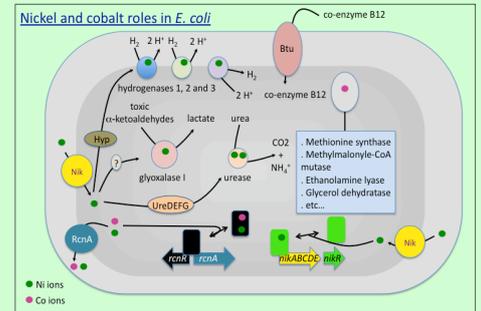
camille.bleriot@insa-lyon.fr

UMR5240 : Microbiology, Adaptation and Pathogenicity
National Institute of Applied Sciences, Lyon, France



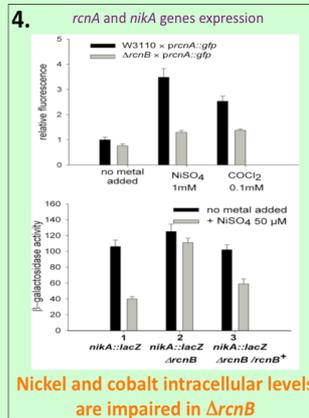
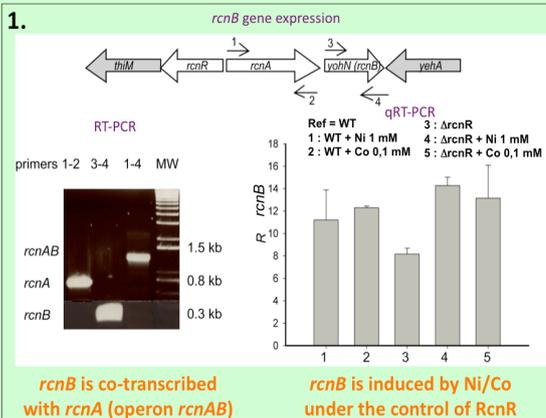
INTRODUCTION

Metals are ubiquitous on Earth and have become necessary for living organisms like bacteria. However, there is a subtle balance between the life-required amount and toxicity resulting from too much metal. The intracellular level of these ions must be tightly regulated by bacteria. A strategy often used by cells is to regulate import and efflux of metal ions by expressing specific proteins involved in this transport. In *Escherichia coli*, nickel is necessary for enzymes like hydrogenases or ureases and cobalt is the core-element of the coenzyme B12-Vitamin. A specific ABC-transporter encoded by the *nikABCDE* operon permits nickel ions to be imported from the environment. But an overload of ions can be deleterious for bacterial cells because of aspecific interactions with nucleic acids and proteins. This toxicity is counterbalanced by action of the RcnA efflux pump that permits excess ions to be excluded. Its expression is under the control of the nickel and cobalt inducible RcnR metalloregulator that represses *rcnA* transcription in absence of metals. Recently, we identified a new gene that we called *rcnB* (formerly *yohN*) involved in this system. Here, we describe this new element of the nickel and cobalt homeostasis in *E. coli*.

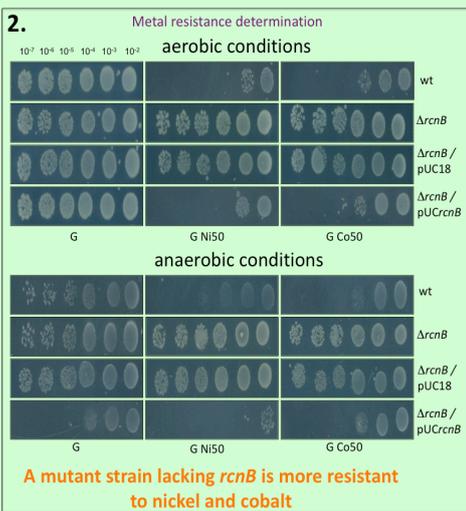
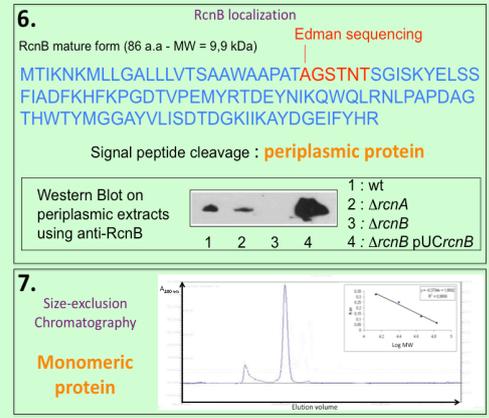


