



**HAL**  
open science

# L'homéostasie des métaux chez la bactérie *Escherichia coli*: de l'analyse générale d'un stress sur l'expression des gènes, à la compréhension des mécanismes moléculaires

Manon Gault

► **To cite this version:**

Manon Gault. L'homéostasie des métaux chez la bactérie *Escherichia coli*: de l'analyse générale d'un stress sur l'expression des gènes, à la compréhension des mécanismes moléculaires. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Lyon, 2014. Français. NNT : 2014ISAL0130 . tel-01242555

**HAL Id: tel-01242555**

**<https://theses.hal.science/tel-01242555>**

Submitted on 13 Dec 2015

**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

**L'homéostasie des métaux chez la bactérie  
*Escherichia coli* : de l'analyse générale d'un stress  
sur l'expression des gènes, à la compréhension des  
mécanismes moléculaires.**

Présentée devant

**L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon**

Pour obtenir  
le grade de docteur

Formation doctorale  
Microbiologie Moléculaire

Ecole doctorale  
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation (E2M2)

Présentée par

**Manon Gault**

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

Soutenance publique le 12 Décembre 2014 devant le jury

---

Mme	Hilde DE REUSE	Directrice de recherche (l'Institut Pasteur Paris)
Mme	Alia DELLAGI	Maître de conférences (INRA-AgroParisTech Versailles)
M	William NASSER	Directeur de recherche (CNRS Lyon)
Mme	Agnès RODRIGUE	Maître de conférences (INSA lyon)

---



**INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015**

<b>SIGLE</b>	<b>ECOLE DOCTORALE</b>	<b>NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE</b>
<b>CHIMIE</b>	<p><b>CHIMIE DE LYON</b>  <a href="http://www.edchimie-lyon.fr">http://www.edchimie-lyon.fr</a>                      Sec : Renée EL MELHEM                      Bat Blaise Pascal 3<sup>e</sup> etage                      04 72 43 80 46                      Insa : R. GOURDON  <a href="mailto:secretariat@edchimie-lyon.fr">secretariat@edchimie-lyon.fr</a></p>	<p><b>M. Jean Marc LANCELIN</b>                      Université de Lyon – Collège Doctoral                      Bât ESCPE                      43 bd du 11 novembre 1918                      69622 VILLEURBANNE Cedex                      Tél : 04.72.43 13 95  <a href="mailto:directeur@edchimie-lyon.fr">directeur@edchimie-lyon.fr</a></p>
<b>E.E.A.</b>	<p><b>ELECTRONIQUE,                      ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</b>  <a href="http://edeea.ec-lyon.fr">http://edeea.ec-lyon.fr</a>                      Sec : M.C. HAVGOUDOUKIAN  <a href="mailto:eea@ec-lyon.fr">eea@ec-lyon.fr</a></p>	<p><b>M. Gérard SCORLETTI</b>                      Ecole Centrale de Lyon                      36 avenue Guy de Collongue                      69134 ECULLY                      Tél : 04.72.18 60.97 Fax : 04 78 43 37 17  <a href="mailto:Gerard.scorletti@ec-lyon.fr">Gerard.scorletti@ec-lyon.fr</a></p>
<b>E2M2</b>	<p><b>EVOLUTION, ECOSYSTEME,                      MICROBIOLOGIE, MODELISATION</b>  <a href="http://e2m2.universite-lyon.fr">http://e2m2.universite-lyon.fr</a>                      Sec : Safia AIT CHALAL                      Bat Atrium- UCB Lyon 1                      04.72.44.83.62                      Insa : S. REVERCHON  <a href="mailto:Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr">Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr</a></p>	<p><b>Mme Gudrun BORNETTE</b>                      CNRS UMR 5023 LEHNA                      Université Claude Bernard Lyon 1                      Bât Forel                      43 bd du 11 novembre 1918                      69622 VILLEURBANNE Cédex                      Tél : 06.07.53.89.13  <a href="mailto:e2m2@univ-lyon1.fr">e2m2@univ-lyon1.fr</a></p>
<b>EDISS</b>	<p><b>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-                      SANTE</b>  <a href="http://www.ediss-lyon.fr">http://www.ediss-lyon.fr</a>                      Sec : Safia AIT CHALAL                      Bat Atrium – UCB Lyon 1                      04 72 44 83 62                      Insa :  <a href="mailto:Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr">Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr</a></p>	<p><b>Mme Emmanuelle CANET-SOULAS</b>                      INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1                      Bâtiment IMBL                      11 avenue Jean Capelle INSA de Lyon                      696621 Villeurbanne                      Tél : 04.72.68.49.09 Fax :04 72 68 49 16  <a href="mailto:Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr">Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr</a></p>
<b>INFOMATHS</b>	<p><b>INFORMATIQUE ET                      MATHEMATIQUES</b>  <a href="http://infomaths.univ-lyon1.fr">http://infomaths.univ-lyon1.fr</a>                      Sec :Renée EL MELHEM                      Bat Blaise Pascal                      3<sup>e</sup> etage  <a href="mailto:infomaths@univ-lyon1.fr">infomaths@univ-lyon1.fr</a></p>	<p><b>Mme Sylvie CALABRETTO</b>                      LIRIS – INSA de Lyon                      Bat Blaise Pascal                      7 avenue Jean Capelle                      69622 VILLEURBANNE Cedex                      Tél : 04.72. 43. 80. 46 Fax 04 72 43 16 87  <a href="mailto:Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr">Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr</a></p>
<b>Matériaux</b>	<p><b>MATERIAUX DE LYON</b>  <a href="http://ed34.universite-lyon.fr">http://ed34.universite-lyon.fr</a>                      Sec : M. LABOUNE                      PM : 71.70 –Fax : 87.12                      Bat. Saint Exupéry  <a href="mailto:Ed.materiaux@insa-lyon.fr">Ed.materiaux@insa-lyon.fr</a></p>	<p><b>M. Jean-Yves BUFFIERE</b>                      INSA de Lyon                      MATEIS                      Bâtiment Saint Exupéry                      7 avenue Jean Capelle                      69621 VILLEURBANNE Cedex                      Tél : 04.72.43 71.70 Fax 04 72 43 85 28  <a href="mailto:Ed.materiaux@insa-lyon.fr">Ed.materiaux@insa-lyon.fr</a></p>
<b>MEGA</b>	<p><b>MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE                      CIVIL, ACOUSTIQUE</b>  <a href="http://edmega.universite-lyon.fr/">http://edmega.universite-lyon.fr/</a>                      Sec : M. LABOUNE                      PM : 71.70 –Fax : 87.12                      Bat. Saint Exupéry  <a href="mailto:mega@insa-lyon.fr">mega@insa-lyon.fr</a></p>	<p><b>M. Philippe BOISSE</b>                      INSA de Lyon                      Laboratoire LAMCOS                      Bâtiment Jacquard                      25 bis avenue Jean Capelle                      69621 VILLEURBANNE Cedex                      Tél : 04.72 .43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37  <a href="mailto:Philippe.boisse@insa-lyon.fr">Philippe.boisse@insa-lyon.fr</a></p>
<b>ScSo</b>	<p><b>ScSo*</b>  <a href="http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/">http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/</a>                      Sec : Viviane POLSINELLI                      Brigitte DUBOIS                      Insa : J.Y. TOUSSAINT  <a href="mailto:viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr">viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr</a></p>	<p><b>Mme Isabelle VON BUELTZINGLOEWEN</b>                      Université Lyon 2                      86 rue Pasteur                      69365 LYON Cedex 07                      Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48  <a href="mailto:isavonb@gmail.com">isavonb@gmail.com</a></p>

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



---

## Remerciements

Il y a trois et demi (presque quatre), débutait mon projet fou de réaliser une thèse. Pas si fou au final, puisque la rédaction du manuscrit se termine. Je profite ainsi de ces lignes pour remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je souhaite remercier en premier lieu les membres du jury Alia Dellagi, Hilde de Reuse et William Nasser d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je remercie ensuite très chaleureusement Agnès Rodrigue, ma directrice de thèse. Merci de m'avoir fait confiance dès mes premiers pas dans le monde de la recherche et de m'avoir apporté ce solide bagage scientifique me permettant maintenant de faire le tour du monde.

Bien sûr, ces travaux n'auraient pas été possible sans le soutien d'une équipe. Merci à Marie-Andrée Mandrand-Berthelot et Erwan Gueguen pour leurs nombreux conseils avisés et la relecture de ce manuscrit. Merci à Elsa, Gégé et Julien pour avoir été d'un formidable soutien au labo. "Pas facile tous les jours d'être à côté de la paillasse d'un thésard!!! " Merci aux étudiants qui ont réalisé quelques manips avec moi. Kévin, je te cède à mon tour la paillasse du thésard de l'équipe "Bactéries et Métaux". Fais en bon usage! J'espère avoir été digne de cette place qui m'avait été léguée par Camille Blériot. Il est vrai que tu ne fais plus partie de cette équipe à présent mais cette thèse n'aurait pas été la même sans tes travaux. Merci pour tes précieux conseils.

A deux reprises, j'ai eu la chance de pouvoir discuter de mon travail lors de mes comités de pilotage. J'aimerais remercier Isabelle Michaud-Soret, Florence Hommais, Corine Dorel et mon tuteur Xavier Nesme de m'avoir écoutée, conseillée et encouragée.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'unité et des personnes qui la compose et la font avancer. Merci au soutien technique, Jean-Michel, Yvette et Véro pour l'aide que vous m'avez apportée et surtout le temps que vous m'avez fait gagner. Merci aux autres thésards Natasha, Camille, Elodie, Arnaud, Yohann, Benjamin avec qui j'ai partagé de très agréables moments.

Un remerciement tout particulier aux personnes de l'équipe "Levures" qui partagent notre étage. Merci à Claire, Alexandre et Marc pour votre expertise lors de mes manips de levures! Et surtout un grand merci à mes camarades de bureau Sana et Amélie qui ont partagé une grande partie de cette thèse avec moi.

Les personnes que j'aimerais tout particulièrement remercier dans mes collègues mais qui sont devenus, après ces trois années de thèse, de véritables amis, Camille, Magali et Julien. Il n'y a pas de mot pour dire que vous avez été un véritable soutien moral. Merci d'avoir partagé mes moments de doutes comme les instants les plus délirants.

---

Cette dernière année, en plus d'avoir écrit une thèse, j'ai eu l'immense chance d'organiser une exposition incroyable sur un scientifique incroyable ! Merci à toute l'équipe de l'expo "Yersin", Josy, Alex, Christophe, Erwan et Julien pour cette formidable aventure.

Comme beaucoup l'on remarqué, j'ai la bougeotte et heureusement que les amis sont là pour la canaliser. Merci aux Ardéchois, Cogo, Baude, Daph, Isa, Loren, Vinc', Tony et Lyly. Merci aux Lyonnais Seb, Marie, Tof, Célia, Clo et Nico. Merci aux Marseillais Damelou et Cissou. Merci à tous de m'avoir fait découvrir vos montagnes, votre mer, vos rivières et vos falaises, ....

Et dans le plus "Grand-Ouest", je remercie mes amis de toujours, Lulu, Flora, Simon, Manu et Jean d'être là quand je reviens dans la région pour boire un petit verre de Côteaux du Layon. Avec modération bien sûr !

Enfin, ce projet fou n'aurait pas été possible sans le soutien inconditionnel de mon frère, de mes parents et de ma famille qui m'encouragent depuis toujours et qui m'ont dit un jour : "Même si c'est fou, fonce et fais ce dont tu as envie de faire..."

*"Ce n'est pas une vie que de ne pas bouger"*

Alexandre Yersin







---

## Résumé

Les métaux sont indispensables à la vie cellulaire car ils sont constitutifs de nombreuses protéines. Les ions nickel, par exemple, font partie intégrante des hydrogénases, enzymes primordiales pour le métabolisme énergétique. Paradoxalement, en excès, les ions métalliques deviennent toxiques pour la cellule. Les bactéries luttent contre cette toxicité en produisant différents systèmes de résistance ou d'adaptation. Les cellules procaryotes peuvent, par exemple, équilibrer les teneurs en ions métalliques en contrôlant leur entrée ou leur efflux grâce à la biogenèse de transporteurs spécifiques. L'objectif de ces travaux de thèse a consisté à comprendre les mécanismes principaux permettant à la bactérie modèle *Escherichia coli* de s'adapter à de fortes variations en ions métalliques, en prenant comme modèle un stress provoqué par un excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Afin d'appréhender l'ensemble de la réponse cellulaire, l'effet de ce stress a été évalué sur l'expression de l'ensemble des gènes d'*E. coli* par des approches de transcriptomique couplées à une validation fonctionnelle.

L'excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  induit le système d'efflux RcnRAB. En plus de la pompe d'efflux RcnA, ce système comporte une protéine périplasmique, RcnB, qui module le trafic des ions  $\text{Ni}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$  via RcnA. Ces travaux ont montré que RcnB n'interagit pas avec les ions  $\text{Ni}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$  mais de façon inattendue avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$ , définissant une nouvelle classe de cupro-protéines. Nous montrons que si RcnB n'intervient pas dans le contrôle de l'homéostasie du Cu, l'interaction avec ces ions est essentielle à sa fonction dans la modulation de l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ . Ces résultats suggèrent des connexions entre les différents systèmes de maintien des homéostasies métalliques. En effet les résultats d'analyse transcriptomique montrent une forte modulation de l'expression des gènes impliqués dans les homéostasies du Cu et du Fe en présence d'un excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ , corrélée à une augmentation cellulaire de leur teneur mesurée par spectrométrie plasma. Ces deux métaux sont responsables de la production d'espèces réactives oxygénées entraînant d'importants dégâts cellulaires, une des cibles privilégiée étant l'ADN. Nous montrons que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  ne provoquent pas de cassures de l'ADN et n'ont pas d'effet mutagène, par contre ils provoquent une modification importante de l'état de repliement de l'ADN. Nous proposons que ce relâchement de l'ADN soit dû à l'induction indirecte d'un stress oxydant.

Ces travaux ont également aboutis à l'identification du premier système de transport des ions  $\text{Ni}^{2+}$  à travers la membrane externe chez *E. coli*. Ce système, composé des protéines YddA et YddB, permet le franchissement des deux membranes et s'exprime dans des conditions de micro-aérobiose en milieu minimum proches de conditions de vie de type biofilm. De plus, ces travaux ont montré que l'excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  favorisait la formation d'un biofilm par opposition à un mode de développement planctonique. En effet, lors d'un stress nickel, la synthèse des flagelles est réprimée et la synthèse de structures permettant l'adhérence est activée.

En résumé, un excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  affecte les systèmes spécifiques d'entrée et d'efflux des ions métalliques troublant les teneurs intracellulaires des autres métaux comme le Cu et le Fe. Ces métaux sont en partie responsables de la production de ROS létaux pour les cellules bactériennes. L'excès de Ni va induire une profonde reprogrammation génétique entraînant des changements physiologiques multifactoriels importants pour la survie bactérienne dans ces conditions de stress.

**Mots-Clés :** *Escherichia coli*, métaux, homéostasie, résistance, transcriptome, motilité, stress oxydant, topologie de l'ADN.



---

## Summary

Metals are necessary components of all living cells because they are constitutive of many essential proteins. Nickel, for example, is required for hydrogenase activity, which is essential for the energetic metabolism. However, metals become toxic when present in excess. Prokaryotes can overcome this toxicity by using several systems of resistance or adaptation. Import systems must be repressed whereas export pathways activated. This work consists in bringing out the principal strategies established by *Escherichia coli* for accommodating a stress caused by an excess of Ni ions. In order to understand the cellular response, the effect of nickel stress has been evaluated in *E. coli* by a transcriptomic approach coupled to functional validation.

Excess Ni induces the biosynthesis of the efflux system RcnRAB. In addition to the RcnA efflux pump, this system contains a periplasmic protein called RcnB. This protein modulates Ni and Co traffic. RcnB displayed no Ni or Co binding capacity but was shown to bind Cu ions. RcnB was characterized as a new family of cupro-protein. We showed that RcnB is not involved in the control of Cu homeostasis but that Cu binding is essential for its Ni and Co efflux function. Our results suggest connections between different systems of metals homeostasis. Indeed, RNA-Seq data analysis revealed that exposure to Ni induces strong variations of the expression of genes involved in Cu and Fe homeostasis. Our results correlated with an increase of intracellular Cu and Fe pools as assayed by plasma spectrometry. Both metals are involved in reactive oxygen species (ROS) production and generate serious cell damages, targeting DNA for example. We showed that Ni ions do not trigger DNA breakage and are not mutagenic. On the other hand, Ni stress has a strong effect on DNA folding. We propose that excess Ni causes DNA relaxation by the indirect induction of oxidative stress.

Furthermore, we identified the first transport system specific for Ni ions localized in the outer membrane. This system, composed of YddA and YddB, allows the transfer of Ni ions across the two membranes. The genes encoding these proteins are expressed in conditions evocative of a biofilm lifestyle. Moreover, this work showed that Ni stress promotes biofilm growth instead of a planktonic one. Indeed, in the presence of an excess of Ni ions, genes encoding flagella are down regulated whereas genes encoding adherence structures are up regulated.

To conclude, an excess of Ni ions affects specific metals import and efflux systems unbalancing intracellular Fe and Cu contents. These metals in turn generate ROS that are toxic for the bacterial cells. Ni stress induces large transcriptomic modifications causing major physiological changes important for the survival of the bacteria.

**Key words :** *Escherichia coli*, metals, homeostasis, resistance, transcriptome, motility, oxidative stress, DNA topology.



# Table des matières

<b>I</b>	<b>Introduction bibliographique</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Les métaux, médiateurs des interactions hôtes/micro-organismes : de leur nécessité à leur toxicité</b>	<b>3</b>
1.1	Pourquoi étudier la biologie des métaux ? . . . . .	3
1.2	Caractéristiques physico-chimiques des métaux . . . . .	4
1.3	Les métaux, éléments essentiels aux grandes fonctions cellulaires . . . . .	5
1.4	Les métaux s'avèrent être de véritables poisons . . . . .	8
1.4.1	La toxicité des métaux est médiée par la concentration et la nature des éléments	8
1.4.2	Les métaux entraînent la production d'un stress oxydant . . . . .	10
1.4.2.1	Dégradation des acides gras et déstabilisation des membranes . . . . .	10
1.4.2.2	Altération des protéines . . . . .	10
1.4.2.3	Altération de l'ADN . . . . .	10
1.5	Les métaux dans les interactions hôtes/ micro-organismes . . . . .	11
1.5.1	Interactions Homme/ micro-organismes . . . . .	11
1.5.1.1	Rôles bénéfiques des métaux dans les interactions Homme/micro-or- ganismes . . . . .	11
	Importance des métaux dans les mécanismes de défense . . . . .	11
	Importance des métaux pour les interactions symbiotiques . . . . .	14
1.5.1.2	Rôles néfastes des métaux dans les interactions Homme/ micro-or- ganismes . . . . .	14
	Les métaux peuvent altérer la flore microbienne . . . . .	14
	Les métaux permettent la colonisation de bactéries pathogènes . . . . .	15
1.5.2	Interactions plantes/ micro-organismes . . . . .	16
1.5.2.1	Rôles bénéfiques des métaux dans les interactions plantes/micro- organismes . . . . .	18
	Importance des métaux dans les mécanismes de pathogénie . . . . .	18
	Assimilation des métaux nécessaires aux plantes et aux micro-organismes . . . . .	18
	Utilisation des métaux par la plante pour ses mécanismes de défense .	19
	Utilisation des métaux par l'Homme afin de protéger la plante contre les micro-organismes . . . . .	19
1.5.2.2	Rôles néfastes des métaux dans les interactions plantes/micro-or- ganismes . . . . .	19
	Un excès de métaux entraîne une augmentation de la résistance des micro-organismes . . . . .	19

	L'utilisation d'un excès de métaux est toxique pour les plantes . . . . .	19
	Les micro-organismes peuvent protéger la plante contre la toxicité des métaux . . . . .	19
<b>2</b>	<b>Homéostasie des métaux de transition</b>	<b>21</b>
2.1	Homéostasie générale . . . . .	21
2.1.1	Les principaux mécanismes de défense contre les métaux . . . . .	22
2.1.1.1	Réduction de la perméabilité membranaire . . . . .	22
2.1.1.2	Séquestration intracellulaire et extracellulaire du composé . . . . .	23
2.1.1.3	Transport actif . . . . .	23
2.1.1.4	Altération enzymatique du métal vers une forme moins toxique . . .	25
2.1.1.5	Réduction de la sensibilité de la cible . . . . .	25
2.2	Homéostasie du cuivre . . . . .	25
2.3	Homéostasie du fer . . . . .	27
2.3.1	Assimilation du fer . . . . .	29
2.3.2	Stockage du fer . . . . .	32
2.3.3	Contrôle de la concentration en fer intracellulaire médié par le régulateur FUR	32
2.3.4	Efflux du fer . . . . .	33
2.4	Homéostasie du Ni . . . . .	33
2.4.1	Assimilation du nickel . . . . .	34
2.4.2	Protéines à nickel . . . . .	36
2.4.3	Efflux du nickel . . . . .	36
2.5	Homéostasies croisées . . . . .	38
2.5.1	Les cellules sont capables de discerner le bon métal... . . . .	38
2.5.2	...mais lors d'une perturbation de l'homéostasie d'un métal, les autres homéo- stasie sont impactées. . . . .	40
2.5.2.1	Un élément peut remplacer un autre élément . . . . .	40
2.5.2.2	Un élément peut empêcher l'entrée d'un autre élément dans la cellule, impactant la teneur en métaux . . . . .	41
2.5.2.3	Un excès d'un élément perturbe l'homéostasie d'un autre élément entraînant des variations dans la toxicité des métaux . . . . .	41
<b>II</b>	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>47</b>
3.1	Souches bactériennes et plasmides . . . . .	47
3.1.1	Composition des milieux de culture . . . . .	47
	Milieu riche LB . . . . .	47
	Milieu minimum M63 . . . . .	47
3.1.2	Conditions de culture et conservation des souches bactériennes . . . . .	47
3.1.3	Conditions de culture pour l'analyse transcriptomique . . . . .	49
3.1.4	Détermination du seuil de toxicité des métaux pour les différentes souches bactériennes . . . . .	49
	Croissance sur milieu solide - Méthode des gouttes . . . . .	49
	Croissance en milieu liquide . . . . .	49

	Croissance en milieu liquide avec le técan . . . . .	49
3.2	Méthodes génétiques et de biologie moléculaire . . . . .	50
3.2.1	Extraction d'ADN . . . . .	50
	Extraction d'ADN plasmidique . . . . .	50
	Extraction d'ADN chromosomique . . . . .	50
3.2.2	Extraction des ARNs par la méthode au phénol froid . . . . .	50
3.2.3	Rétrotranscription . . . . .	51
3.2.4	Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) . . . . .	51
3.2.5	PCR quantitative en temps réel (qPCR) . . . . .	51
3.2.6	Transformation par de l'ADN plasmidique . . . . .	52
	Technique du TSS . . . . .	52
	Technique de l'électroporation . . . . .	53
3.2.7	Transduction généralisée avec le phage P1 . . . . .	53
3.2.8	Mesure de la fréquence de mutation . . . . .	53
3.2.9	Evaluation du niveau d'enroulement de l'ADN par migration sur gel de chloroquine . . . . .	54
3.2.10	Analyse transcriptomique par RNAseq . . . . .	54
3.3	Méthodes biochimiques . . . . .	55
3.3.1	Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase . . . . .	55
3.3.2	Dosage d'activité hydrogénase . . . . .	55
3.3.3	Cinétique de transport du nickel . . . . .	56
	Evaluation de l'efflux du Nickel . . . . .	56
	Evaluation de l'entrée du Nickel . . . . .	56
3.3.4	Séparation des protéines par électrophorèse . . . . .	57
	Electrophorèse dénaturante des protéines sur gel SDS-PAGE . . . . .	57
	Electrophorèse en gel Tris tricine . . . . .	57
3.3.5	Purification de la protéine RcnB . . . . .	57
	Surproduction de RcnB . . . . .	57
	Purification de RcnB . . . . .	57
	Chromatographie d'interactions hydrophobes . . . . .	58
	Dialyse . . . . .	58
	Chromatographie d'échange d'anions . . . . .	58
3.3.6	Immunodétection (=Western Blot) . . . . .	58
3.3.7	Mesure du pH intracellulaire . . . . .	59
	Mesure du pH cytoplasmique . . . . .	59
	Mesure du pH périplasmique . . . . .	60
3.3.8	Double hybride membranaire . . . . .	60
	Principe . . . . .	60
	Souches, milieux et conditions de culture . . . . .	60
	Construction des souches . . . . .	61
	Mise en évidence des interactions . . . . .	61
3.4	Techniques biophysiques de caractérisation des biomolécules . . . . .	61
	Spectroscopie UV-Visible . . . . .	61
	Etude de l'interaction RcnB/Cu par extinction de fluorescence . . . . .	62



	Spectrométrie de masse . . . . .	62
	Dosage des métaux par ICP-MS . . . . .	63
3.5	Motilité cellulaire . . . . .	63
3.5.1	Test de motilité en boîte de "nage", test de swimming . . . . .	63
3.5.2	Marquage et observation des flagelles . . . . .	63
3.6	Outils bioinformatiques . . . . .	64
3.6.1	Alignements de séquences protéiques . . . . .	64
3.6.2	Prédiction de la topologie des protéines . . . . .	64
3.6.3	Recherche de domaines protéiques . . . . .	64
3.6.4	Prédiction des structures secondaires . . . . .	64
<b>III</b>	<b>Résultats</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>Etude du système RcnAB et caractérisation de RcnB</b>	<b>67</b>
4.1	Modulation de l'efflux des ions Ni <sup>2+</sup> et Co <sup>2+</sup> : hypothèse de l'interaction entre RcnA et RcnB . . . . .	67
4.2	RcnB fixe du cuivre . . . . .	70
4.3	Le cuivre agit sur la stabilité de RcnB . . . . .	71
4.4	La fixation du cuivre a un rôle physiologique . . . . .	72
4.5	RcnB n'est pas impliquée directement dans l'homéostasie du cuivre . . . . .	73
4.6	Le mutant RcnBM <sub>86</sub> A, déficient pour la fixation du cuivre, affecte l'homéostasie du Ni <sup>2+</sup> et du Co <sup>2+</sup> . . . . .	76
<b>5</b>	<b>Evaluation de la réponse cellulaire à un stress provoqué par un excès de nickel</b>	<b>81</b>
5.1	Mise au point des conditions de culture et d'extraction des ARNs pour la réalisation du RNA-Seq . . . . .	81
5.1.1	Choix de la souche, du milieu et de la phase de croissance . . . . .	81
5.1.2	Mise au point de la technique d'extraction des ARNs . . . . .	82
5.1.3	Détermination de la durée de l'exposition aux ions Ni <sup>2+</sup> . . . . .	83
5.2	Séquençage . . . . .	83
5.3	Traitement des données brutes du RNA-Seq . . . . .	84
5.4	Validation expérimentale des données du RNA-Seq . . . . .	86
5.5	Analyse globale des résultats . . . . .	86
5.5.1	Détermination du jeu de données . . . . .	86
5.5.2	Analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés . . . . .	89
<b>6</b>	<b>Impact des ions Ni<sup>2+</sup> sur le pH intracellulaire et sur les systèmes de résistance à l'acidité</b>	<b>93</b>
6.1	L'addition d'ions Ni <sup>2+</sup> dans le milieu diminue le pH intracellulaire . . . . .	96
6.1.1	Expériences préliminaires . . . . .	96
6.1.2	Mise au point de la technique . . . . .	99
6.1.2.1	Mesure du pH cytoplasmique . . . . .	99
6.1.2.2	Mesure du pH périplasmique . . . . .	100
6.1.3	Etude de l'adaptation des mutants pour les gènes impliqués dans le système de résistance à l'acidité glutamate-dépendante à un stress provoqué par le nickel . . . . .	104

<b>7</b>	<b>Impact des ions Ni<sup>2+</sup> sur la motilité cellulaire</b>	<b>107</b>
7.1	Les ions Ni <sup>2+</sup> induisent la répression des gènes de synthèse des flagelles . . . . .	108
7.2	Mesure de la nage bactérienne en présence d'un excès d'ions Ni <sup>2+</sup> . . . . .	111
7.3	Observation des flagelles . . . . .	113
<b>8</b>	<b>La toxicité du Ni est liée à une modification de l'homéostasie du Cu et du Fe induisant un stress oxydant et générant un relâchement de l'ADN</b>	<b>115</b>
8.1	L'excès d'ions Ni <sup>2+</sup> influence les homéostasies du Cu et du Fe . . . . .	115
8.1.1	Détermination des teneurs en métaux lors d'un stress métallique . . . . .	115
8.1.2	Le système d'efflux du cuivre CusCFBA participe-t-il à l'homéostasie du Ni? . . . . .	119
8.1.3	Les ions Ni miment-ils les ions Fe dans la régulation des gènes codant les systèmes d'import du fer? . . . . .	121
8.2	Aucun effet mutagène n'est observé lors d'un stress provoqué par les ions Ni <sup>2+</sup> . . . . .	122
8.3	L'excès d'ions Ni <sup>2+</sup> provoque un relâchement de l'ADN via l'induction indirecte d'un stress oxydant . . . . .	123
8.4	L'excès d'ions Ni <sup>2+</sup> induit une reprogrammation génétique . . . . .	129
<b>9</b>	<b>YddAB, nouveau système d'import des ions Ni<sup>2+</sup> chez <i>E. coli</i></b>	<b>133</b>
9.1	Caractérisation du système d'import des ions Ni <sup>2+</sup> YddAB . . . . .	135
9.1.1	Profils de résistance des mutants $\Delta yddA$ et $\Delta yddB$ . . . . .	135
9.1.2	Profils de transport des ions Ni <sup>2+</sup> chez les mutants $\Delta yddA$ et $\Delta yddB$ . . . . .	137
9.1.3	Analyse bioinformatique des séquences . . . . .	139
9.1.3.1	Les gènes <i>yddA</i> et <i>yddB</i> sont prédits pour être transcrits en opéron . . . . .	139
9.1.3.2	Les séquences protéiques de YddA et YddB sont compatibles pour le transport du nickel . . . . .	139
9.1.3.3	YddA, prédite pour être un transporteur de type ABC . . . . .	140
9.1.3.4	YddB est un récepteur de la membrane externe proche des TBDBT . . . . .	141
9.1.3.5	Analyse phylogénique de YddA et YddB par alignements de séquences . . . . .	143
9.1.4	YddA et YddB, nouveau système d'import du nickel chez <i>E. coli</i> ? . . . . .	147
<b>IV</b>	<b>Conclusion</b>	<b>151</b>
<b>10</b>	<b>Discussion et perspectives</b>	<b>153</b>
10.1	Maintien de l'homéostasie du nickel par les transporteurs. . . . .	153
10.1.1	Le système Rcn dans l'efflux du nickel . . . . .	153
10.1.2	Le système Ydd dans l'import du nickel . . . . .	155
10.1.2.1	Le passage des ions Ni <sup>2+</sup> à travers la membrane externe est assuré par le transporteur YddB . . . . .	155
10.1.2.2	Le passage des ions Ni <sup>2+</sup> à travers la membrane interne est assuré par le transporteur YddA . . . . .	157
10.1.2.3	Les ions Ni <sup>2+</sup> induisent l'expression des gènes <i>yddA</i> et <i>yddB</i> dans des conditions proches d'un mode de vie de type biofilm . . . . .	157
10.2	Mécanismes de toxicité engendrés par les ions Ni <sup>2+</sup> . . . . .	158
10.2.1	La toxicité du nickel est liée à des variations des teneurs en fer et en cuivre . . . . .	158
10.2.2	L'excès d'ions Ni <sup>2+</sup> provoque un relâchement de l'ADN . . . . .	159

---

10.2.3	Les ions $\text{Ni}^{2+}$ entraînent une acidification du milieu intracellulaire . . . . .	162
10.3	Physiologie de l'adaptation à un stress provoqué par les ions $\text{Ni}^{2+}$ . . . . .	162
10.3.1	Un excès d'ions $\text{Ni}^{2+}$ ralentit et arrête de la croissance . . . . .	162
10.3.2	Les ions $\text{Ni}^{2+}$ provoquent un changement de mode de vie semblable à la phase stationnaire . . . . .	163
10.3.3	Un excès d'ions $\text{Ni}^{2+}$ provoque le passage d'une mode de vie de type planctonique à un mode de vie de type biofilm . . . . .	163
<b>V</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>167</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>169</b>
<b>VI</b>	<b>Annexes</b>	<b>179</b>

# Liste des tableaux

1	Les métaux de transition essentiels à la chaîne de transport des électrons .	6
2	Fonctions biologiques de quelques métaux de transition . . . . .	8
3	Teneurs théoriques en métaux dans l'eau de mer, dans une bactérie et dans une plante . . . . .	9
4	Les différentes enzymes à nickel . . . . .	36
5	Souches bactériennes utilisées pour cette étude . . . . .	48
6	Plasmides utilisés pour cette étude . . . . .	48
7	Résumé des données obtenues après le séquençage par RNA-Seq . . . . .	84
8	Gènes impliqués dans la résistance à l'acidité chez <i>E. coli</i> . . . . .	95
9	Expression des gènes impliqués dans l'adaptation au stress acide en fonction de différents stress métalliques . . . . .	97
10	Fonctions des protéines impliquées dans la motilité et la formation de biofilm	109
11	Gènes impliqués dans la synthèse des flagelles dont l'expression est réprimée lors d'un excès d'ions Ni <sup>2+</sup> . . . . .	111
12	Expression des gènes codant le système d'efflux du cuivre CusCFBA . . . . .	119
13	Fonctions des protéines NAPs impliquées dans la topologie de l'ADN . . . . .	130
14	Liste des mutants testés pour leur résistance aux ions Ni <sup>2+</sup> . . . . .	134
15	Analyse de l'expression des gènes <i>yddA</i> et <i>yddB</i> par qRT-PCR en fonction de différents métaux . . . . .	136

# Liste des figures

1	Tableau périodique des éléments . . . . .	5
2	Structure de l'hémoglobine et d'un noyau hémique . . . . .	7
3	L'ion Co, co-facteur de la cobalamine . . . . .	7
4	Tableau périodique des métaux et métalloïdes toxiques . . . . .	9
5	Les métaux dans les interactions entre l'Homme et les micro-organismes .	12
6	Réponse du macrophage Cu dépendante lors d'une infection bactérienne et mise en place des systèmes de défense des bactéries pathogènes <i>Mycobacterium tuberculosis</i> et <i>Salmonella typhimurium</i> . . . . .	13
7	<i>Helicobacter pylori</i> , bactérie colonisatrice de l'estomac, synthétise une uréase à Ni . . . . .	15
8	Les métaux dans les interactions entre les plantes et les micro-organismes	17
9	Le régulateur FUR est essentiel pour la pathogénie et la virulence . . . . .	18
10	Perception d'un signal environnemental par la cellule . . . . .	21
11	Les principaux mécanismes de résistances aux métaux . . . . .	22
12	Les différentes familles de pompe d'efflux de métaux . . . . .	24
13	Les différents mécanismes de résistance au cuivre chez <i>E. coli</i> . . . . .	26
14	Les différents mécanismes maintenant l'homéostasie du fer chez <i>E. coli</i> . .	28
15	Structure de FecA, récepteur du complexe Fe <sup>3+</sup> -citrate, transporteur TonB-dépendant. . . . .	30
16	Modèle de fonctionnement du système de transport ABC, exemple du transport d'un complexe Fe <sup>3+</sup> -sidérophore par FepBDGC . . . . .	31
17	Les différents mécanismes maintenant l'homéostasie du nickel chez <i>E. coli</i>	34
18	Profils de résistance aux ions Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> et de transport de nickel radio-marqué chez les mutants $\Delta rcnA$ et $\Delta rcnB$ . . . . .	37
19	La localisation du repliement des protéines permet la sélection du "bon" métal . . . . .	38
20	Les différents systèmes de transport des métaux en fonction de la série d'Irving-Williams chez <i>E. coli</i> . . . . .	39
21	Le système RcnAB dans le contrôle de l'homéostasie des ions Ni <sup>2+</sup> et Co <sup>2+</sup> : Hypothèse de l'interaction entre RcnA et RcnB dans la modulation de l'efflux des ions. . . . .	68
22	Mise en évidence de l'interaction entre RcnA et RcnB par la technique du double hybride . . . . .	69
23	La présence d'ions métalliques n'impacte pas l'interaction entre RcnA et RcnB . . . . .	70
24	RcnB fixe du cuivre . . . . .	71

25	Le Cu stabilise RcnB . . . . .	72
26	Rôle physiologique de la fixation du Cu par RcnB . . . . .	73
27	RcnB n'est pas directement impliquée dans l'homéostasie du Cu . . . . .	75
28	La méthionine 86 est impliquée dans la fixation du cuivre . . . . .	76
29	Le mutant RcnB pour la méthionine 86 est déficient dans le contrôle de l'homéostasie du Ni et du Co. . . . .	77
30	La mutation de la méthionine 86 n'affecte pas la stabilité de RcnB. . . . .	78
31	RcnB n'est pas impliquée dans l'homéostasie croisée du nickel et du cuivre. . . . .	79
32	Profil de croissance de la souche W3110 lors d'un stress aux ions Ni <sup>2+</sup> . . . . .	82
33	Qualité des ARNs selon le mode d'extraction . . . . .	83
34	Expression du gène <i>rcnA</i> induit en présence d'ions Ni <sup>2+</sup> en fonction du temps . . . . .	84
35	Répartition des gènes en fonction de leur ratio d'expression . . . . .	85
36	Corrélation des ratios d'expression entre qPCR et RNA-Seq . . . . .	86
37	Répartition des gènes différenciellement exprimés en fonction de leur ratio d'expression. . . . .	87
38	Choix du jeu de données . . . . .	88
39	Positionnement des gènes différenciellement exprimés sur le chromosome en fonction de leur ratio d'expression . . . . .	89
40	Répartition des gènes différenciellement exprimés en fonction de leur rôle biologique. . . . .	90
41	Représentation schématique des différents systèmes de résistance à l'acide chez <i>E. coli</i> . . . . .	94
42	Les ions Ni <sup>2+</sup> induisent une activation de la transcription des gènes impliqués dans la résistance au stress acide . . . . .	96
43	Etat de protonation et de déprotonation du chromophore de la GFP . . . . .	98
44	Expériences préliminaires pour les mesures de pH intracellulaire. . . . .	99
45	Mesure du pH cytoplasmique et impact des ions Ni <sup>2+</sup> sur le pH intracellulaire . . . . .	101
46	Effet de la rifampicine sur les cellules exprimant la GFP exportée dans le périplasme. . . . .	102
47	Mesure du pH intracellulaire périplasmique et impact des ions Ni <sup>2+</sup> sur le pH . . . . .	103
48	Phénotype de résistance aux ions Ni <sup>2+</sup> des mutants pour les gènes impliqués dans la résistance au stress acide. . . . .	105
49	La mobilité chez les bactéries . . . . .	107
50	Le passage de la motilité cellulaire au mode de vie biofilm est médié par le facteur $\sigma$ S . . . . .	109
51	Régulation de la synthèse des flagelles . . . . .	110
52	Effet des ions Ni <sup>2+</sup> sur la motilité et la croissance cellulaire. . . . .	112
53	Observation de flagelles marqués à l'Alexa Fluor® 488 au microscope à épifluorescence . . . . .	113
54	Détermination par ICP-MS de l'accumulation des ions Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> et Cu <sup>2+</sup> dans des cellules lavées avec du tampon phosphate. . . . .	117

55	Détermination par ICP-MS de l'accumulation des ions $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ et $\text{Cu}^{2+}$ dans des cellules lavées avec du tampon phosphate supplémenté avec de l'EDTA . . . . .	118
56	Les mutants pour le système d'efflux du cuivre <i>CusCFBA</i> ne sont pas sensibles aux ions Ni contrairement aux ions Cu. . . . .	120
57	Les ions $\text{Ni}^{2+}$ ont un effet similaire au Fe sur la régulation des gènes qui sont sous le contrôle du régulateur FUR . . . . .	121
58	Test de l'effet mutagène des ions $\text{Ni}^{2+}$ . . . . .	123
59	Topologie de l'ADN bactérien . . . . .	124
60	Effet du traitement à la novobiocine sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d' <i>E. coli</i> W3110. . . . .	125
61	Effet d'un stress aux ions $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ et d'un traitement au tiron sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d' <i>E. coli</i> W3110 . . . . .	126
62	Effet d'un stress aux ions $\text{Ni}^{2+}$ , aux ions $\text{Fe}^{2+}$ et d'un traitement au tiron sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d' <i>E. coli</i> W3110 . . . . .	127
63	Effet d'un stress aux ions $\text{Cu}^{2+}$ et $\text{Co}^{2+}$ sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d' <i>E. coli</i> W3110. . . . .	128
64	Influence des NAPs sur la structure du chromosome bactérien . . . . .	129
65	Influence des mutations <i>yddA</i> et <i>yddB</i> sur la résistance des bactéries aux ions $\text{Ni}^{2+}$ . . . . .	135
66	Influence de la mutation de <i>yddB</i> sur l'accumulation des ions $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ et $\text{Fe}^{2+}$ . . . . .	136
67	Influence des mutations de <i>yddB</i> et de <i>yddA</i> sur l'accumulation des ions $\text{Ni}^{2+}$	137
68	Représentation schématique du locus <i>ydd</i> chez <i>E. coli</i> . . . . .	139
69	Séquences protéiques de YddA et de YddB d' <i>E. coli</i> . . . . .	140
70	Prédiction des domaines fonctionnels de YddA . . . . .	141
71	Prédiction des structures secondaires de la protéine YddA . . . . .	142
72	Prédiction des domaines fonctionnels de YddB . . . . .	142
73	Prédiction des structures secondaires de la protéine YddB . . . . .	143
74	Alignement des homologues de YddA . . . . .	144
75	Alignement des homologues de YddB . . . . .	147
76	Le système YddAB, hypothèse d'un système d'import actif des ions $\text{Ni}^{2+}$ chez <i>E. coli</i> . . . . .	148
77	Comparaison structurale entre un transporteur TonB dépendant et la protéine YddB . . . . .	155
78	Le stress Ni impacte l'homéostasie du Fe et du Cu entraînant une reprogrammation génétique massive . . . . .	161
79	Le stress Ni favorise la vie en mode biofilm au détriment d'un mode de vie planctonique . . . . .	164

# Première partie

## Introduction bibliographique





# Chapitre 1

## Les métaux, médiateurs des interactions hôtes/micro-organismes : de leur nécessité à leur toxicité

### 1.1 Pourquoi étudier la biologie des métaux ?

Les métaux ont joué un rôle essentiel au développement de la vie sur Terre. La Terre apparue il y a 4,5 milliards d'années, présentait des quantités importantes de gaz atmosphériques tels que le méthane ( $\text{CH}_4$ ), le dihydrogène ( $\text{H}_2$ ) ou le sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Les organismes méthanogènes dominants à cette époque utilisent préférentiellement le nickel comme cofacteur d'enzymes essentielles. Il y a 2,4 milliards d'années, l'activité volcanique, provoquant la diffusion de nickel dans l'environnement, est en déclin en raison du refroidissement du manteau terrestre (Konhauser et al., 2009). Ces organismes méthanogènes cèdent alors la place aux cyanobactéries qui en se développant ont provoqué l'augmentation de l'oxygène libre par la photosynthèse. L'enrichissement en dioxygène et l'appauvrissement en méthane de l'atmosphère terrestre a été un événement majeur pour le développement de la vie sur Terre.

Les cyanobactéries apparues il y a 2 milliards d'années sont capables de solubiliser les ions métalliques (Kasting and Siefert, 2002). De telles transformations chimiques ont été possibles grâce à l'apport énergétique de la lumière. La photosynthèse a donc permis le relâchement progressif de l' $\text{O}_2$  libre dans l'atmosphère. L'existence de gisements de fer dans des roches très anciennes témoigne de cette activité photosynthétique. Le fer existait à l'état dissous  $\text{Fe}^{2+}$  dans l'eau (Crichton and Pierre, 2001). Son oxydation  $\text{Fe}^{3+}$  par les cyanobactéries a permis son accumulation au fond de l'océan.

Les métaux vont donc conserver un rôle ubiquitaire et rester des éléments essentiels car optimaux pour de multiples systèmes biologiques.

Dans une vision anthropocentrée, l'utilisation des métaux par les Hommes va leur permettre une évolution majeure. D'ailleurs, le terme métal provient du grec *metallon* qui signifie "mine, tranchée" défini ainsi par leur mode d'extraction. En effet, les métaux sont principalement

extraits en tant que minerais. Le tout premier métal à avoir été extrait a été l'or, découvert 6000 ans avant J.-C. Le cuivre et le nickel ont été découverts respectivement 4000 et 3500 ans avant J.-C. Le fer, lui, n'a été découvert que 1500 ans avant J.-C. Ces roches colorées, repérées par leur brillance, ont été utilisées d'abord à des fins décoratives, puis pour la confection d'armes, d'ustensiles et d'outils.