RESULTS

PHENOTYPICAL STUDY



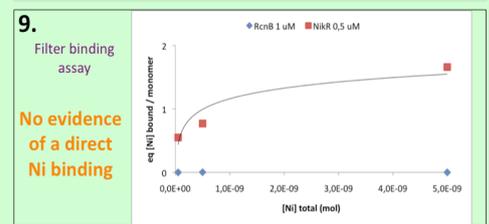
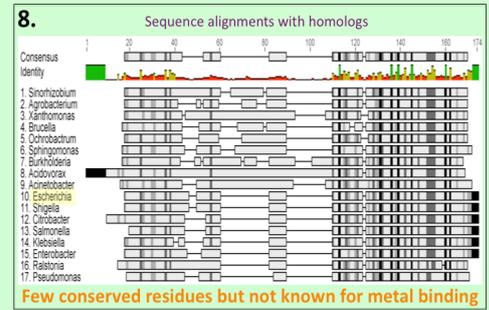
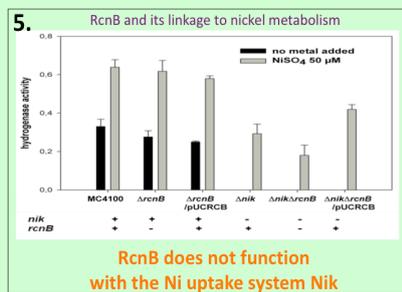
PROTEIN CHARACTERIZATION



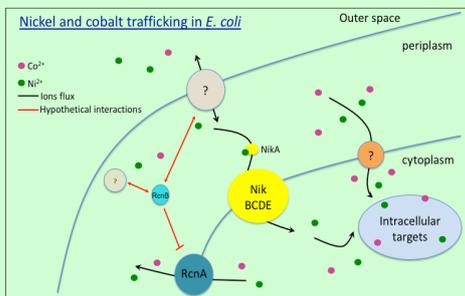
3. ICP-OES analysis

strains	wt	Δ rcnB	Δ rcnB pUCrcnB
Ni (ppm)	14,3 (+/- 0,2)	11,8 (+/- 0,2)	18,6 (+/- 0,1)
Co (ppm)	11,9 (+/- 0,5)	6,9 (+/- 0,1)	16,2 (+/- 0,1)

Δ rcnB accumulates less Ni and Co



CONCLUSION



Herein, we showed that *rcnB* (formerly *yohN*) is part of the nickel and cobalt inducible operon *rcnAB*. We constructed a mutant strain lacking *rcnB* and we studied this mutant. It was more resistant to both nickel and cobalt and complementation by wild-type gene reversed the phenotype. By using both physiological and biophysical methods, we demonstrated that this mutant *rcnB* accumulates less nickel and cobalt. RcnB is a small periplasmic protein soluble as a monomer. Sequence analyses with homologs do not highlight any conserved residues known for metal ions binding. *In vitro*, we used several methods to assess nickel / cobalt binding to RcnB but there are no evidence of a direct interaction. Altogether, our data strongly suggest RcnB to be involved in nickel and cobalt resistance by modulating RcnA activity but further investigations are required especially to check if RcnB can interact with RcnA or another protein. These studies aim to precise the exact function of RcnB that is the first member of a new family of accessory proteins involved in metal homeostasis in bacteria.