Au VIII<sup>e</sup> siècle, Jabir Ibn Hayyan, alchimiste musulman aurait été le premier à préparer le trioxyde d'arsenic. Cette poudre blanche inodore provoquait les symptômes d'une intoxication alimentaire rendant le poison indécélable. A ce titre on lui confèrera le nom de "poison des rois et roi des poisons".

Ces éléments seront utilisés comme traitements curatifs. Il est relaté dès le Moyen-âge, que les métaux comme le plomb ou le mercure étaient utilisés sous forme d'onguents pour le traitement de certaines maladies de peau (Dillemann, 1969). Plus tard, vers le XVII<sup>e</sup> siècle, l'utilisation du mercure était privilégiée lors du traitement d'infections parasitaires ou de maladies chroniques. Il fallut quelques centaines d'années pour que les effets neurotoxiques et immunodépresseurs du mercure soient bien documentés.

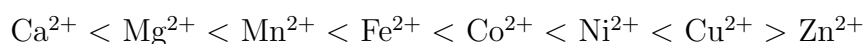
A l'heure actuelle, les métaux sont utilisés par exemple pour leurs propriétés de conduction électrique comme l'aluminium ou de conduction thermique comme le cuivre. Le sulfate de cuivre est également utilisé pour sa toxicité comme antimicrobien en agriculture .

Cet antagonisme est retrouvé au sein de monde microbien puisque les micro-organismes ont besoin des métaux pour vivre, pour coloniser ou pour exercer leur pouvoir pathogène. Néanmoins, les métaux sont également toxiques pour les micro-organismes. L'étude de l'interaction des métaux avec les organismes vivants pour leurs aspects bénéfiques comme leurs aspects toxiques reste importante notamment dans la compréhension du fonctionnement des micro-organismes et des interactions possibles avec des hôtes.

## 1.2 Caractéristiques physico-chimiques des métaux

Le tableau périodique des éléments regroupe trois catégories d'éléments, les métaux, les métalloïdes et les non-métaux [Figure1]. Les métaux sont des éléments chimiques ayant des propriétés thermiques, électriques, magnétiques et de conductivité. Ces éléments ont tendance à former des cations par la perte d'un électron. Dans le cadre rouge, sont figurés les métaux de transition. Ces derniers appartiennent tous au bloc *d* du tableau périodique, situé entre les colonnes 2 et 13. Cependant, le bloc *d* ne contient pas que des métaux de transition. Les éléments de transition possèdent une sous-couche *d* incomplète, ce qui leur procure des états d'oxydation très variés.

D'un point de vue bio-inorganique, les métaux de transition peuvent être classés en fonction de leur capacité d'interaction avec les ligands suivant la série d'Irving-Williams (Irving and Williams, 1948). Il s'agit de l'ordre naturel de la stabilité des cations divalents.



Les cations divalents sont classés du moins au plus affins.

Bloc s		Bloc p																
1	2	Bloc d										13	14	15	16	17	18	
H	He											B	C	N	O	F	Ne	
Li	Be											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
Na	Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Uub							
Bloc f																		
		Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu			
		Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr			

Figure 1 – Tableau périodique des éléments

Les métaux sont représentés en jaune, les métalloïdes en orange et les non-métaux en bleu. Les métaux de transition sont figurés dans le cadre rouge.

Cette série est basée sur l’affinité des ions divalents pour les électrons. Cette notion sera approfondie dans le prochain chapitre où sera abordée alors la question suivante : comment les micro-organismes sont-ils capables de reconnaître les différents métaux et de les utiliser pour des fonctions précises ?

En effet, les métaux possèdent des fonctions différentes dans les cellules vivantes et cela est en partie due à leur spécificité d’interaction et à leurs propriétés d’oxydo-réduction.

### 1.3 Les métaux, éléments essentiels aux grandes fonctions cellulaires

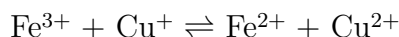
#### ”Les métaux, des éléments à tout fer”

Sans mauvais jeu de mots, les métaux sont capables d’accomplir de nombreuses fonctions biologiques. Le magnésium, le potassium, le sodium et le calcium sont responsables de l’équilibre osmotique de la cellule (Nies, 2007).

D’autres métaux ont un rôle structural en stabilisant les protéines. Chez les bactéries, plus d’un tiers des protéines requièrent la présence de métaux (Waldron and Robinson, 2009). Ces protéines sont appelées métalloprotéines. L’ion Zn est le métal de transition le plus abondant chez les bactéries avec une concentration de  $10^{-4}$  M chez *E. coli* comparée à une concentration de  $10^{-7}$  M dans un milieu riche de type Luria Broth (Outten and O’Halloran, 2001). Le Zn est capable de se lier à plus de 100 protéines différentes ce qui suggère que les bactéries possèdent une forte capacité à chélater le Zn (Ma et al., 2009). La sous-unité  $\beta$  de l’ARN polymérase et plusieurs protéines ribosomales nécessitent la présence d’ions Zn au sein de leurs structures.

Dans la catégorie des métaux, les métaux de transition ont un rôle catalytique essentiel. Les métaux sont impliqués dans les réactions d’oxydo-réduction (ou systèmes redox) qui

consistent en un transfert d'électrons d'un donneur d'électrons (agent réducteur) vers un accepteur d'électrons (agent oxydant). Par exemple dans la réaction suivante :



les réactions d'oxydoréduction peuvent être décomposées en deux demi-réactions ou couples redox :



Ces demi-réactions ont lieu au cours du métabolisme oxydatif lors du transfert vital d'électrons par exemple au sein de la cytochrome c oxydase au niveau de la chaîne respiratoire. Ce transport d'électrons est indispensable aux activités bioénergétiques comme la respiration. Il est couplé au transfert des protons à travers la membrane, ce qui crée un gradient électrochimique de protons générant la synthèse d'ATP. La chaîne de transport des électrons des mitochondries ne compte pas moins de 31 clusters Fe-S ainsi que deux ions  $\text{Cu}^{2+}$  (Wilson et al., 1974) [Tableau 1] .

Tableau 1 – Les métaux de transition essentiels à la chaîne de transport des électrons

Complexes	Enzymes	Métaux de transition
I	NADH-coenzyme Q oxydoréductase	22 à 24 Fe-S dans 5 à 8 centres
II	succinate-coenzymeQ oxydoréductase	7 à 8 Fe-S dans 3 centres
III	coenzyme Q- cytochrome C oxydoréductase	2 centres Fe-S
IV	cytochrome c-oxydase	2 ions $\text{Cu}^{2+}$

Exemple de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Wilson et al., 1974)

La photosynthèse, autre mécanisme énergétique, permet aux plantes, aux algues et à certaines bactéries d'utiliser la lumière pour synthétiser de la matière organique. Tous les organismes ne réalisent pas la photosynthèse de la même façon mais les centres réactionnels comme le PSII<sup>1</sup>, nécessitent la présence des métaux. En effet, le PSII contient deux hèmes, un cluster  $\text{Mn}_3\text{CaO}_4$  et un cation  $\text{Fe}^{2+}$ , non hémique (Ferreira et al., 2004).

Chez les vertébrés, l'un des exemples le plus souvent donné est celui du transport du dioxygène. Ce transport est réalisé par des protéines globulaires appelées hémoglobines [Figure 2A.]. Elle possède une structure tétramérique  $\alpha_2\beta_2$ . Ces quatre sous-unités sont reliées entre elles et chacune lie un seul groupe hème par des liaisons non covalentes. L'hème a une structure hétérocyclique et le site de liaison de l'oxygène est un complexe fer-porphyrine, qui subit un changement de structure à la suite de la fixation de l' $\text{O}_2$  (Voet and Voet, 1998) [Figure 2B.].

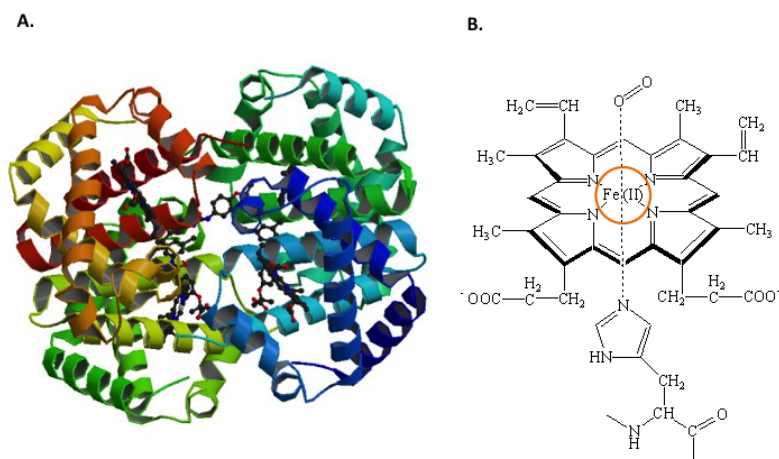


Figure 2 – Structure de l'hémoglobine et d'un noyau hémique

**A.** Structure de l'hémoglobine d'*Homo sapiens* provenant de la base de données PDB,2D5Z **B.** Complexe Fe (II) -hème. L'ion Fe est entouré en orange.

Dans les fonctions catalytiques non redox, les métaux sont aussi d'importants cofacteurs catalytiques d'enzymes. L'ion  $\text{Co}^{2+}$  par exemple est retrouvé au sein de la cobalamine (vitamine B12) [Figure 3]. Chez *E. coli*, aucun système d'import spécifique des ions  $\text{Co}^{2+}$  n'a été décrit. En revanche, cette bactérie a la capacité de transporter la vitamine B12 et par conséquent d'importer des ions  $\text{Co}^{2+}$  sous forme complexée.

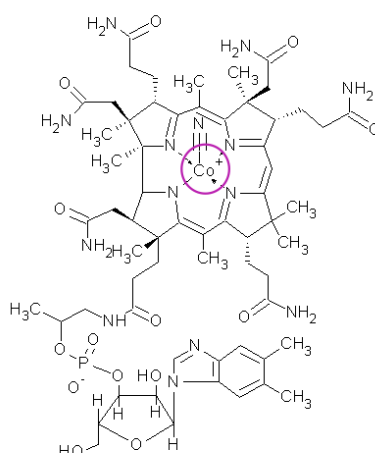


Figure 3 – L'ion Co, co-facteur de la cobalamine

Structure de la vitamine B12 (cobalamine) et de son cofacteur, l'ion Co, entouré en rose.

Enfin, le nickel a également un rôle de cofacteur catalytique d'enzymes dont la fonction est parfois essentielle chez les eubactéries et archées. Des uréases contenant du nickel sont retrouvées chez les champignons et les plantes (Singh et al., 2013) (Alagna et al., 1984). Aucune fonction n'a jusqu'à aujourd'hui été identifiée chez les vertébrés.

Tableau 2 – Fonctions biologiques de quelques métaux de transition

Eléments	Fonctions
Co	Oxydase ; transfert de groupement alkyle
Cr	Oxydase ; transfert d'oxygène ; transfert d'électrons
Cu	Oxydase ; transfert d'oxygène ; transfert d'électrons
Fe	Oxydase ; transport et stockage de l'oxygène ; transfert d'électrons
Mn	Oxydase ; photosynthèse ; structure
Mo	Oxydase ; fixation d'azote ; transfert d'oxygène
Ni	Hydrolase ; hydrogénase
Zn	Hydrolase ; structure

Tableau de (Lippard and Berg, 1994)

Le tableau 2 présente les différentes fonctions de quelques métaux de transition.

Les métaux ont un rôle essentiel dans les grandes fonctions cellulaires mais présentent parfois un réel danger pour les cellules car ils peuvent devenir extrêmement toxiques.

## 1.4 Les métaux s'avèrent être de véritables poisons

### 1.4.1 La toxicité des métaux est médiée par la concentration et la nature des éléments

Chaque organisme, chaque environnement possèdent des teneurs en métaux différentes [Tableau 3]. Lorsque les métaux sont en excès dans un organisme, ils peuvent former des liaisons aspécifiques sur les chaînes latérales des protéines ou les acides nucléiques. Les liaisons aspécifiques des métaux sur les protéines peuvent empêcher la formation de ponts disulfure et altérer le repliement correct des protéines (Hobman et al., 2007). Cependant, les métaux en excès ont une affinité particulière pour les acides aminés soufrés comme les cystéines, les histidines, les méthionines et les acides aminés acides comme l'acide glutamique et l'acide aspartique. Par exemple, les métaux comme l'Ag, le Cd ou le Hg ont une plus grande affinité pour les composés soufrés et vont bloquer les groupes fonctionnels de certaines molécules (Waldron and Robinson, 2009). Les métaux en excès vont également entraîner le déplacement de d'autres métaux au niveau des sites actifs d'enzymes. L'équipe de Marc Fontecave a montré que les ions  $\text{Co}^{2+}$  à fortes concentrations ont la faculté de rentrer en compétition avec les ions  $\text{Fe}^{2+}$ . Les ions  $\text{Co}^{2+}$  altèrent donc les voies métaboliques dépendantes des enzymes possédant des clusters fer-soufre (Ranquet et al., 2007). La production d'un stress oxydant est également le résultat d'un excès de métaux dans la cellule. Cet aspect sera plus largement développé dans la section 1.4.2.

Au contraire une carence en métaux peut également être létale pour les organismes. Comme expliqué dans le paragraphe précédent, si le métal carencé est essentiel aux grandes fonctions cellulaires, l'organisme subira de graves séquelles.

Un autre facteur important à prendre en considération lorsque la toxicité des métaux est abordée concerne la fonctionnalité du métal. En effet, certains métaux sont plus essentiels que d'autres dans la cellule et donc plus ou moins toxiques. La figure 4 présente les différents

Tableau 3 – Teneurs théoriques en métaux dans l'eau de mer, dans une bactérie et dans une plante

Elément	Concentration dans eau de mer (1)	Concentration chez <i>E. coli</i> (2)	Concentration dans plante (en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de Poids Sec) (3) (*)
Sodium	457 mM	236 mM	n.d
Magnésium	55,5 mM	44 mM	n.d
Potassium	9,72 mM	210 mM	n.d
Calcium	9,98 mM	0,3 mM	n.d
Manganèse	36,4 nM	1,7 mM	10-100
Fer	179 nM	180 $\mu\text{M}$	50-150
Cobalt	4,78 nM	0,5 $\mu\text{M}$	1-20
Nickel	92,0 nM	5 $\mu\text{M}$	15-22
Cuivre	47,2 nM	18 $\mu\text{M}$	n.d
Zinc	153 nM	270 $\mu\text{M}$	15-50

(1) (Weast, 1984) (2) (Outten and O'Halloran, 2001) (3) (Hänsch and Mendel, 2009) (\*) Les concentrations des métaux dans les plantes peuvent varier en fonction de l'espèce, du génotype, de l'organe, du tissu ou des conditions de croissance. En rouge sont indiqués les métaux de transition. n.d= non déterminé

éléments en fonction de leur degré de toxicité. Le sodium, le magnésium, le potassium ou encore le calcium sont des éléments majeurs et sont en quantité très importante dans la cellule [Tableau 3]. Ils sont absolument nécessaires car ils participent au métabolisme de base. Les éléments traces comme le manganèse, le fer, le cobalt, le nickel, le cuivre et le zinc sont en quantité moindre [Tableau 3] mais ce sont des éléments impliqués dans de nombreux processus cellulaires et pouvant être toxiques à forte concentration. Enfin, les éléments toxiques comme le cadmium, le chrome, l'argent, l'or, le mercure ou encore le plomb sont présents en quantité de l'ordre du picomolaire et n'ont pour la plupart aucun rôle biologique dans la cellule.

<b>1</b>										<b>18</b>									
H																		He	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne		
Na	Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Al	Si	P	S	Cl	Ar		
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe		
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn		
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Uub								

Figure 4 – Tableau périodique des métaux et métalloïdes toxiques

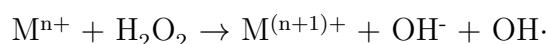
Les métaux représentés en orange n'ont pas d'effet toxique. Les éléments figurés en bleu sont toxiques à fortes concentrations et les éléments colorés en jaunes sont toxiques et n'ont aucun rôle biologique dans la plupart des organismes. Tableau adapté d'après (Summers, 2009)



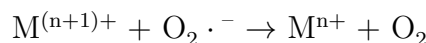
## 1.4.2 Les métaux entraînent la production d'un stress oxydant

Le stress oxydant est induit par les espèces réactives oxygénées (Reactive oxygen species, ROS). Ces éléments comme l'ion superoxyde ( $O_2 \cdot^-$ ) ou le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont produits de manière physiologique dans tous les organismes vivants utilisant l'oxygène et ils sont continuellement générés au cours du processus de respiration cellulaire. La production du radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ) est dépendant des métaux comme le Fe et le Cu. Les réactions associées sont présentées ci-dessous.

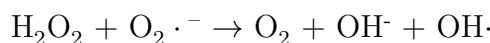
Equation 1 : Réaction de Fenton



Equation 2 :



Equation 3 : Réaction d'Haber-Weiss



La présence simultanée des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et des métaux, conduit à la formation massive du radical hydroxyle. Ces radicaux libres causent de nombreux dégâts dans la cellule.

### 1.4.2.1 Dégradation des acides gras et déstabilisation des membranes

Lors d'un stress oxydatif les lipides sont des cibles majeures (Cabiscol et al., 2000). Les radicaux libres peuvent attaquer les acides gras polyinsaturés directement au niveau des membranes et initier la peroxydation des lipides. La peroxydation lipidique entraîne une diminution de la fluidité de la membrane, ce qui altère les propriétés membranaires et perturbe les protéines de membrane. Cet effet est amplifié car d'autres radicaux sont formés et de nouveaux acides gras polyinsaturés sont dégradés.

### 1.4.2.2 Altération des protéines

Le radical hydroxyle formé lors d'un stress oxydant est capable d'oxyder certains acides aminés comme l'arginine, la cystéine, l'histidine, la lysine et la proline. Cette oxydation provoque la fragmentation des protéines et la formation de liaisons aspécifiques inter ou intramoléculaires (Stadtman, 1993).

### 1.4.2.3 Altération de l'ADN

Les mécanismes d'oxydation de l'ADN ne sont pas complètement élucidés. Toutefois, il a été montré que le stress oxydatif entraîne des cassures simples et doubles brins de l'ADN. L'oxydation des bases entraîne leurs modifications comme des dépurinations et des dépyrimidations.

Les liaisons ADN-protéines sont également altérées. Enfin, les sucres phosphates peuvent être modifiés (Valko et al., 2005). Il a été clairement établi que les dégâts oxydatifs de l'ADN *in vitro* et *in vivo* sont fortement augmentés en présence d'ions  $\text{Fe}^{2+}$  et de  $\text{Cu}^{2+}$ . Et au contraire, en l'absence de métaux de transition, l'ADN est moins réactif aux oxydants tels que l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . De nombreuses expériences suggèrent que le radical hydroxyle est le plus agressif pour l'oxydation de l'ADN. Les radicaux superoxydes n'ont pas ou très peu d'effet sur l'oxydation de l'ADN en l'absence de métaux. Ceci suggère que les radicaux superoxydes ont un rôle dans la réaction chimique d'Haber-Weiss pour produire le radical hydroxyle véritable responsable de l'oxydation de l'ADN (Valko et al., 2005).

La description des fonctions essentielles et du paradoxe de l'aspect toxique que peuvent avoir les métaux dans les cellules permet de mieux comprendre les relations, métaux dépendantes, que peuvent entretenir les micro-organismes avec leurs hôtes.

## 1.5 Les métaux dans les interactions hôtes/ micro-organismes

### 1.5.1 Interactions Homme/ micro-organismes

Les interactions entre les micro-organismes et l'Homme médiées par les métaux peuvent être réparties en deux catégories. D'un point de vue anthropocentrique, les métaux ont un rôle bénéfique dans les mécanismes de défense contre les pathogènes ou dans les interactions symbiotiques. Mais les métaux peuvent aussi avoir un effet néfaste sur ces interactions en altérant la composition de la flore intestinale et en permettant la pathogénie de certains micro-organismes.

#### 1.5.1.1 Rôles bénéfiques des métaux dans les interactions Homme/micro-organismes

##### Importance des métaux dans les mécanismes de défense

Dans les interactions micro-organismes/hôtes chez l'Homme, les cellules de macrophages peuvent utiliser les métaux, et notamment les ions Cu, pour lutter contre les infections bactériennes [Figure 5 A.] (Hodgkinson and Petris, 2012). *Mycobacterium tuberculosis* est un pathogène des voies respiratoires chez les mammifères et infecte les poumons causant la tuberculose. La virulence de cette bactérie est déterminée par sa capacité à survivre et à se répliquer dans les macrophages alvéolaires. *Salmonella typhimurium*, quant à elle, est une bactérie à Gram négatif qui est responsable de millions de cas de maladie gastro-intestinale par an dans le monde. De la même façon que *M. tuberculosis*, la virulence de *S. typhimurium* est basée sur sa capacité à survivre et à se répliquer dans le phagosome des macrophages.

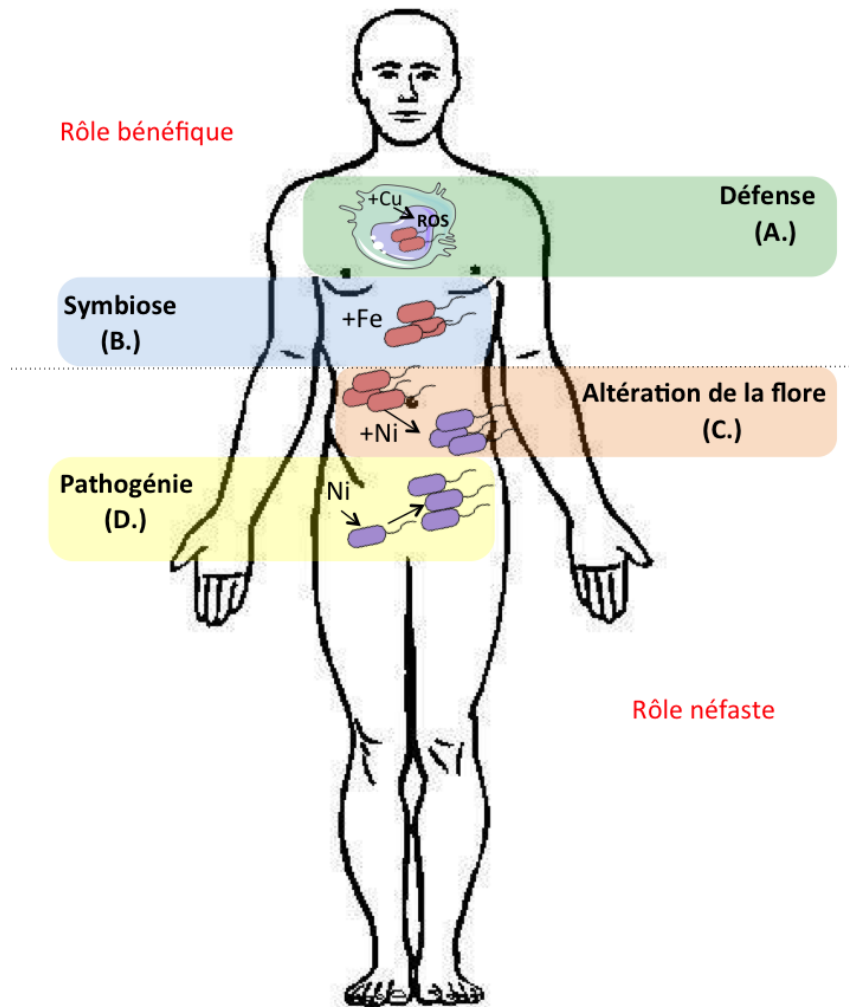


Figure 5 – Les métaux dans les interactions entre l’Homme et les micro-organismes

Du point de vue anthropocentrique, les métaux peuvent avoir un rôle bénéfique. **A.** Pour lutter contre les infections microbiennes, l’hôte peut utiliser les métaux comme le Cu pour produire des ROS. **B.** Les métaux peuvent influencer les interactions d’ordre symbiotique. Le fer notamment permet le développement des bactéries symbiotes de l’intestin. Mais les métaux peuvent avoir un effet néfaste, **C.** en altérant la composition de la flore bactérienne. **D.** Enfin, les métaux peuvent être d’importants facteurs de pathogénie, essentiels pour la survie de micro-organismes pathogènes et de leurs facteurs de virulence. Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont des cofacteurs des protéines essentielles à la virulence de certains micro-organismes.

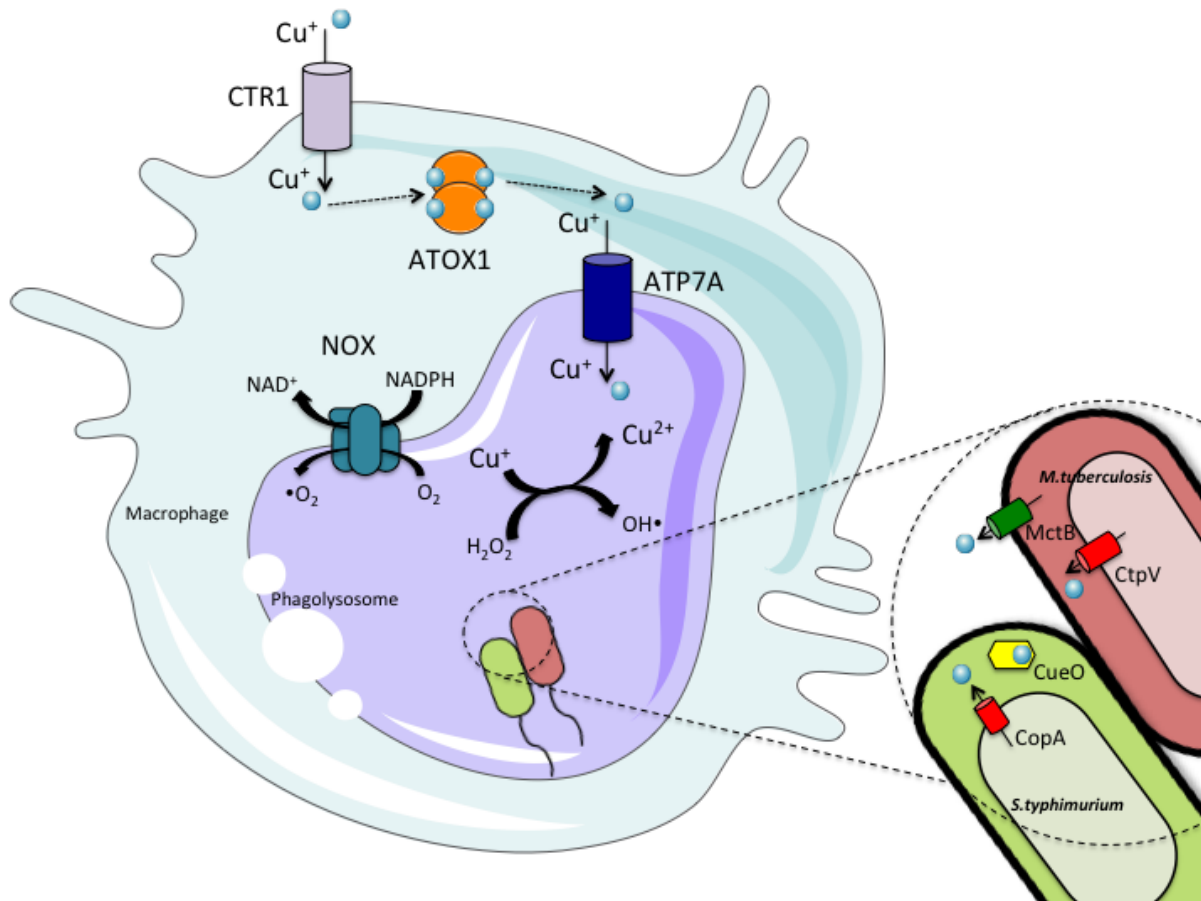


Figure 6 – Réponse du macrophage Cu dépendante lors d’une infection bactérienne et mise en place des systèmes de défense des bactéries pathogènes *Mycobacterium tuberculosis* et *Salmonella typhimurium*

Lors d’une infection bactérienne par *M. tuberculosis* ou *S. typhimurium*, les lipopolysaccharides bactériens stimulent l’absorption du Cu chez le macrophage en induisant l’expression de la pompe CTR1 pour l’entrée des ions  $\text{Cu}^{2+}$ . Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  sont pris en charge par la protéine chaperon ATOX1 puis les ions sont apportés au phagolysosome et importés par l’ATPase ATP7A. De plus, lors de l’infection, la NADPH oxydase (NOX) est produite, permettant la production d’ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le peroxyde d’hydrogène et les ions Cu provoquent la réaction de Fenton entraînant la production de ROS. Les bactéries, en réponse à ce stress, synthétisent des systèmes de défense (En rouge sont représentés les systèmes d’efflux de membrane interne, en vert les systèmes d’efflux de membrane externe et en jaune les enzymes de détoxication). Figure adaptée d’après (Hodgkinson and Petris, 2012)

La réponse innée d’une infection par ses bactéries fait intervenir les macrophages permettant la phagocytose de ces microorganismes. Dans cette cellule, la formation d’un phagolysosome, suite à la phagocytose bactérienne va être le siège d’une explosion respiratoire. Les agents inflammatoires (par exemple, les lipopolysaccharides bactériens) stimulent l’absorption du Cu dans le macrophage en induisant l’expression du système d’import du Cu de la membrane plasmique, CTR1 [Figure 6]. Le Cu est ensuite pris en charge par les protéines chaperons ATOX1 puis les ions  $\text{Cu}^{2+}$  sont délivrés à la pompe d’import ATP7A, au niveau du compartiment du phagolysosome. La NADPH oxydase (NOX) permet la génération d’ions superoxydes. La réaction de Fenton est réalisée en présence du peroxyde d’hydrogène et d’ions  $\text{Cu}^{2+}$  (cf section 1.4.2). Cette réaction induit la production de ROS qui constituent l’activité bactéricide dans le phagolysosome. Pour échapper à cette explosion respiratoire, *M. tuberculosis* et *S. typhimurium* induisent la production de protéines impliquées dans l’homéostasie du Cu. Par exemple, *M.*

*tuberculosis* induit des systèmes d'efflux de cuivre au niveau de la membrane interne et de la membrane externe respectivement appelés CItV et MctB. *S. typhimurium* induit l'expression d'une pompe d'efflux CopA et d'une enzyme de détoxification du périplasma appelée CueO (Hodgkinson and Petris, 2012).

### Importance des métaux pour les interactions symbiotiques

Des milliards de micro-organismes résident dans le corps humain. Dans la grande majorité, ces micro-organismes sont inoffensifs et ont même un rôle bénéfique. Le microbiote intestinal a été décrit comme un organe complexe, qui joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du tractus intestinal (Sekirov et al., 2010). Une étude a envisagé de déterminer l'impact sur le microbiote intestinal de rats inoculés avec une flore fécale humaine lors d'une supplémentation en fer de leur alimentation (Dostal et al., 2014). Les rats ont eu soit un régime alimentaire normal, soit appauvri ou supplémenté en fer. Puis les selles ont été analysées pour la composition du microbiote intestinal par PCR quantitative et par pyroséquençage. Une analyse des métabolites bactériens par HPLC<sup>2</sup> a également été réalisée. Les résultats montrent que la supplémentation en fer augmente considérablement l'abondance de groupes bactériens dominants tels que les Bacteroides, flore bactérienne intestinale essentielle, comparée à celle d'un régime déficient en Fe. De plus, la supplémentation en fer du régime alimentaire augmente par 6 la concentration de butyrate d'origine microbienne dans les intestins par rapport au régime alimentaire appauvri en fer. Une précédente étude avait montré que le butyrate microbien était une source d'énergie pour les colonocytes, cellules du colon de mammifères (Donohoe et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la supplémentation en fer améliore la concentration en métabolites bénéfiques du microbiote intestinal et peut ainsi contribuer à la santé de l'intestin. Cela montre bien l'effet bénéfique que peuvent avoir les métaux dans l'interaction des micro-organismes symbiotiques avec les cellules intestinales [Figure 5 B.].

#### 1.5.1.2 Rôles néfastes des métaux dans les interactions Homme/ micro-organismes

##### Les métaux peuvent altérer la flore microbienne

Il existe des effets toxiques des métaux sur les interactions entre l'hôte et les micro-organismes [Figure 5 C.] (Breton et al., 2013). Une étude a évalué l'impact d'une ingestion de plomb et de cadmium sur la composition du microbiote intestinal murin. Les résultats du pyroséquençage montrent qu'il y a une diminution du nombre de Lachnospiraceae et une augmentation de Lactobacillaceae et Erysipelotrichaceae par rapport aux souris n'ayant pas ingéré des métaux. Les métaux de transition ont donc un impact direct sur la composition du microbiote intestinal et influencent l'homéostasie globale de l'intestin. Ces travaux permettent de mieux comprendre les liens entre les métaux de transition et leur impact sur les relations entre les micro-organismes et leur hôte.

---

2. High-Performance Liquid Chromatography

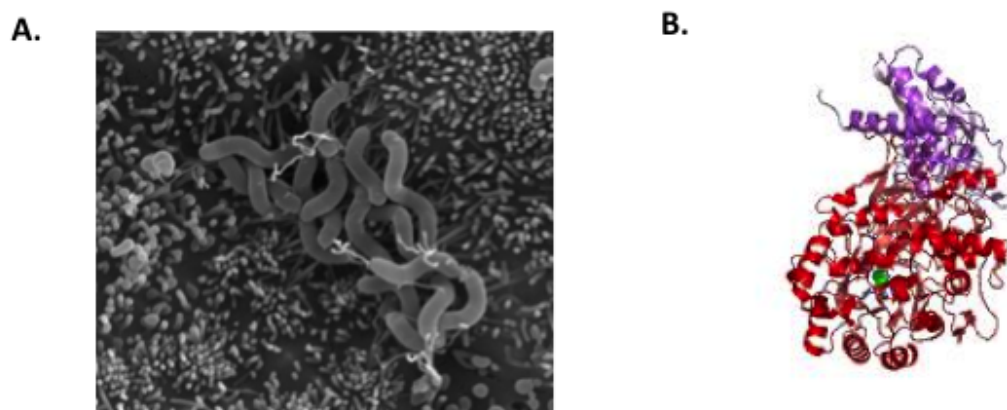
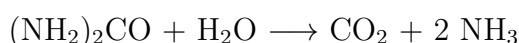


Figure 7 – *Helicobacter pylori*, bactérie colonisatrice de l'estomac, synthétise une uréase à Ni

**A.** Photo d' *H. pylori* au microscope électronique à balayage colonisant l'estomac. (Shuman Tan et Lydia-Marie Joubert). **B.** Structure de l'uréase d'*H. pylori* (PDB, 1E9Z) Sont représentées en violet la chaîne  $\alpha$ , en rouge la chaîne  $\beta$  et en vert les deux ions Ni.

Les métaux permettent la colonisation de bactéries pathogènes

Dans certains cas, des bactéries pathogènes peuvent coloniser et nuire à l'hôte [Figure 5 D.]. C'est le cas de la bactérie *Helicobacter pylori* qui est capable de coloniser l'estomac et qui est responsable de développement d'ulcères et de cancers [Figure 7A.] (de Reuse et al., 2013). Les ulcères résultent de l'érosion du mucus qui forme une couche protectrice pour les cellules épithéliales. *H. pylori*, bactérie micro-aérophile à Gram négatif, synthétise une adhésine qui est impliquée dans l'attachement aux cellules épithéliales gastriques. Elle synthétise également une uréase. Cette enzyme catalyse la réaction d'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac, ce qui augmente le pH de son environnement.



L'uréase est constituée de deux sous-unités, une chaîne  $\alpha$  de 61,7 kDa (UreA) et une chaîne  $\beta$  de 26,5 kDa (UreB) liant deux ions Ni [Figure 7B.]. La résolution de la structure a révélé la formation d'un complexe dodécamère de 1,1 MDa composé de quatre trimères d'hétérodimère de UreAB, le tout contenant 24 ions  $\text{Ni}^{2+}$  (Ha et al., 2001).

De plus, d'autres enzymes dépendantes du Ni sont nécessaires à la croissance de la bactérie *H. pylori*, ce sont les hydrogénases. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le plus petit substrat connu en biologie, le dihydrogène selon la réaction.



*H. pylori* utilise l'hydrogène produit par les autres bactéries colonisatrices de l'estomac comme source d'énergie (Olson and Maier, 2002). Les hydrogénases sont définies en trois classes : les hydrogénases contenant deux atomes de Fe dans leur site actif, les [FeFe]-hydrogénases, les [NiFe]-hydrogénases possédant un atome de nickel et un atome de fer et la troisième classe

constituée par les hydrogénases possédant un unique atome de fer au niveau de leur site actif. Les [NiFe]-hydrogénases sont principalement utilisées pour l'oxydation de l'hydrogène (Forzi and Sawers, 2007).

En plus de ces protéines nickel-dépendantes essentielles à la survie de la bactérie pathogène, d'autres exemples peuvent être cités concernant l'importance du nickel pour la colonisation de *H. pylori* dans l'estomac.

Pour maintenir la disponibilité en nickel pour les hydrogénases et les uréases, tout en offrant une protection contre les effets nocifs du métal, *H. pylori* est équipée d'une protéine HspA<sup>3</sup>, homologue de GroES, protéines essentielles lors de chocs thermiques. HspA contient une extrémité en C-COOH riche en résidus histidines lui permettant de lier le nickel *in vitro* (Kansau et al., 1996). Des mutants portant soit une délétion complète soit des mutations ponctuelles dans les résidus critiques de ce domaine présentent une diminution de la teneur en nickel intracellulaire ainsi qu'une diminution de la tolérance au nickel. Les activités de l'uréase ne sont pas affectées chez ces mutants, mais les activités des [NiFe]-hydrogénases sont diminuées lorsque l'extrémité COOH de HspA est mutée. La protéine HspA d'*H. pylori* est donc impliquée dans la séquestration intracellulaire du nickel et la détoxification (Schauer et al., 2010).

Une étude a utilisé des souris nourries ou non avec un régime déficient en Ni et ont évalué la colonisation d'*H. pylori* chez la souche sauvage et chez le double mutant  $\Delta hpn \Delta hpn-2$  (Benoit et al., 2013). Les protéines Hpn et Hpn2 sont des protéines riches en résidus histidines dont le rôle physiologique n'avait pas encore été étudié. Les résultats montrent que les niveaux de colonisation du double mutant  $\Delta hpn \Delta hpn-2$  isolé des souris nourries avec le régime déficient en Ni étaient inférieurs au double mutant isolé des souris ayant été nourries avec du Ni. En revanche, les niveaux de colonisation de la souche sauvage étaient similaires dans les deux types de souris. Les auteurs suggèrent que *H. pylori* est capable de stocker le Ni via les protéines Hpn et Hpn2 pour faciliter la colonisation dans l'hôte.

Des tests de motilité et de chimiotactisme ont été réalisés sur *H. pylori* en présence de Ni et de Zn (Sanders et al., 2013). Les résultats suggèrent que le Zn a un effet attractant et que le Ni a un effet répulsif sur le chimiotactisme de la bactérie. Ces métaux de transition pourraient influencer la colonisation de l'estomac.

Les métaux de transition sont primordiaux pour la colonisation d'*H. pylori* dans l'estomac et notamment les ions Ni<sup>2+</sup>. Il est donc nécessaire à cette bactérie d'acquérir ces métaux pour sa survie et sa virulence. Cette notion sera plus largement développée dans le chapitre suivant.

### 1.5.2 Interactions plantes/ micro-organismes

Les métaux interviennent également dans les interactions entre les micro-organismes et les plantes. Il est très difficile de classer l'impact des métaux sur les interactions entre les hôtes et les micro-organismes. Dans certains cas, les métaux sont bénéfiques à l'un et nocifs à l'autre et dans d'autres cas, l'inverse est observé. La figure 8 fait référence à quelques grandes fonctions des métaux dans les relations entre les plantes et les micro-organismes.

---

3. Heat shock protein

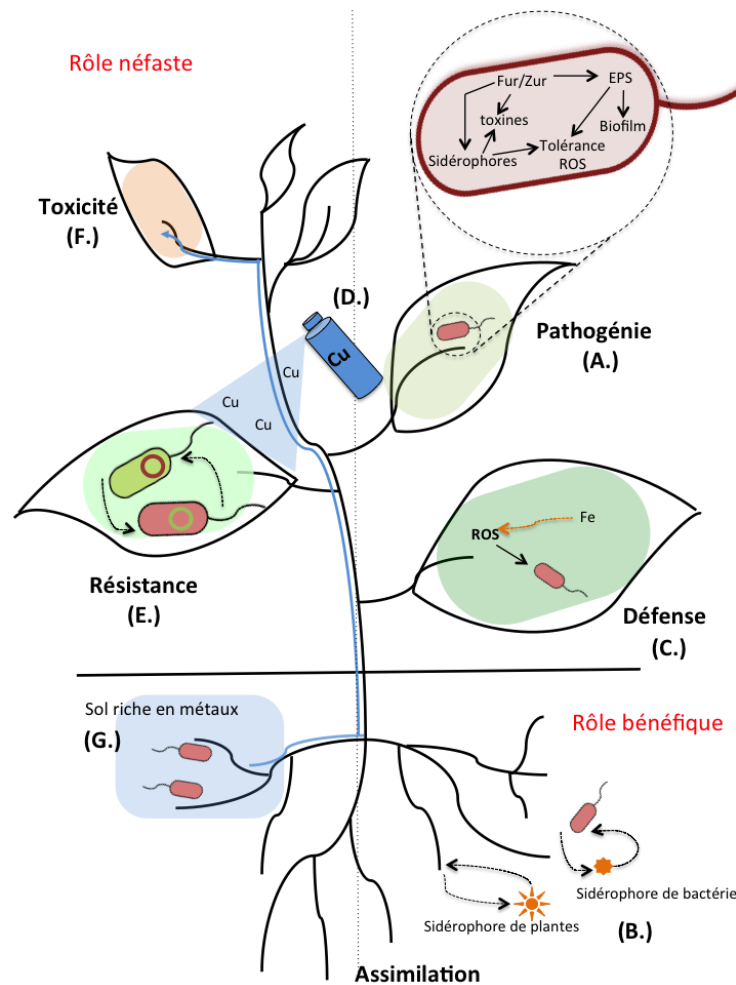


Figure 8 – Les métaux dans les interactions entre les plantes et les micro-organismes

**A.** Les métaux peuvent avoir un rôle bénéfique pour les micro-organismes en influençant l'expression de différents facteurs de virulence bactérienne, comme les toxines et les exopolysaccharides (EPS), en impliquant les systèmes de régulation, de senseurs de métaux FUR et ZUR, et les systèmes d'absorption appelés sidérophores. **B.** Les métaux peuvent être bénéfiques à la fois pour les plantes et pour les micro-organismes. L'absorption du fer par exemple se produit souvent par des chélateurs tels que les sidérophores. Cependant, cette assimilation nécessaire à l'hôte et aux micro-organismes entraîne une compétition pour les métaux. Les bactéries dans le sol sont en mesure de prendre les sidérophores produits par la plante, en plus de ceux qu'elles produisent. **C.** Pour la plante, la concurrence pour les métaux peut aussi être importante, en particulier pour le fer. Les plantes peuvent utiliser les métaux comme élément de défense, que ce soit en tant que catalyseurs pour la production de ROS, ou plus directement en tant que toxines antimicrobiennes. **D.** Les métaux peuvent aussi avoir un rôle bénéfique pour la plante et néfaste pour les microorganismes. En effet, du sulfate de cuivre est appliqué directement sur les cultures agricoles en tant qu'antimicrobiens pour protéger la plante contre les infections. **E.** Cependant, cette approche peut conduire au développement de souches bactériennes résistantes aux métaux et ce phénomène peut être accéléré par les transferts horizontaux des gènes de résistance. **F.** Cela peut également entraîner une surexposition aux métaux de la plante provoquant des symptômes de toxicité tels que la rugosité des fruits. **G.** L'accumulation de métaux dans le sol peut affecter les communautés microbiennes, avec des effets possibles sur les interactions plantes-microorganismes. Figure adaptée d'après (Fones and Preston, 2013)



### 1.5.2.1 Rôles bénéfiques des métaux dans les interactions plantes/micro-organismes

#### Importance des métaux dans les mécanismes de pathogénie

Parmi les nombreuses façons dont les métaux impactent la capacité d'un micro-organisme pathogène à coloniser une plante hôte, l'impact le plus évident est en terme de disponibilité de métaux pour permettre la croissance bactérienne dans les tissus végétaux. Les métaux peuvent également être impliqués dans la régulation des gènes de pathogénie et de virulence [Figure 8A.]. Un exemple important est le régulateur transcriptionnel *FUR*. *FUR* contrôle l'expression des systèmes d'entrée et de stockage du fer de manière fer-dépendante (cf section 2.3.3). *Pseudomonas. syringae pv. tabaci*, agent de la maladie appelée "feu sauvage" cause des taches ponctuelles et nécrosées sur les feuilles et sont entourées d'un halo chlorotique. Des mutants  $\Delta fur$  de cette souche ont une virulence et une pathogénie diminuées [Figure 9] (Cha et al., 2008). Cette perte de virulence et de pathogénie est probablement due à une diminution de la croissance *in planta* mais également à une diminution de l'entrée des ions Fe et de la synthèse de sidérophores ainsi qu'à une diminution de la production de toxines.

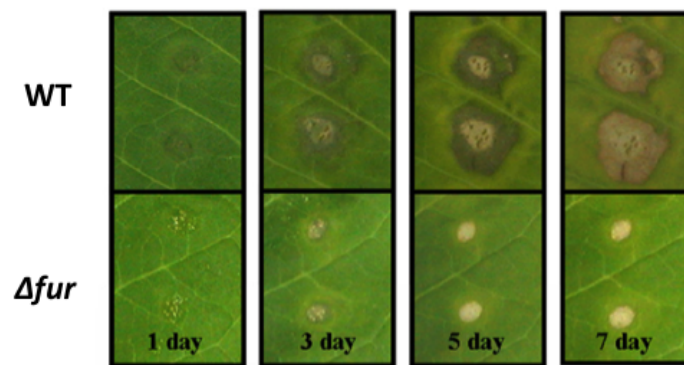


Figure 9 – Le régulateur *FUR* est essentiel pour la pathogénie et la virulence

Tests de virulence sur feuilles de tabac par *Pseudomonas. syringae pv. tabaci*. Les symptômes de la maladie sont causés par la souche sauvage (WT) mais absents chez le mutant  $\Delta fur$  (Cha et al., 2008)

#### Assimilation des métaux nécessaires aux plantes et aux micro-organismes

Dans la compréhension du rôle des métaux dans les interactions hôtes/micro-organismes, il est évident que l'assimilation des métaux va être importante pour la plante et les micro-organismes. La plante peut perturber l'approvisionnement en métaux de l'agent pathogène afin de résister à l'infection. Le fer est l'un des éléments les plus abondants dans le monde. Mais dans des environnements aérobies, la forme insoluble  $Fe^{3+}$  est la plus courante, ce qui le rend très faiblement biodisponible (Touati, 2000). Le fer est donc l'un des ions les plus importants dans les interactions hôtes-pathogènes. Pour cette compétition du fer, les bactéries comme les plantes produisent des chélateurs de fer appelés sidérophores [Figure 8B.]. Lors d'une infection par la bactérie pathogène *Dickeya dadantii* responsable de la maladie de la pourriture molle, la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, en réponse à cette intrusion, augmente sa production de ferritines,

protéines permettant le stockage du fer. Ce moyen de défense est induit par la production de sidérophores de la bactérie pathogène elle-même, ce qui indique une concurrence accrue pour le fer (Dellagi et al., 2005). Cet exemple montre que la compétition pour les métaux peut induire les systèmes de défense de la plante contre l'infection bactérienne. Et ces mécanismes de défense sont induits directement par des effecteurs bactériens.

#### Utilisation des métaux par la plante pour ses mécanismes de défense

L'exemple présenté ci dessus appartient également aux mécanismes de défense. Mais de la même façon que chez les hôtes mammifères, les cellules végétales utilisent les ions Fe comme systèmes de défense dans l'attaque des pathogènes via la production des ROS [Figure 8C.] (Wojtaszek, 1997).

#### Utilisation des métaux par l'Homme afin de protéger la plante contre les micro-organismes

L'interaction des métaux avec les plantes peut être d'origine anthropique. En effet les métaux sont utilisés en agriculture en tant qu'agents antifongiques [Figure 8D.]. Par exemple le cuivre est utilisé comme fongicide dans la "bouillie bordelaise" permettant le traitement de la vigne depuis le XIX<sup>e</sup> siècle (Russell, 2005). Cet exemple montre bien que le cuivre est bénéfique pour la plante et néfaste pour les micro-organismes.

#### 1.5.2.2 Rôles néfastes des métaux dans les interactions plantes/micro-organismes

##### Un excès de métaux entraîne une augmentation de la résistance des micro-organismes

L'utilisation prolongée du cuivre comme protectant contre les infections pose de nombreux problèmes. Tout d'abord, des souches microbiennes acquièrent des systèmes de défense et deviennent résistantes aux métaux. Cet effet est accentué par le transfert de gènes horizontaux qui permet le déplacement de ses systèmes de résistances d'une souche à l'autre par les échanges de plasmides et les souches pathogènes vont pouvoir de nouveau infecter les plantes [Figure 8E.] (Sundin et al., 1989).

##### L'utilisation d'un excès de métaux est toxique pour les plantes

Les métaux comme le cuivre par exemple en plus d'être antifongiques sont également phytotoxiques et leur utilisation en excès, provoquent des rugosités "russetting" sur les fruits [Figure 8F.] (Montag et al., 2006).

##### Les micro-organismes peuvent protéger la plante contre la toxicité des métaux

Certains micro-organismes protègent la plante contre l'effet toxique des métaux au niveau de la plante. [Figure 8G.]. *Kluyvera ascorbata* sauvage et un mutant surproducteur de sidérophores de cette même souche ont servi à inoculer des graines de tomate, de canola et de moutarde

d'Inde (Burd et al., 2000). Ces graines ont ensuite été mises en culture dans un sol supplémenté en nickel, en plomb ou en zinc. Le poids sec et le poids humide des plantes, la teneur en chlorophylle des feuilles et la concentration des métaux lourds dans les racines et les tiges des plantes ont été analysés. Pour l'ensemble de ces paramètres, les résultats indiquent que la croissance des plantes a été inhibée dans tous les cas par l'addition d'un métal. Les deux souches bactériennes ont été capables de contrecarrer un peu l'inhibition de la croissance causée par les métaux lourds. Dans la majorité des cas, le mutant surproducteur de sidérophores a eu un effet plus prononcé sur la croissance des plantes que la bactérie du type sauvage. Les auteurs suggèrent que cette capacité des bactéries à protéger les plantes contre les effets inhibiteurs de fortes concentrations de nickel, de plomb et de zinc serait reliée aux bactéries qui peuvent fournir suffisamment de fer aux plantes.

Les relations que peuvent avoir les micro-organismes et leur hôte impliquant les métaux sont étroitement liées. Cependant, toutes ces interactions sont dépendantes de la nature de l'élément métallique impliqués et de sa concentration. Les teneurs en métaux doivent être régulées finement au sein des micro-organismes et même de l'hôte. C'est pourquoi la notion d'homéostasie métallique va maintenant être abordée.

# Chapitre 2

## Homéostasie des métaux de transition

Ce chapitre est dédié à la description de l'homéostasie métallique chez les bactéries. Après avoir défini l'homéostasie et décrit les principaux mécanismes qui permettent de la maintenir, les homéostasies du nickel, du cuivre et du fer, en relation directe avec ces travaux seront développées plus en détail.

### 2.1 Homéostasie générale

Les signaux environnementaux peuvent être perçus par les cellules de manière différente suivant deux facteurs (Cases and de Lorenzo, 2005). Le premier est l'origine du signal (notion qualitative). Il peut s'agir de petites espèces de molécules comme des éléments nutritifs, des molécules de signalisation, des sels ou des solvants. Cela peut être également des états physico-chimiques comme la température, l'osmolarité, la teneur en eau ou le potentiel redox. Le deuxième facteur est l'intensité du signal (notion quantitative). En fonction de ces deux facteurs, le degré de réaction perçu par la cellule varie [Figure 10].

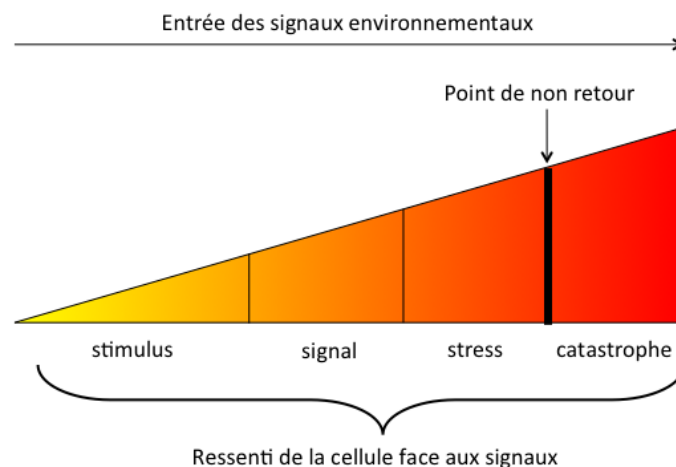


Figure 10 – Perception d'un signal environnemental par la cellule

Intensité des signaux environnementaux et ressenti de la cellule face à leur l'entrée. Figure adaptée d'après (Cases and de Lorenzo, 2005)

Si le signal est faible, il peut être assimilé à un stimulus ou, au contraire, si le signal est trop fort la cellule passera le point de non retour et les dommages causés seront irréversibles. Suite à la perception de ces signaux, la cellule va pouvoir, ou non, mettre en place des systèmes régulant ces signaux. Cette notion est appelée homéostasie. Si le signal est de nature métallique, l'homéostasie dans ce cas correspond à un subtil équilibre gouverné par cette dualité des métaux à la fois essentiels à l'état de traces et toxiques lorsqu'ils sont présents en quantités excessives.

### 2.1.1 Les principaux mécanismes de défense contre les métaux

Le premier chapitre de ce manuscrit a été dédié à la notion d'antagonisme des métaux. Les aspects bénéfiques et nécessaires des métaux à l'état de trace ont été développés ainsi que la toxicité qu'ils apportent lorsqu'ils sont en excès. La cellule bactérienne au cours de l'évolution a développé des mécanismes de défense pour maîtriser l'homéostasie métallique. La figure 11 représente les 6 grands mécanismes de résistance aux métaux.

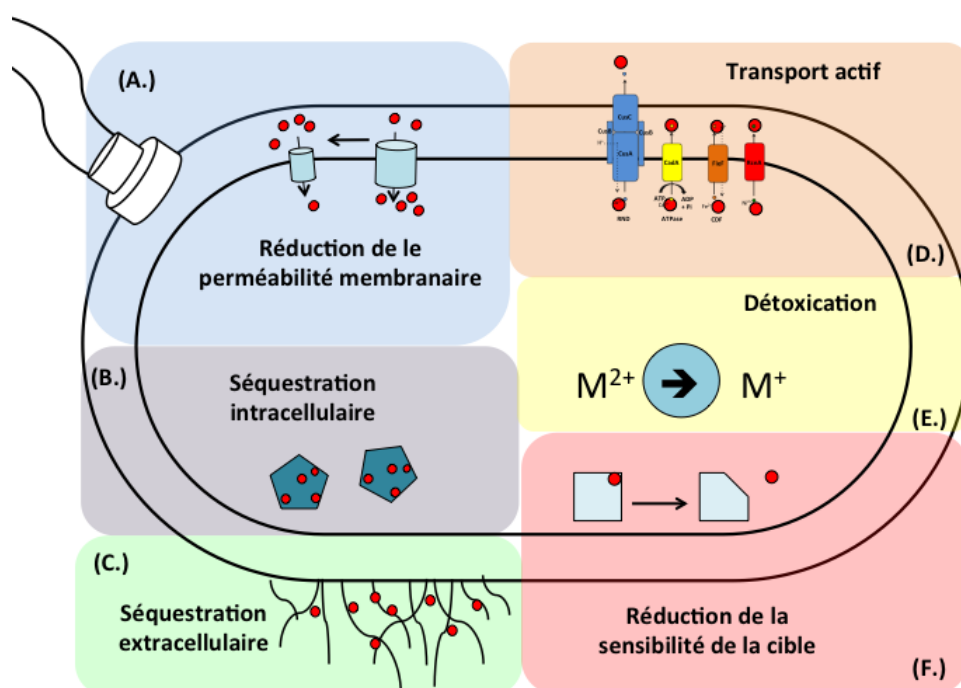


Figure 11 – Les principaux mécanismes de résistances aux métaux

**A.** Les micro-organismes sont capables de diminuer la perméabilité de leur membrane pour empêcher l'entrée des métaux. **B.** La séquestration intracellulaire, comme la séquestration extracellulaire **C.** permettent de protéger les composants de la cellule contre l'effet néfaste des métaux. **D.** Le transport actif des métaux par les pompes d'efflux est le système le plus spécialisé dans les mécanismes de résistance aux métaux. **E.** Ensuite, les micro-organismes possèdent des enzymes permettant de détoxifier le cytoplasme comme le périplasma en rendant le métal moins toxique. **F.** Enfin, la réduction des cibles cellulaires sensibles aux métaux appartient également aux mécanismes de protection contre l'effet toxique des métaux.

#### 2.1.1.1 Réduction de la perméabilité membranaire

Les micro-organismes, pour protéger leurs composants intracellulaires essentiels pouvant être sensibles à la présence de métaux, sont capables d'altérer leur paroi ou leur membrane cellulaire

[Figure 11A.] (Bruins et al., 2000). Des études chez *E. coli* ont montré qu'un stress aux ions  $\text{Cd}^{2+}$  provoquait une diminution de la synthèse de la porine OmpF. Cette protéine permet l'entrée des métaux dans le périplasma et sa baisse de production entraîne inévitablement une diminution de l'entrée des ions dans la cellule.

### 2.1.1.2 Séquestration intracellulaire et extracellulaire du composé

Lors d'une forte accumulation des métaux dans le cytoplasme, les cellules produisent des protéines chélatant spécifiquement les éléments [Figure 11B.]. Ce mécanisme est appelé la séquestration intracellulaire. Les métaux habituellement piégés sont le cadmium, le cuivre et le zinc (Nies and Silver, 1995). De plus, les métaux peuvent être séquestrés à l'extérieur de la cellule [Figure 11C.]. Les bactéries possèdent naturellement à leur surface des exopolysaccharides extracellulaires. Ces structures ont la capacité d'adsorber et de fournir des sites de fixation aux cations métalliques afin d'empêcher les interactions des métaux avec les composants cellulaires vitaux (Scott and Palmer, 1988).

### 2.1.1.3 Transport actif

Les métaux entrent dans la cellule via des transporteurs spécifiques ou par diffusion facilitée via des porines. Lors d'un excès d'ions dans le cytoplasme ou le périplasma, les métaux sont rapidement exportés [Figure 11D.]. Le transport actif, également appelé système d'efflux, représente la catégorie la plus importante des systèmes de résistance aux métaux. Les microorganismes utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Les gènes codant ces systèmes de transport peuvent être situés soit sur le chromosome, soit sur un plasmide (Nies and Silver, 1995). Quatre types de systèmes d'efflux de métaux chez les bactéries sont décrits dans la littérature [Figure 12].

Les pompes d'efflux de type RND<sup>1</sup> sont des systèmes tripartites constitués d'une protéine de membrane interne qui fournit l'énergie nécessaire au transport [Figure 12A.] (Poole, 2004). Ce type de pompe d'efflux fonctionne grâce à l'énergie de la force proton motrice. La seconde protéine est une OMF<sup>2</sup>. Il s'agit d'une porine qui permet aux molécules de franchir la membrane externe. Le troisième partenaire est une protéine périplasmique appelée MFP<sup>3</sup> permettant la jonction entre les deux protéines membranaires. Les pompes d'efflux de type RND sont le plus souvent impliquées dans des mécanismes de résistance aux antibiotiques comme AcrAB-TolC chez *E. coli*. Cependant chez *Legionella pneumophila*, le mutant *tolC*, codant pour la protéine de membrane externe possède une sensibilité accrue au nickel (Ferhat et al., 2009). Des pompes d'efflux de type RND permettant l'export des métaux de transition ont été décrits. Ces systèmes sont appelés HME-RND<sup>4</sup>. Le système CusCBA, chez *E. coli*, permet par exemple d'effluer les ions  $\text{Cu}^{2+}$  vers le milieu extérieur. Ce système sera plus largement développé dans la partie 2.2 dédiée à l'homéostasie du cuivre.

1. Resistance Nodulation-cell Division

2. Outer Membrane Factor

3. Membrane Fusion Protein

4. Heavy Metal efflux-RND

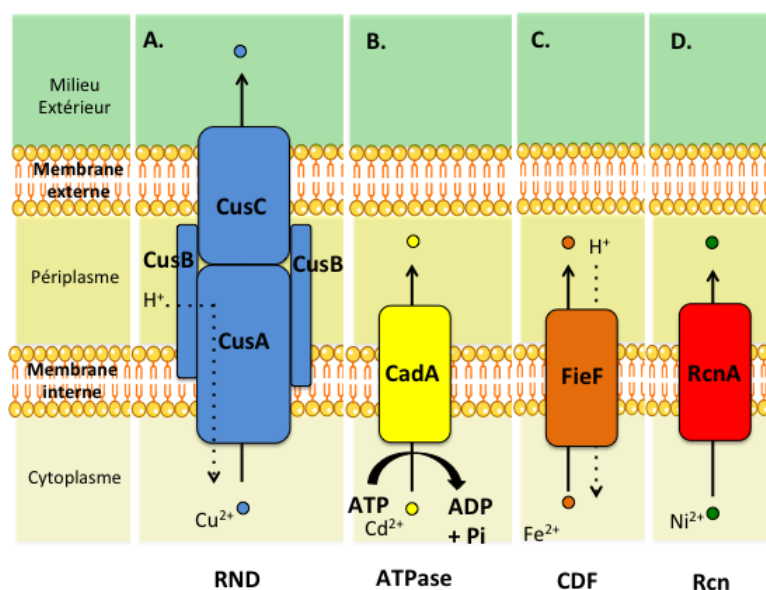


Figure 12 – Les différentes familles de pompe d'efflux de métaux

**A.** Le système RND (Resistance Nodulation-cell Division), **B.** le système ATPase **C.**, le système CDF (Cation Diffusion Facilitator) **D.** et le système de type Rcn sont les transporteurs permettant l'efflux des métaux.

Les transporteurs ATPases de type P sont des transporteurs présents chez les eucaryotes, les archées et les bactéries (Nies, 2003). Ces transporteurs nécessitent l'hydrolyse de l'ATP pour fonctionner et leurs substrats sont des cations inorganiques tels que le  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ag^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ . Les ATPases de type P peuvent importer des substrats du milieu extérieur vers le périplasma ou du périplasma vers le cytoplasme, dans le cas d'une ATPase de type P d'import. Mais ces transporteurs peuvent exporter également leur substrat du cytoplasme vers le périplasma ou du périplasma vers le milieu extérieur (ATPase de type P d'export). Sur la figure 12 **B.** est présenté le système ATPase de type P CadA chez *E. coli*, exportant les ions  $Cd^{2+}$  du cytoplasme vers le périplasma.

La famille des transporteurs de type CDF<sup>5</sup> sont également retrouvés dans les trois règnes du vivant et sont dédiés uniquement à l'export des métaux (Nies, 2003). Le principal substrat de ces transporteurs sont les cations  $Zn^{2+}$ . Ces systèmes de transport peuvent également exporter des ions  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ . Le système énergétique permettant le franchissement de la membrane peut être un gradient de concentration, un gradient chimiosmotique ou un gradient de potassium. [Figure 12**C.**]

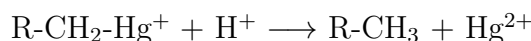
Au laboratoire, il a été mis en évidence une nouvelle famille de transporteurs. Une approche bioinformatique a visé l'identification de protéines possédant une étiquette histidine naturelle. YohM s'est avérée être une perméase située dans la membrane interne. Ce transporteur est constitué de 6 segments transmembranaires et d'une boucle riche en histidines dans le cytoplasme. Cette protéine a été renommée RcnA pour Resistance to Cobalt and Nickel [Figure 12**D.**] (Rodrigue et al., 2005). Comme son nom l'indique cette pompe est capable d'effluer les

5. Cation Diffusion Facilitator

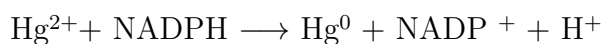
ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  à travers la membrane plasmique indépendamment de l'ATP. Ce système sera plus largement développé dans le paragraphe 2.4.3 dédié à l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$ .

#### 2.1.1.4 Altération enzymatique du métal vers une forme moins toxique

La détoxification enzymatique correspond à la transformation chimique d'un ion métallique toxique en une autre espèce moins nocive [Figure 11E.]. Ceci peut être réalisé en modifiant l'état d'oxydo-réduction. La résistance au mercure par des enzymes le réduisant est l'exemple le plus connu (Bruins et al., 2000). La première enzyme est une lyase MerB qui catalyse la réaction suivante :



Les ions  $\text{Hg}^{2+}$  sont ensuite pris en charge par une réductase spécifique MerA qui catalyse la seconde réaction :



Les ions  $\text{Hg}^0$  sont volatiles et pourront diffuser à travers les membranes vers le milieu extracellulaire.

#### 2.1.1.5 Réduction de la sensibilité de la cible

Certains micro-organismes s'adaptent à la présence de métaux toxiques en modifiant la sensibilité des composants cellulaires essentiels. Cela fournit un degré de protection naturelle [Figure 11F.] (Rouch et al., 1995). La protection est obtenue grâce à des mutations qui diminuent la sensibilité de la cible mais ne modifient pas sa fonction de base. Chez *E. coli* par exemple, une étude a montré qu'un stress aux ions  $\text{Cd}^{2+}$  entraînait des dommages à l'ADN (Mitra and Bernstein, 1978). Ensuite, des sous-cultures successives ont été effectuées en exposant encore les cellules au  $\text{Cd}^{2+}$ . Les bactéries ont acquis une résistance à ces cations, suggérant que l'ADN est devenu moins sensible aux ions  $\text{Cd}^{2+}$ .

Tous ces mécanismes de résistance sont importants pour maintenir l'homéostasie métallique dans la cellule. Cependant les bactéries ne possèdent pas tous ces mécanismes pour tous les métaux de transition. La suite de ce manuscrit s'attachera à développer les principaux mécanismes impliqués dans l'homéostasie des cations divalents  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  chez les bactéries.

## 2.2 Homéostasie du cuivre

Le cuivre possède trois états d'oxydation, le  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Cu}^{3+}$ . Dans la cellule, différents systèmes ont évolué pour canaliser le pouvoir d'oxydoréduction du cuivre et réguler son homéostasie. La concentration en cuivre libre est très faible ( $10^{-13}$  M) dans les cellules bactériennes. Le cuivre est intégré en tant que cofacteur à des enzymes clés impliquées dans de multiples activités nécessaires à la survie cellulaire. Des oxydases comme la cytochrome c oxydase (cf



section 1.3), des déhydrogénases spécifiques du NADH, ou encore des dismutases de l'anion superoxyde sont des cuproenzymes retrouvées dans environ 20% des bactéries (Ridge et al., 2008).

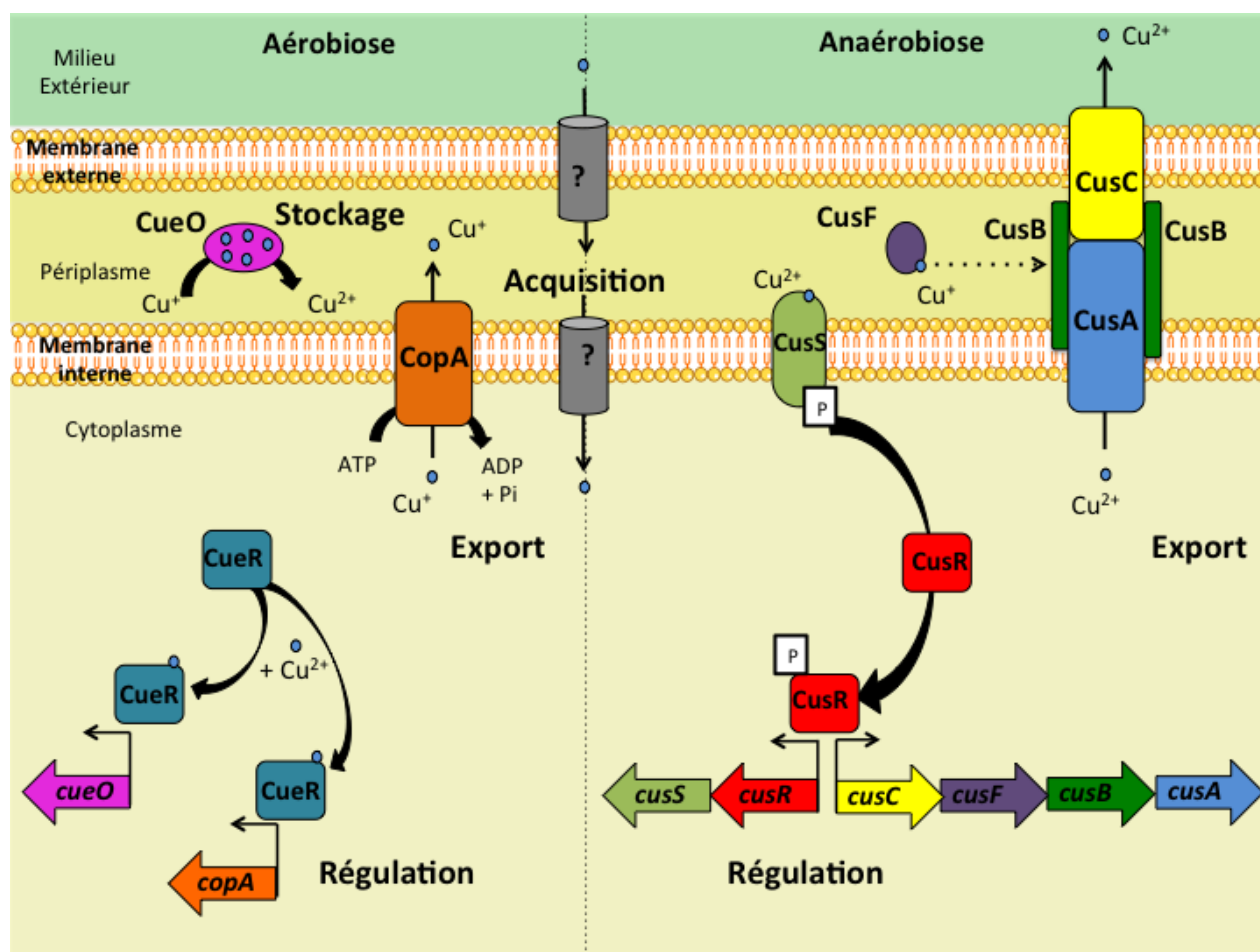


Figure 13 – Les différents mécanismes de résistance au cuivre chez *E. coli*

Les mécanismes de résistance fonctionnant en aérobiose sont présentés à gauche. L'acquisition du cuivre chez *E. coli* n'a pas encore été décrite. Un excès d'ions cuivre dans le cytoplasme engendre la production d'une ATPase CopA permettant l'efflux des ions  $\text{Cu}^+$  vers le périplasma. Une fois dans l'espace périplasmique, l'oxydase à multi-cuivre CueO oxyde les ions  $\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$  afin de détoxifier le périplasma. Cette enzyme peut être assimilée à une protéine de stockage du cuivre. Les gènes *copA* et *cueO* sont activés par le métallorégulateur CueR suite à la fixation d'ions  $\text{Cu}^{2+}$ . L'affinité entre CueR et le cuivre est forte. Le mécanisme de résistance fonctionnant en anaérobiose est présenté à droite. Il s'agit du système CusCFBA, codant pour un système de transport de type RND. Les protéines CusCBA permettent l'efflux des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et la protéine périplasmique CusF apporte les ions  $\text{Cu}^+$  en excès dans le périplasma vers le système Cus pour l'export vers l'extérieur de la cellule. Ce système est régulé par un système senseur régulateur à deux composants CusRS, CusS étant le senseur et CusR le régulateur.

Il existe trois systèmes chromosomiques de résistance identifiés à ce jour chez *E. coli* (Rensing and Grass, 2003) [Figure 13]. Ces trois systèmes sont régulés par deux systèmes de régulation. Le premier système est le régulateur CueR, activateur de type MerR. Il régule la transcription des gènes *copA* et *cueO* en réponse à un stress cuivre, argent ou or (Stoyanov et al., 2001). CueR lierait un ion  $\text{Cu}^+$  libre avec une affinité de l'ordre de  $10^{-21}$  M. Ce métallorégulateur active le gène codant une ATPase de type P, CopA. Cette ATPase permet le passage des ions  $\text{Cu}^+$  du cytoplasme vers le périplasma grâce à l'hydrolyse de l'ATP (cf section 2.1.1.3).

Une fois dans le périplasma les ions  $\text{Cu}^+$  peuvent être pris en charge par l'oxydase périplasmique à multi-cuivre CueO. Cette enzyme protège la cellule contre la toxicité du cuivre en oxydant les ions  $\text{Cu}^+$  en une forme moins toxique  $\text{Cu}^{2+}$ . Le gène *cueO*, régulé par CueR, est induit dès 3  $\mu\text{M}$  de cuivre (Outten et al., 2001a). En tant qu'oxydase à multi-cuivre, CueO couple l'oxydation du substrat à la réduction des molécules de dioxygène en molécules d'eau. Elle possède une activité laccase, plus précisément de phénol oxydase et de ferroxidase. Elle protège également les enzymes périplasmiques des dommages induits par le cuivre (Grass and Rensing, 2001b). CueO peut lier 5 atomes de cuivre par molécule. Enfin, son activité d'oxydase à cuivre est dépendante de l'oxygène : CueO ne fonctionne qu'en conditions aérobies.

*E. coli* possède un autre système intervenant dans l'homéostasie du cuivre en l'absence d'oxygène ; l'opéron *cusCFBA* (Outten et al., 2001a). Le système Cus d'*E. coli* code pour un système de résistance au cuivre et à l'argent. Ce dernier est composé d'un système RND CusCBA (cf section 2.1.1.3) et d'une protéine soluble périplasmique CusF. Cette petite protéine de 10 kDa peut fixer un ion  $\text{Cu}^+$  et le transférer directement à la protéine CusB pour détoxifier le cuivre du périplasma. Les gènes *cusCFBA* sont régulés par CusRS. Les gènes *cusRS* codent pour un système à deux composants permettant la transduction du signal en réponse à un stress cuivre. CusS est une histidine kinase, senseur du cuivre et CusR est le régulateur de réponse. Suite à sa phosphorylation par CusS, CusR active les deux opérons *cusCFBA* et *cusRS*, transcrits de façon divergente, en se fixant dans la région intergénique (Rensing and Grass, 2003).

Des systèmes accessoires de résistance au cuivre sont également portés sur des plasmides. Chez *E. coli*, l'opéron *pcoABCERS* localisé sur le plasmide pRJ1004 ainsi que le gène *pcoE* sont exprimés en réponse à la présence de cuivre. Un système homologue *cop* est présent chez *Pseudomonas syringae*. PcoA par analogie à CueO oxyderait les ions  $\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$ , forme moins toxique (Huffman et al., 2002). La protéine PcoB, de 33 kDa, serait localisée dans la membrane externe. Cette protéine s'avère être importante dans l'homéostasie du cuivre en transportant les ions  $\text{Cu}^{2+}$ . PcoC, protéine périplasmique de 12 kDa, lierait les ions  $\text{Cu}^+$  et  $\text{Cu}^{2+}$  de façon concomitante. PcoC est une protéine chaperon à cuivre originale car elle ne contient pas de cystéine. Elle possède une structure en tonneau  $\beta$  avec deux sites de liaison du cuivre interdépendants, l'un spécifique des ions  $\text{Cu}^+$  et l'autre spécifique des ions  $\text{Cu}^{2+}$  (Lee et al., 2002). Elle délivrerait probablement les ions  $\text{Cu}^+$  à PcoD. PcoD est une protéine de 34 kDa située dans la membrane cytoplasmique mais de fonction inconnue. Le gène *pcoE* est transcrit par son propre promoteur. PcoE est une petite protéine nécessaire pour obtenir une résistance maximale et fonctionnant comme chaperon à cuivre dans le périplasma (Rensing and Grass, 2003).

## 2.3 Homéostasie du fer

Le fer est le quatrième élément le plus important sur Terre et existe sous deux formes différentes : le fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  soluble et le fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  insoluble. Cependant dans des environnements aérobies, il existe surtout sous forme insoluble en ions  $\text{Fe}^{3+}$ , ce qui le rend très faiblement biodisponible (Touati, 2000). Le fer étant indispensable à la vie cellulaire (cf chapitre

1) les organismes doivent rendre le fer disponible, ils disposent pour cela de trois mécanismes. Ils peuvent diminuer le pH externe pour rendre le fer ferrique plus soluble. Ils peuvent réduire le fer ferrique en fer ferreux. Et enfin, ils peuvent utiliser des chélateurs du fer ferrique. Dans une cellule bactérienne,  $10^5$  à  $10^6$  atomes de fer sont dénombrés, mais cette teneur peut varier en fonction des conditions environnementales. Comme les autres métaux de transition, le fer est également toxique dans des conditions aérobies en créant du stress oxydant (cf section 1.4.2). C'est pourquoi les bactéries, de la même façon que pour le cuivre, doivent contrôler la teneur intracellulaire en fer.

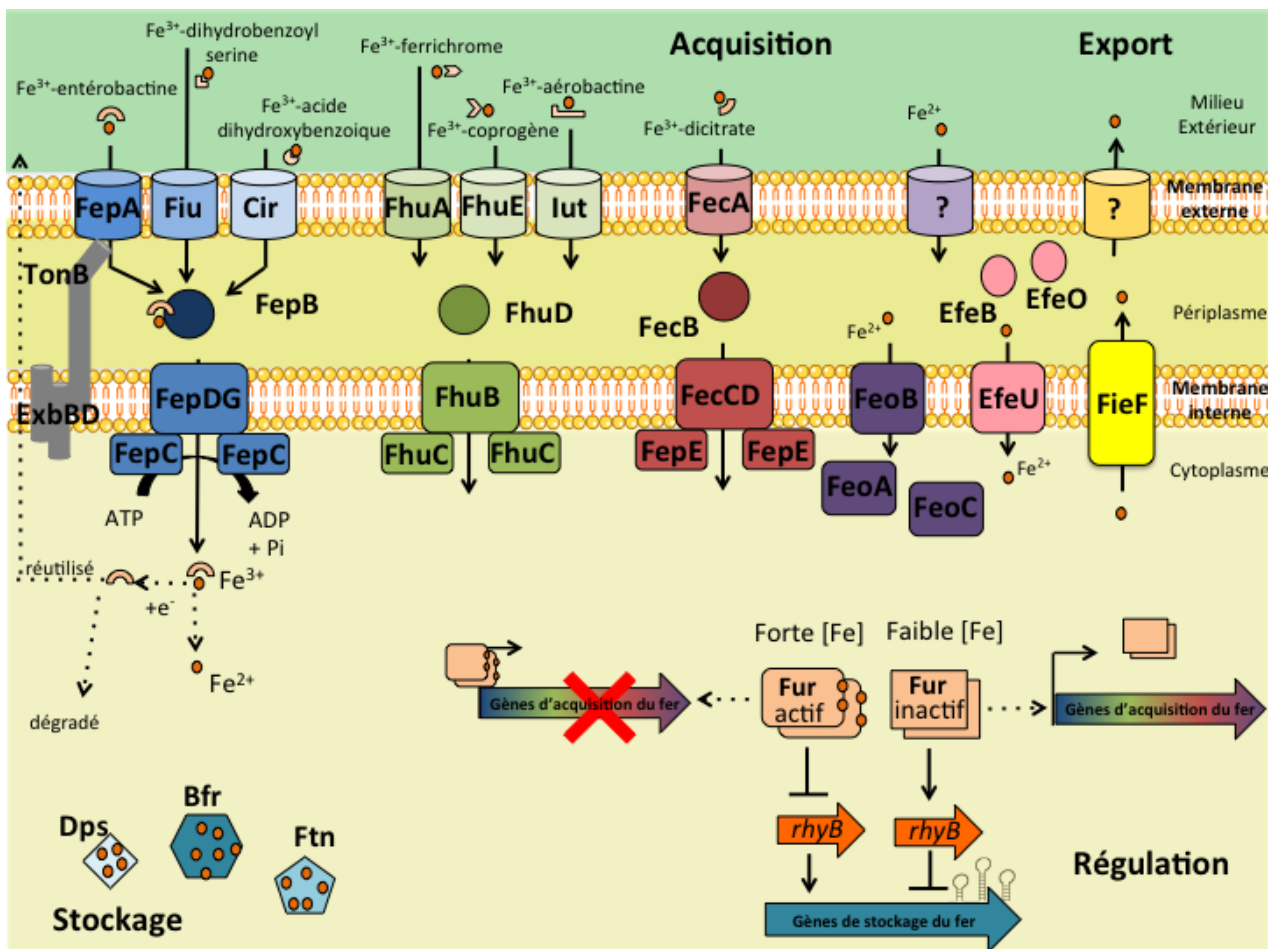


Figure 14 – Les différents mécanismes maintenant l'homéostasie du fer chez *E. coli*

Le fer et notamment les ions  $\text{Fe}^{3+}$  insolubles sont en premier lieu chélatés à l'extérieur de la cellule via des systèmes appelés sidérophores. Les complexes sont reconnus par des transporteurs TonB dépendant (TBDT) spécifiques de chaque complexe. Ces protéines de membrane externe vont permettre aux ions  $\text{Fe}^{3+}$  d'entrer dans le périplasma. Ce transport est dépendant du système énergétique TonB/ExbB/ExbD. Les complexes sont pris en charge par une protéine périplasmique. Celle-ci apporte le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore au système de transport ABC (ATP Binding Cassette). Sont représentés, en bleu, les systèmes transportant les complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophores de type catécholate, en vert, les complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophores de type hydroxamate et en rouge le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -dicitrate. Une fois les ions  $\text{Fe}^{3+}$  réduits en  $\text{Fe}^{2+}$  dans le cytoplasme, ils sont utilisés pour les grandes fonctions biologiques de la cellule. *E. coli* est capable de faire des réserves de fer et produit pour cela des protéines de stockage. Les ions  $\text{Fe}^{2+}$  sont transportés via le système Feo en anaérobose et par le système Efe en aérobiose. La régulation de ces systèmes d'entrée et de stockage sont régulés par le répresseur FUR. La régulation négative consiste à réprimer les gènes d'acquisition du fer lorsque le fer est fixé sur le régulateur FUR. En carence de fer, FUR s'inactive et l'expression des gènes d'acquisition est activée. La régulation positive par FUR fait intervenir le petit ARN RhyB. Le fer en excès dans la cellule, est efflué vers le périplasma via un transporteur de type CDF, FieF.

### 2.3.1 Assimilation du fer

Les bactéries sécrètent des chélateurs de fer extracellulaires, appelées sidérophores permettant la solubilisation du fer (Andrews et al., 2003). Les sidérophores sont de petites molécules de 1000 Da et sont caractérisés par leur haut degré d'affinité pour les ions  $\text{Fe}^{3+}$ . Il a été décrit plus de 500 sidérophores différents et ces derniers sont classés selon les groupements fonctionnels utilisés comme ligands [Figure 14]. Les sidérophores les plus étudiés sont l'entérobactine de type catécholate et le ferrichrome de type hydroxamate. Il existe des sidérophores spécifiques produits par certaines bactéries. La chrysobactine ou encore l'achromobactine sont des sidérophores produits par la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (Mahe et al., 1995) (Persmark et al., 1989). Les bactéries à Gram-négatif récupèrent les complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophores par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de la membrane externe dans un processus qui les entraîne vers la membrane cytoplasmique via le système énergétique TonB/ExbB/ExbD. Ces protéines membranaires sont appelées TBDT<sup>6</sup>. Des protéines de liaison dans le périplasme permettent le transport du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore entre les TBDT jusqu'aux systèmes de transporteur ABC<sup>7</sup> associés de la membrane interne. Ces derniers permettent l'entrée du complexe dans le cytoplasme où ils y seront dissociés (Andrews et al., 2003).

Il existe différents types de récepteurs qui sont capables de reconnaître les différents complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophores. Les TBDT possèdent une haute affinité pour ces complexes avec des  $K_D$  entre 0,1 et 100 nM (Andrews et al., 2003). Par exemple, les protéines FepA, Fiu et Cir reconnaissent les complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -catécholates, les protéines FhuA, FhuE, Iut transportent les complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroxamates et la protéine FecA reconnaît le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -dicitrate [Figure 14]. La figure 15 présente la structure cristallographique de FecA chez *E. coli* représentative des structures des récepteurs  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophores (Ferguson et al., 2002).

Ce sont des protéines en tonneau  $\beta$  composées de 22 feuillets  $\beta$  transmembranaires anti-parallèles qui traversent la membrane externe. Contrairement aux protéines de type porines, les TBDT possèdent la particularité d'un domaine "plug". Cette structure forme un bouchon au niveau de l'extrémité  $\text{NH}_2$  de la protéine et empêche le passage direct du complexe vers le périplasme [Figure 15].

Le transport des complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophores par les protéines de membrane externe nécessite de l'énergie. Cette énergie est apportée par la force proton motrice fournie par la membrane cytoplasmique et est transduite au complexe protéique TonB/ExbB/ExbD (Higgs et al., 1998). Chez *E. coli*, la transduction de l'énergie nécessite le contact direct entre TonB et la protéine de membrane externe qui possède un segment hydrophobe de sept acides aminés conservés, la boîte TonB (Heller et al., 1988). La suppression de cette région inactive le transport des complexes. Cependant, il existe également d'autres régions impliquées dans l'interaction entre TonB et les récepteurs de membrane externe. La présence d'un complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore dans le canal du récepteur induit un changement de conformation au niveau de la zone où se situe la boîte TonB. Ce serait la transduction d'énergie fournie par TonB qui engendrerait un nouveau changement de conformation du transporteur diminuant l'affinité avec son complexe. Cette déformation déplacerait le bouchon, laissant le passage libre pour l'entrée du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore au

6. TonB Dependant Transporter

7. ATP-Binding Cassette

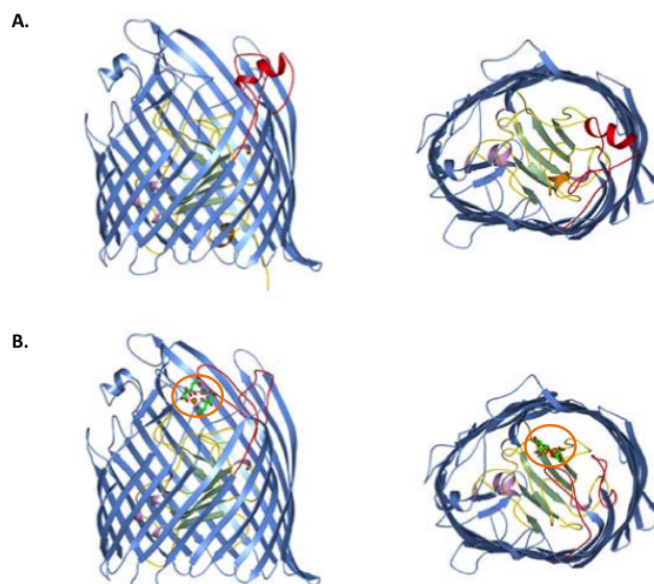


Figure 15 – Structure de FecA, récepteur du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -citrate, transporteur TonB-dépendant.

Structure cristallographique de FecA **A.** sans ligand fer-citrate et **B.** avec ligand. En bleu est représenté le tonneau  $\beta$ . Les boucles extracellulaires, représentées en rouge, subissent un changement de conformation en présence du ligand. Le domaine "plug" ou bouchon est représenté en vert. Le complexe fer-citrate est entouré en orange. Structure obtenue avec une résolution de 2,5 Å et 2Å par (Ferguson et al., 2002).

niveau du périplasma (Braun, 1995).

Ensuite le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore est pris en charge par une protéine périplasmique associée au transporteur de la membrane cytoplasmique comme par exemple les protéines FepB, FhuD ou FecB [Figure 14]. Chaque protéine périplasmique accepte un seul complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore mais il est difficile de savoir si la protéine de liaison recueille le complexe directement du TBDT ou si elle le récupère libre dans le périplasma (Koster, 2001).

La dernière étape consiste à franchir la membrane cytoplasmique. Pour cela, le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore va être pris en charge par le système de transport ABC [Figure 16]. Ce système est constitué de protéines membranaires permettant le passage du complexe. Les sous-unités peuvent être identiques comme dans le cas de FhuB ou indépendante comme dans le cas de FepD et FepG (Andrews et al., 2003). Ces protéines membranaires sont associées à deux protéines situées dans le cytoplasme participant au couplage énergétique. L'hydrolyse de l'ATP est déclenchée lors de l'interaction entre la protéine de liaison et les perméases (Braun et al., 1998). Ces sites de liaison sont caractérisés par des motifs conservés appelés Walker A et B (Walker et al., 1982). La séquence de Walker A est nécessaire à la liaison de l'ATP et la séquence de Walker B est essentielle à la liaison du magnésium. Lorsque le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore et l'ADP+ Pi sont libérés dans le cytoplasme, un changement de conformation libère la protéine périplasmique. Le cycle d'importation est terminé et un autre complexe peut être transporté. Bien que *E. coli* possède six récepteurs de membrane externe, elle ne contient que trois systèmes ABC : FepDGC pour le transport des complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -catécholates, FhuBC pour les complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroxamate et FecCDE pour le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -dicitrate.

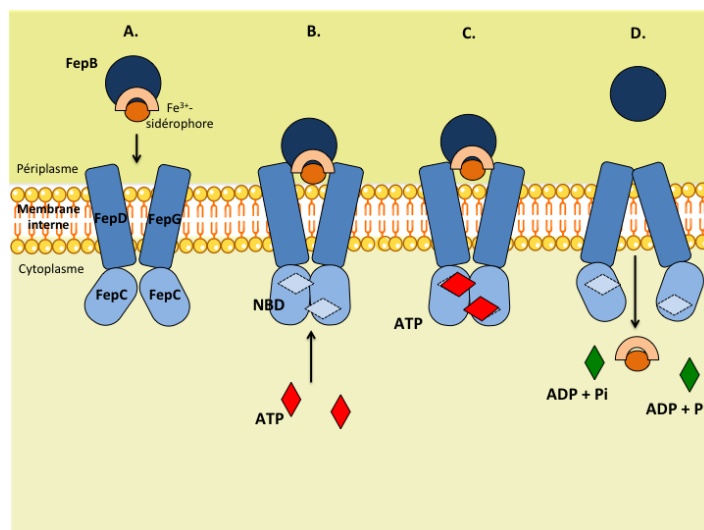


Figure 16 – Modèle de fonctionnement du système de transport ABC, exemple du transport d'un complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore par FepBDGC

**A.** Le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore est pris en charge par la protéine périplasmique FepB. Le complexe membranaire FepDG est verrouillé. **B.** Lorsque FepC se fixe à l'extrémité périplasmique des protéines FepDG, un réarrangement des protéines FepC favorise la liaison de l'ATP au niveau des NBD (Nucleotide Binding Domain). **C.** Deux molécules d'ATP se lient à l'interface des protéines FepC. **D.** L'hydrolyse de l'ATP provoque un changement conformationnel des hélices transmembranaires de FepD et FepG permettant la libération du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore dans le cytoplasme. Le cycle d'importation est terminé lorsque FepB est libérée dans le périplasmic et que les molécules  $\text{ADP} + \text{P}_i$  se décrochent du site NBD.

Enfin, le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore est dissocié pour permettre l'utilisation du fer dans le métabolisme cellulaire. Il est suggéré que la dissociation est réalisée via une réduction  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ , car l'affinité du sidérophore pour le fer ferreux est faible. Chez *E. coli*, l'utilisation du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -entérobactine nécessite une estérase qui est codé par le gène *fes* situé à l'intérieur d'un cluster de gènes impliqués dans la synthèse de l'entérobactine, de son exportation et de son absorption. Il semblerait que cette estérase réduise le  $\text{Fe}^{3+}$  porté par l'entérobactine entraînant la libération du  $\text{Fe}^{2+}$  et du sidérophore. Les sidérophores sont alors soit dégradés, soit réutilisés et réexportés vers le milieu extracellulaire pour de nouveau chélater les ions  $\text{Fe}^{3+}$  (Crosa, 1989).

En anaérobiose, le fer ferreux est plus stable et plus soluble que le fer ferrique. Le  $\text{Fe}^{2+}$  diffuse donc plus facilement à travers la membrane externe via les porines. Ensuite, les ions  $\text{Fe}^{2+}$  vont pouvoir traverser la membrane interne par le système FeoABC (Hantke, 2001). FeoB est une protéine de la membrane interne composée de deux domaines. L'extrémité C-terminale correspond au domaine transmembranaire et l'extrémité N-terminale possède un site de fixation du GTP. Ce domaine fournirait l'énergie nécessaire au processus de transport. FeoC est une protéine liant l'ADN. Il semblerait que cette protéine soit un régulateur transcriptionnel. La résolution de la structure de FeoA et des mesures d'activités enzymatiques avec l'extrémité NH<sub>2</sub> de FeoB suggère que FeoA n'a pas une activité GTPase comme le supposait l'hypothèse initiale (Lau et al., 2013). Les auteurs suggèrent donc que FeoA interagirait avec le domaine cytoplasmique de FeoB pour permettre le transport du fer.

En aérobiose, un autre système de transport permet l'entrée des ions  $\text{Fe}^{2+}$  solubles chez *E. coli*. Le système de transport possède une perméase EfeU, protéine homologue de la perméase

de haute affinité pour le fer, Ftr1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Le transport des ions  $\text{Fe}^{2+}$  nécessite la présence de deux protéines périplasmiques EfeO et EfeB qui sont respectivement une cuprédoxine et une hème-peroxydase. Ce système est induit par un pH acide dépendant de CpxAR et par une faible quantité ions  $\text{Fe}^{2+}$  (Cao et al., 2007).

Il existe également d'autres systèmes d'assimilation du fer chez d'autres organismes procaryotes (Andrews et al., 2003). La bactérie pathogène *Neisseria gonorrhoeae* ne sécrète pas de sidérophores mais possède des récepteurs à la transferrine et à la lactoferrine, sidérophores produits par les cellules eucaryotes (Cornelissen and Sparling, 1994). D'autres bactéries comme *Serratia marcescens* sécrètent des protéines appelées hémophores capables de lier l'hème ou les hémoprotéines (Letoffe et al., 1994).

### 2.3.2 Stockage du fer

De nombreuses bactéries sont capables d'effectuer des réserves intracellulaires de fer. Ces systèmes permettent à la cellule de bénéficier du fer lorsque les conditions extérieures sont restreintes en fer. Il existe trois types de protéines de stockage chez les bactéries (Andrews et al., 2003) : les ferritines (Ftn) retrouvées également chez les eucaryotes, les bactérioferritines (Bfr) et les protéines liant l'ADN (Dps). Les protéines Ftn et Bfr sont composées de 24 sous-unités et les protéines Dps contiennent 12 sous-unités. Ces sous-unités sont assemblées de manière à former une sphère contenant une cavité centrale permettant le stockage du fer. Ces cavités peuvent contenir jusqu'à 4500 atomes de fer pour les Ftn et les Bfr et environ 500 atomes de fer pour les protéines Dps. La protéine Dps, en plus d'être impliquée dans l'homéostasie du fer, joue également un rôle dans la protection de l'ADN contre le stress oxydant (Almiron et al., 1992).

### 2.3.3 Contrôle de la concentration en fer intracellulaire médié par le régulateur FUR

Le régulateur central FUR<sup>8</sup> régule plus de 100 gènes (Hantke, 2001). Le rôle principal de ce régulateur est de réprimer les gènes codant les protéines impliquées dans l'assimilation du fer. Fur est un senseur de la concentration en fer. Lorsque la concentration en fer est élevée, FUR fixe les ions fer. Le métallorégulateur va pouvoir se fixer à l'ADN au niveau des séquences appelées "boîtes FUR" localisées en amont des gènes codant les protéines d'acquisition du fer. Au contraire, lorsque la quantité de fer intracellulaire est faible, le métallorégulateur ne se fixera pas à l'ADN, permettant ainsi la transcription des gènes codant les protéines d'acquisition du fer.

Il existe également un autre système de régulation par FUR dite "positive". Cette régulation

---

8. Ferric Uptake Regulation

fait intervenir le petit ARN RhyB. D'après les analyses bioinformatiques, cet ARN de 90 nucléotides présenterait une structure secondaire avec 3 tiges-boucles (Hube et al., 2002). Une boîte FUR est présente en amont du gène *rhyB* et donc Fur réprime la synthèse de l'ARNnc. RhyB régule négativement à son tour six protéines. Les gènes *ftnA*, et *bfr*, codant les protéines de stockage du fer sont réprimés par RhyB. Cet ARN non codant régule négativement les gènes d'enzymes impliquées dans le cycle de TCA<sup>9</sup>, *acnA*, *fumA* et *sdhCDAB* qui sont respectivement les gènes codant pour une aconitase, une fumarase et une succinate déshydrogénase (Masse and Gottesman, 2002). Et la sixième protéine décrite comme cible de RhyB est une superoxyde dismutase (SOD) codée par le gène *sodB*. Les SOD chez *E. coli* permettent de réduire les dommages oxydatifs dans la cellule. SodB est une superoxyde dismutase à fer. Lorsque la cellule est limitée en fer, la production d'enzymes nécessitant du fer va être limitée. C'est pourquoi une régulation positive par FUR va être induite au niveau du gène *sodB* et en parallèle, une régulation négative sera réalisée sur le gène *sodA* codant la superoxyde dismutase à manganèse, afin de maintenir la teneur en SOD dans la cellule (Compan and Touati, 1993).

### 2.3.4 Efflux du fer

Lorsque le fer est en excès dans la cellule, une pompe d'efflux de type CDF, FieF (Ferrous Iron Efflux), permet le transport du fer vers le périplasme (Grass et al., 2005). L'expression du gène *fieF* est induit par les ions  $Zn^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ . Elle est plus faiblement induite avec les ions  $Cd^{2+}$  et non induite par les ions  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  et  $Ni^{2+}$  (Grass et al., 2001) (Lu et al., 2009). Cependant, cette protéine n'est pas impliquée dans l'homéostasie du zinc bien que FieF soit capable de transporter des ions  $Zn^{2+}$ . Cette protéine permet le maintien de l'homéostasie du fer. En effet, le gène  $\Delta fief$  est induit par des concentrations croissantes en fer. Cette régulation ne semble pas être FUR-dépendante, car chez le mutant  $\Delta fur$ , l'expression du gène *fieF* n'est pas modifiée. Par contre, l'ajout du gène *fieF* chez un double mutant  $\Delta fur\Delta fief$  abaisse la toxicité des ions fer. FieF, protéine de membrane interne, est le premier système d'export du fer décrit chez *E. coli*.

## 2.4 Homéostasie du Ni

L'état d'oxydation du nickel est communément le  $Ni^{2+}$ . Si le nickel est présent en plus faible quantité que le fer et le cuivre chez *E. coli* [Tableau 3], il n'en reste pas moins nécessaire. De la même façon que pour le cuivre et le fer, les bactéries doivent maintenir la teneur en nickel intracellulaire pour éviter la toxicité de ce métal (Li and Zamble, 2009).

9. cycle tricarboxylique ou cycle de Krebs



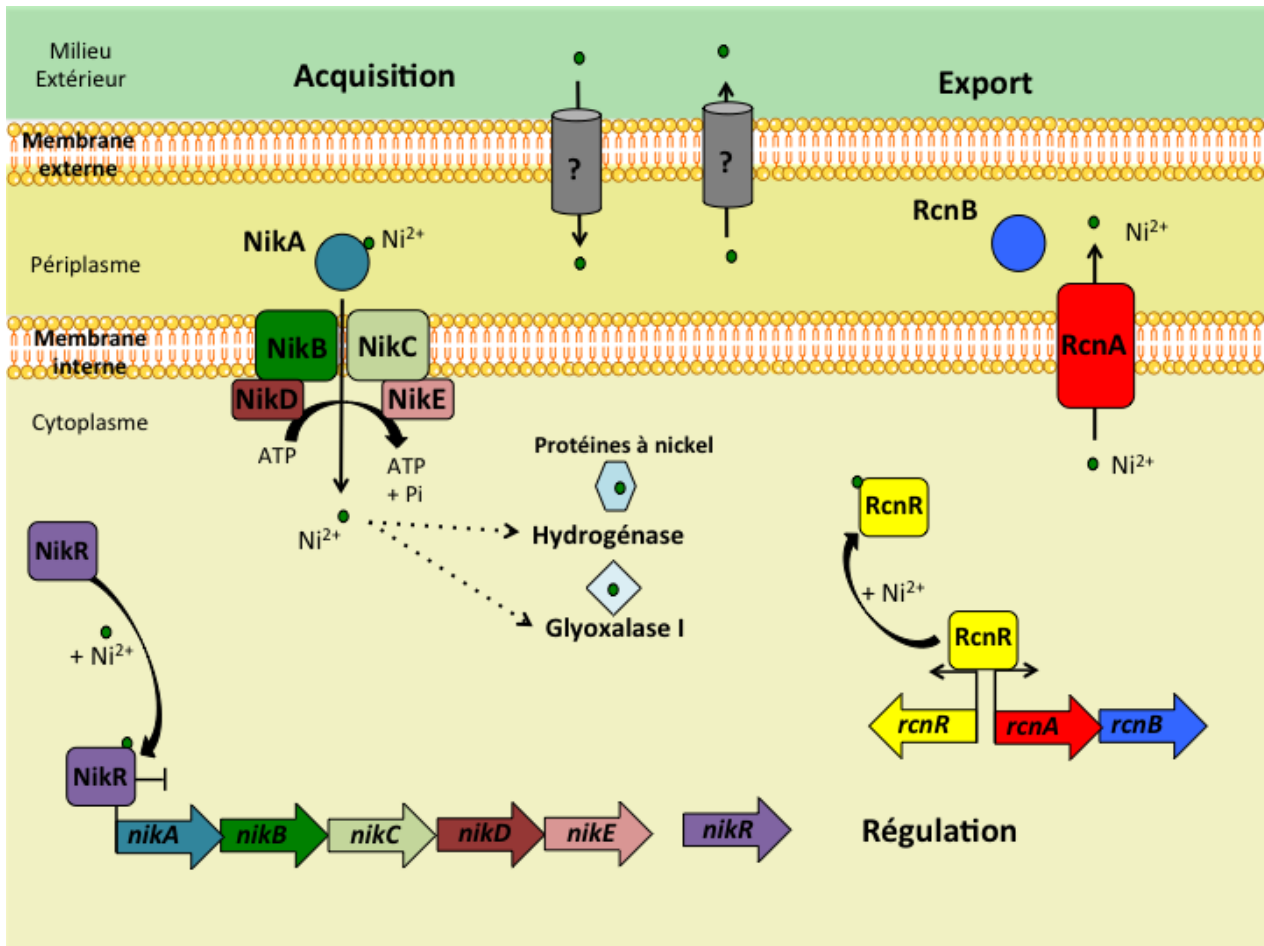


Figure 17 – Les différents mécanismes maintenant l'homéostasie du nickel chez *E. coli*

Chez *E. coli*, les ions  $\text{Ni}^{2+}$  traversent la membrane externe par diffusion facilitée via des porines. Aucun système de transport actif spécifique au nickel de la membrane externe n'a encore été décrit chez *E. coli*. Dans le périplasm, les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont chélatés par la protéine NikA, puis amenés au transporteur de membrane interne, NikBCDE. Les gènes codant ce transporteur sont régulés par NikR. Ce métallo-régulateur en présence de nickel, va réprimer la transcription des gènes codant l'acquisition du nickel. En absence de nickel, la répression est levée et l'expression des gènes *nikABCDE* est activée. Une fois dans le cytoplasme les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont nécessaires à la synthèse de la glyoxalases I et des hydrogénases. Si les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont en excès la pompe d'efflux RcnA va détoxifier le cytoplasme en nickel. Le gène *rcnA* est transcrit en opéron avec le gène *rcnB*. Ce gène code pour une protéine périplasmique qui permet de moduler l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$ . La transcription de l'opéron *rcnAB* est réprimée par RcnR. La fixation de nickel sur RcnR lors d'un excès d'ions lève la répression et permet l'activation de l'opéron.

### 2.4.1 Assimilation du nickel

Chez les protéobactéries le nickel peut traverser la membrane externe par l'intermédiaire de protéines appelées porines. Chez *E. coli* PhoE, OmpC et OmpF sont des porines permettant principalement le transport de cations par diffusion facilitée (Nies, 2007). Comme présenté ci-dessus, certains métaux de transition peuvent traverser la membrane externe via des TBDT. Chez *E. coli* aucun TBDT dédié au transport spécifique des ions  $\text{Ni}^{2+}$  n'a été identifié. Cependant, le premier transporteur de nickel de type TBDT, FrpB4 a été décrit en 2007 chez la bactérie pathogène *H. pylori* (Schauer et al., 2007). A pH 7, les ions  $\text{Fe}^{3+}$  insolubles sont prédominants et sont donc assimilés par la bactérie via les systèmes de transport TonB

dépendants [Figure 14]. Dans ces conditions, le transport du nickel via le système FrpB4 TonB dépendant n'est pas privilégié. Au contraire à pH 5, les ions  $\text{Fe}^{2+}$  sont prédominants et traversent la membrane externe par diffusion à travers les porines. Dans ces conditions le système énergétique TonB/ExbB/ExbD peut fournir l'énergie nécessaire au transporteur FrpB4 pour l'assimilation du nickel. Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont essentiels à l'activité uréase de ce pathogène pour la colonisation dans l'estomac (cf section 1.5.1.2). La forme du nickel transporté par FrpB4 n'a pas encore été déterminée, mais par analogie avec les sidérophores, le nickel pourrait être associé à un nickelophore (Schauer et al., 2008).

Au laboratoire, il a été caractérisé chez *E. coli* un système de transport de type ABC, codé par l'opéron *nikABCDE* permettant le passage du nickel du périplasme au cytoplasme (Wu and Mandrand-Berthelot, 1986) (Wu et al., 1991) (Navarro et al., 1993). Cet opéron est réprimé par le métallorégulateur NikR [Figure 17] (de Pina et al., 1999). Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  fixés au régulateur NikR entraînent la répression de l'opéron. Au contraire, lorsque la quantité de nickel intracellulaire est faible, NikR-apo ne permet plus la répression des gènes *nikABCDE*. Ces derniers vont être exprimés et les protéines synthétisées vont permettre l'import du nickel. NikD et NikE sont les deux ATPases cytoplasmiques énergisant le transport. NikB et NikC forment le canal membranaire permettant le passage des ions  $\text{Ni}^{2+}$  à travers la membrane plasmique. Le gène *nikA* code pour une protéine périplasmique de 56 kDa et possèdent une affinité pour les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . NikA délivre le nickel aux protéines transmembranaires NikB et NikC. Il semblerait que la liaison du nickel par NikA nécessite un chélateur organique (Cherrier et al., 2008). Un petit ligand organique de type  $(\text{L-His})_2$  (Chivers et al., 2012) (Lebrette et al., 2013) a été identifié comme un potentiel nickelophore.

Les transporteurs de type ECF<sup>10</sup> sont également capables de transporter le nickel du périplasme au cytoplasme. Ces systèmes d'import sont très largement répandus chez les bactéries et sont capables de transporter des métaux ainsi que d'autres molécules comme des vitamines par exemple (Eitinger et al., 2011). Les systèmes ECF sont composés d'une protéine membranaire impliquée dans la reconnaissance du substrat et d'une autre protéine membranaire responsable du couplage de l'énergie. Ces protéines membranaires sont couplées à une ou deux protéines cytoplasmiques possédant une activité ATPase.

Il existe également chez les bactéries des transporteurs secondaires du nickel appelés NiCoT<sup>11</sup>. Ces transporteurs ont une affinité pour leur substrat de l'ordre du nanomolaire. Ces systèmes sont composés d'une perméase contenant huit hélices transmembranaires et tirent parti du gradient électrochimique pour transporter des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et/ou des ions  $\text{Co}^{2+}$  (Eitinger et al., 2005). NixA chez *H. pylori* (Mobley et al., 1995), HoxN chez *Ralstonia eutropha* (Hebeln and Eitinger, 2004) sont des perméases à NiCoT et *E. coli* ne possède aucune perméase de type NiCoT.

---

10. Energy Coupling Factor

11. Nickel Cobalt Transporter

## 2.4.2 Protéines à nickel

Il a été recensé 8 enzymes contenant des ions  $\text{Ni}^{2+}$  [Tableau 4]. *E. coli* K12 possède deux de ces enzymes, la glyoxalase I et l'hydrogénase [Figure 17]. Cependant, les uréases à nickel sont largement retrouvées dans les souches entérohémorragiques comme la souche d' *E. coli* O157 : :H7 (Nakano et al., 2001).

Tableau 4 – Les différentes enzymes à nickel

Enzymes	Réactions
Glyoxalase I	méthylglyoxal $\rightarrow$ lactate + $\text{H}_2\text{O}$
Acido-réductone dioxygénase	1,2-Dihydroxy-3-oxo-5-(methylthio)pent-1-ene + $\text{O}_2 \rightarrow \text{HCOOH}$ + methylthiopropionate + CO
Ni Superoxide Dismutase	$2 \text{H}^+ + \text{O}_2 \cdot^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Uréase	$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$
Hydrogénase	$\text{H}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}^+ + 2 e^-$
Carbone monoxyde déshydrogénase	$2 e^- + 2 \text{H}^+ + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$
AcétylCoA synthase	$\text{CH}_3\text{-CFeSP} + \text{CoASH} + \text{CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{-CO-SCoA} + \text{CFeSP}$
Méthyl-CoM Réductase	$\text{CH}_3\text{-CoM} + \text{CoBSH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CoM-SS-CoB}$

Tableau adapté d'après (Ragsdale, 2009)

En plus de ces enzymes à nickel, *E. coli* K12 possède des protéines chaperons fixant des ions nickel. Par exemple, les protéines HypA, HypB récupèrent les ions  $\text{Ni}^{2+}$  au niveau du système d'import NikABCDE pour les délivrer à la protéine précurseur de la biosynthèse des hydrogénases. HypA peut lier le nickel avec une microaffinité grâce à un site contenant deux histidines conservées (Atanassova and Zamble, 2005). HypB est une GTPase pouvant lier un ion nickel sur un site de haute affinité comportant le motif CXXCGC ( $K_D=10^{-12}$  M) et un autre de faible affinité ( $K_D=10^{-6}$  M) (Leach et al., 2005). HypB agirait sous forme de dimère induit par l'hydrolyse du GTP afin de pouvoir délivrer l'ion  $\text{Ni}^{2+}$  à l'hydrogénase (Gasper et al., 2006). En plus des protéines HypA et HypB, la protéine chaperon SlyD améliore l'efficacité du transfert du nickel (Leach et al., 2007). Le domaine C-terminal de cette protéine contient des résidus connus pour chélater les métaux, dont quinze histidines, six cystéines et sept aspartates ou glutamates (Zhang et al., 2005).

## 2.4.3 Efflux du nickel

Lorsque les concentrations en nickel sont trop importantes, la cellule va synthétiser un système d'efflux. Ce système a été décrit au laboratoire comme un système d'efflux à la fois du nickel et du cobalt et a été nommé Rcn<sup>12</sup>. Les trois partenaires RcnA, RcnB et RcnR sont régulés par le métallorégulateur RcnR [Figure 17]. Le gène *rcnR* est situé en amont de l'opéron *rcnAB* et orienté en sens inverse. En absence ou en quantité limitante de nickel et de cobalt, RcnR est fixé à l'ADN et empêche l'expression des gènes *rcnRAB* (Blaha et al., 2011) (Iwig et al., 2006). Lorsque la concentration de ces métaux s'élève, RcnR se décroche de

12. Resistance to Cobalt and Nickel

l'ADN et lève la répression transcriptionnelle. RcnA est une protéine de membrane interne de 30 kDa, constituée de 6 segments transmembranaires et d'une boucle riche en résidus histidines (Rodrigue et al., 2005). Le mutant  $\Delta rcnA$  s'avère être fortement sensible aux ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  par rapport à la souche sauvage [Figure 18A.B.]. La détermination des profils de résistance a été couplée à des expériences de transport d'ions  $Ni^{2+}$  radiomarqués. Le mutant  $\Delta rcnA$  accumule deux fois plus de nickel par rapport à la souche sauvage [Figure 18D.]. Le gène *rcnA* est transcrit en opéron avec le gène *rcnB* codant une petite protéine de 10 kDa située dans le périplasm. Contrairement au mutant  $\Delta rcnA$ , le mutant  $\Delta rcnB$  présente une forte résistance aux ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  [Figure 18C.] par rapport à la souche sauvage. La complémentation du mutant avec un plasmide contenant le gène *rcnB* présente un phénotype similaire à la souche sauvage. De la même façon que pour RcnA des profils d'accumulation d'ions  $Ni^{2+}$  nickel radioamarqués ont été réalisés. Le mutant  $\Delta rcnB$  accumule moins de nickel que la souche sauvage [Figure 18D.]. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  sont efflués par la pompe RcnA et que RcnB modulerait cet efflux (Blériot et al., 2011).

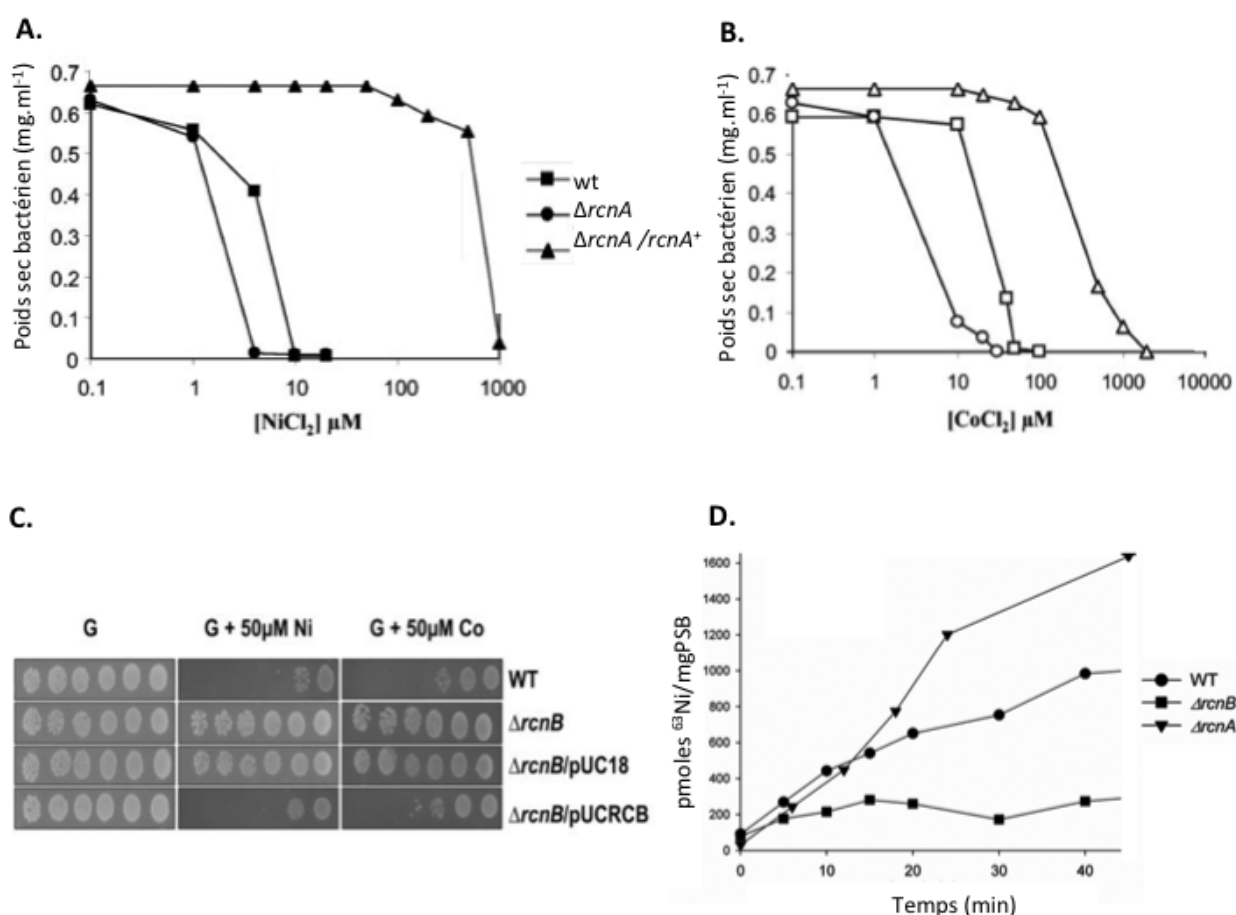


Figure 18 – Profils de résistance aux ions  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  et de transport de nickel radiomarqué chez les mutants  $\Delta rcnA$  et  $\Delta rcnB$

Profils de résistance du mutant  $\Delta rcnA$  et du mutant  $\Delta rcnA$  complétementé par le gène *rcnA* en milieu minimum liquide + glucose **A.** en présence de concentration croissante d'ions  $Ni^{2+}$  **B.** et d'ions  $Co^{2+}$  (Rodrigue et al., 2005) **C.** Profils de résistance du mutant  $\Delta rcnB$  et des mutants  $\Delta rcnB$  complétementés par le plasmide vide pUC18 ou par le plasmide pUCrcnB **D.** Profils d'accumulation d'ions  $Ni^{2+}$  radiomarqués chez les mutants  $\Delta rcnA$  et  $\Delta rcnB$  (Blériot et al., 2011)

La description des homéostasies pour des métaux Cu, Fe et Ni est importante pour comprendre le subtil équilibre que doit maintenir la cellule. Cependant il est important de prendre en considération que les homéostasies s'entrecroisent et que chaque changement peut influencer et perturber l'homéostasie des autres métaux.

## 2.5 Homéostasies croisées

Les descriptions des différentes homéostasies des métaux doivent être replacées dans le contexte où la cellule doit maintenir l'homéostasie pour l'ensemble des métaux. Cela signifie que la cellule doit être capable de différencier les métaux. Pour cela, les métalloprotéines, principales actrices du maintien de l'homéostasie métallique, doivent discerner le bon métal à fixer.

### 2.5.1 Les cellules sont capables de discerner le bon métal...

Le contrôle de la fixation des ions peut être en partie géré au niveau du transport, que ce soit le transport de protéines ou le transport des ions (Waldron and Robinson, 2009).

La cyanobactérie *Synechocystis* sp. nécessite une grande quantité de cuivre et de manganèse pour réaliser la photosynthèse. Les protéines MncA et CucA fixent respectivement du manganèse et du cuivre. Ces deux cations divalents se trouvent aux extrémités de la série Irving-Williams (cf section 1.2). Suivant cette série, il faudrait 10 000 fois plus d'ions  $Mn^{2+}$  que d'ions  $Cu^{2+}$  pour que la protéine MncA fixe du manganèse et évite la fixation du cuivre. L'intégration métallique au sein des protéines réalisée dans les différents compartiments cellulaires permet d'éviter la compétition entre les métaux. MncA possède une séquence signal de type Tat<sup>13</sup>. Cette protéine est donc déjà repliée avant son exportation dans le périplasma [Figure 19].

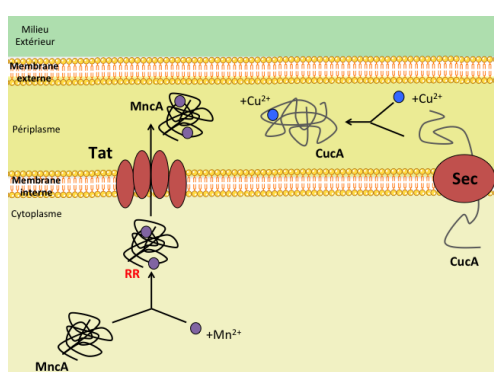


Figure 19 – La localisation du repliement des protéines permet la sélection du "bon" métal

*Synechocystis* sp., est une cyanobactérie nécessitant du Cu et du Mn fixés respectivement par CucA et MncA pour réaliser la photosynthèse. MncA est exportée dans le périplasma via le système Tat et CucA via le système Sec. Le repliement dans le cytoplasme de MncA permet le piégeage du  $Mn^{2+}$ . Les ions cuivre sont fixés par CucA dans le périplasma après l'exportation de la protéine non repliée par le système Sec. RR= motif double arginine. Figure adaptée d'après (Waldron and Robinson, 2009)

13. Twin Arginine Translocation

Les ions  $Mn^{2+}$  sont donc fixés dans le cytoplasme, compartiment où très peu de cuivre libre circule (Changela et al., 2003). Une fois fixés, les ions  $Mn^{2+}$  sont piégés au sein de la protéine qui est exportée par le système Tat. CusA est une protéine possédant une séquence signal de type Sec. Elle est repliée dans le périplasma après son exportation et fixe les ions  $Cu^{2+}$  dans le périplasma. MncA peut ainsi coexister avec CusA dans le périplasma.

Les cellules restreignent le nombre d'atomes métalliques dans le cytoplasme pour éviter la compétition des métaux pour les métalloprotéines. Au contraire, la cellule va favoriser la concurrence entre protéines pour les métaux. La bactérie doit alors contrôler la teneur intracellulaire de chaque métal en régulant finement l'entrée et l'efflux des métaux [Figure 20]. Plusieurs systèmes ont déjà été décrits précédemment comme CopA, CusCBA, FepA, FhuA, FecA, FecCDE, FieF, NikABCDE, RcnA,...transporteurs spécifiques du cuivre, du fer et du nickel.

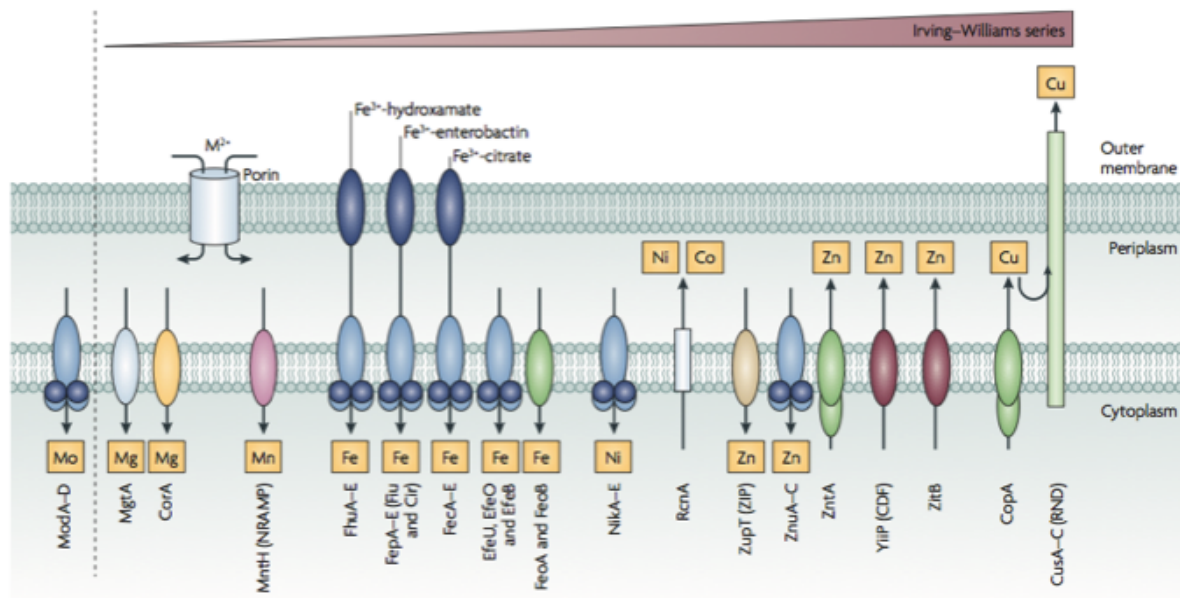


Figure 20 – Les différents systèmes de transport des métaux en fonction de la série d'Irving-Williams chez *E. coli*

La quantité de métaux dans la cellule est dépendant de l'import et de l'export de ces ions. Le maintien de la teneur en ions est médié par des transporteurs de métaux spécifiques d'entrée et d'efflux. Figure de (Waldron and Robinson, 2009)

Le nombre d'ions doit correspondre au nombre de sites de liaison pour éviter que les métaux avec une forte affinité comme les ions  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  prennent la place d'autres métaux comme les ions  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  plus bas dans la série d'Irving-Williams (Waldron and Robinson, 2009). Pour éviter ce phénomène, la bactérie *E. coli* possède plus de systèmes d'efflux pour les métaux

de transition qui sont au haut de la série d'Irving-Williams que de systèmes d'import [Figure 20].

## 2.5.2 ...mais lors d'une perturbation de l'homéostasie d'un métal, les autres homéostasies sont impactées.

Malgré le fait que les bactéries soient capables de discerner les "bons" métaux, il s'avère que lors d'un excès d'ions les homéostasies métalliques sont perturbées. Parfois, les métaux proches au sein de la série d'Irving-Williams peuvent être confondus. Pour la petite histoire, le nickel a été découvert par le chimiste suédois Axel Frederik Cronstedt en 1751. L'étymologie du mot nickel provient donc du suédois "kopparrnickel", qui signifie "faux cuivre" et de l'allemand "kupfernichel" pour "cuivre du diable". A l'époque, les mineurs pensaient extraire du minerai de cuivre et avaient beaucoup de difficulté à le traiter. Ils pensaient que le cuivre avait subi un sort des démons alors qu'il s'agissait tout simplement de minerai de nickel. Cela reflète bien la nature proche des éléments et de leur difficulté à les différencier. Ces perturbations peuvent être un simple changement d'élément au sein d'une métalloprotéine du fait de leur nature proche. Si ce phénomène impacte le transport d'un autre métal, les teneurs intracellulaires en métaux vont varier. Et ces variations peuvent entraîner une augmentation ou une diminution de la toxicité des métaux.

### 2.5.2.1 Un élément peut remplacer un autre élément

De nombreuses études ont démontré qu'un métal pouvait remplacer un autre métal. Les métaux de nature proche sont capables de se lier aux sites de fixation d'autres métaux. Chez des cellules eucaryotes, une étude a montré que des cellules traitées avec du nickel avaient des taux élevés de HIF-1<sup>14</sup>, facteur de transcription inductible par l'hypoxie. L'une des explications possibles serait que le nickel remplacerait le fer de l'hémoglobine, protéine essentielle pour le transport de l'oxygène. Cette substitution entraînerait une hypoxie qui activerait le facteur de transcription HIF-1. Or ce facteur régule également de nombreux gènes impliqués dans le transport du glucose impactant fortement le métabolisme général de la cellule (Kasprzak et al., 2003).

Chez les bactéries, l'exemple qui a déjà été cité précédemment (cf section 1.4.2.2), est la toxicité des ions  $\text{Co}^{2+}$ . En effet, les ions  $\text{Co}^{2+}$  sont très proches des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et les protéines contenant des clusters Fer-Soufre sont grandement affectées dans les cellules traitées aux ions  $\text{Co}^{2+}$  (Ranquet et al., 2007). Les ions  $\text{Co}^{2+}$  ne réagissent pas directement au niveau des clusters [Fe-S] déjà assemblés mais entrent en concurrence avec les ions  $\text{Fe}^{2+}$  lors de la synthèse des clusters [Fe-S].

---

14. Hypoxia Inducible Factor

### 2.5.2.2 Un élément peut empêcher l'entrée d'un autre élément dans la cellule, impactant la teneur en métaux

Plusieurs études portant sur l'effet toxique et cancérigène du nickel ont montré des changements dans le métabolisme du calcium. Le nickel soluble est connu pour entrer dans la cellule par les transporteurs de calcium, ce qui augmente l'absorption du nickel d'un facteur de 5,4. Le nickel est donc un inhibiteur des canaux calcium (Zamponi et al., 1996), et la diminution du transport de ce métal alcalino-terreux est compensée par le calcium des réserves intracellulaires. Ces changements de concentration intracellulaire induisent des variations d'expression au niveau des gènes associés à la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Valko et al., 2005). Un autre exemple chez la bactérie *E. coli*, en condition d'excès d'ions métalliques, il a été montré que le nickel pouvait emprunter le système de transport du magnésium CorA (Wu et al., 1994).

### 2.5.2.3 Un excès d'un élément perturbe l'homéostasie d'un autre élément entraînant des variations dans la toxicité des métaux

L'étude générale des homéostasies croisées basée sur l'analyse des teneurs intracellulaires en métaux est nettement moins bien décrit dans la littérature. Cependant, certaines études ont montré que l'excès d'un métal dans une cellule pouvait augmenter ou diminuer la toxicité de d'autres métaux. Une étude visant à évaluer la toxicité des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  a été réalisée chez *Rhodospseudomonas palustris*, bactérie photosynthétique pourpre non sulfureuse (Bird et al., 2013). Les auteurs ont montré que les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  avaient un effet synergique pour la toxicité et ces résultats ont également été observés chez *E. coli* MG1655, *Shewanella oneidensis* et *Rhodobacter capsulatus* (Bird et al., 2013). De plus, les ions  $\text{Cu}^{2+}$  augmentent l'effet toxique des ions  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  chez *R. palustris*. La présence d'ions  $\text{Fe}^{2+}$  ne modifie pas l'effet du cobalt mais diminue la toxicité du nickel en anaérobiose. Cependant les mécanismes exacts expliquant ces résultats n'ont pas encore été élucidés.





# Objectifs de thèse

Comme précédemment évoqué dans cette introduction, les métaux sont omniprésents et devenus nécessaires à tous les organismes vivants au cours de l'évolution. Paradoxalement, lorsque les métaux sont en excès dans la cellule, ils deviennent toxiques. Les cellules doivent alors réguler très finement les quantités intracellulaires de métaux. Cette notion est définie comme l'homéostasie métallique. L'un des mécanismes le plus important dans le maintien de l'homéostasie est le transport des métaux. Chez la bactérie modèle *E. coli*, la toxicité du nickel peut être atténuée par l'action de la pompe d'efflux RcnA (Rodrigue et al., 2005). Cette protéine de la membrane interne est capable d'effluer dans le périplasma à la fois les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  détoxiquant ainsi le cytoplasme de l'excès de ces métaux. La protéine accessoire RcnB dans l'efflux de ces ions a été mise en évidence au laboratoire. Cette protéine périplasmique module l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  (Blériot et al., 2011).

L'un des objectifs de ces travaux présentés a été de préciser la fonction exacte de RcnB dans l'efflux de ces métaux (Chapitre 4). La détermination de l'interaction entre RcnA et RcnB a été mise en évidence. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont permis de certifier que la protéine RcnB ne fixait pas les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  mais était capable de fixer du cuivre. Cette fixation du cuivre s'avère être nécessaire à la fonction de RcnB dans l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ . Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Blériot et al., 2014).

Ces travaux ont également montré une accumulation accrue de nickel en présence de cuivre dans le milieu. Ces résultats ainsi que ceux obtenus pour RcnB, cuproprotéine essentielle au maintien des quantités de nickel et de cobalt, suggèrent une relation très étroite entre l'homéostasie du nickel et celle du cuivre. De nombreuses études s'intéressent à une homéostasie d'un métal et s'attachent à comprendre et décrire les mécanismes qui la composent. Cependant, la réalité biologique est bien plus complexe et la variation de la teneur d'un métal influence très probablement la teneur d'autres métaux. Les pools des différents métaux sont interconnectés et s'influencent mutuellement. Malheureusement, peu d'études s'intéressent à ces interconnexions en raison de la complexité d'une telle approche. C'est pourquoi, afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent ces homéostasies croisées, une analyse globale par RNA-Seq a été entreprise chez *E. coli* lors d'un stress aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Les résultats du transcriptome sont présentés dans le chapitre 5. Ces interconnexions entre métaux nous ont permis de mettre en évidence un nouvel aspect de la toxicité du nickel. Cette toxicité est liée à une modification de l'homéostasie du cuivre et du fer induisant un stress oxydant et générant un relâchement de l'ADN (Chapitre 8). En plus d'être interconnectées entre elles, les homéostasies métalliques sont également en relation avec l'homéostasie du pH. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 6. L'analyse transcriptomique a permis d'observer l'impact du nickel sur la motilité cellulaire (Chapitre 7).

Enfin, dans la compréhension des mécanismes de l'homéostasie du nickel, ces travaux ont mis en évidence un nouveau système d'import des ions  $\text{Ni}^{2+}$  chez *E. coli* (Chapitre 9).

# Deuxième partie

## Matériels et Méthodes



# Chapitre 3

## Matériels et Méthodes

### 3.1 Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont décrits dans les tableaux 5 et 6. Toutes les souches bactériennes dérivent de *E. coli* K12.

#### 3.1.1 Composition des milieux de culture

##### Milieu riche LB

NaCl 10 g.l<sup>-1</sup>; bactotryptone 10 g.l<sup>-1</sup>; extrait de levure 5 g.l<sup>-1</sup>; 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) par addition d'agar à 12 g.l<sup>-1</sup>.

##### Milieu minimum M63

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,6 g.l<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g.l<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0,2 g.l<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub> 0,5 mg.l<sup>-1</sup>; pH 7,2. Ce milieu sert de base minimale et doit être complété par du glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) qui sert de source de carbone. Il peut être utilisé sous forme solide (G) par addition d'agar à 12 g.l<sup>-1</sup>.

#### 3.1.2 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<sup>ème</sup>. 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. 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 GasPack<sup>1</sup> pour obtenir des conditions anaérobies. Les cultures liquides en anaérobiose sont réalisées dans des tubes à essai bouchés de 30 mL rempli de 30 mL de milieu. Les cultures sont placées à 37°C dans une étuve sans agitation. Le nombre de bactéries est estimé par mesure de la turbidité, exprimée en unité de densité optique à 600 nm (D.O<sub>600nm</sub>), 1 unité de D.O<sub>600nm</sub> correspond à 4,5.10<sup>8</sup> bactéries par ml ou 0,37 mg de PSB<sup>2</sup> par ml. Les cellules

---

1. Becton, Dickinson et Cie

2. Poids Sec Bactérien

Tableau 5 – Souches bactériennes utilisées pour cette étude

souches	génotypes	références
BL21	F- <i>ompTgal[dcmlon] hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-)</i> (DE3)	(Studier and Moffatt, 1986)
W3110	F- <i>mcrAmcrB IN (rrnD-rrnE)1 λ-</i>	(Bachmann, 1972)
W3110 $\Delta rcnA$	W3110, <i>rcnA</i> : : <i>cm<sup>r</sup></i>	(Blériot et al., 2011)
W3110 $\Delta rcnB$	W3110, <i>rcnB</i> : : <i>cm<sup>r</sup></i>	(Blériot et al., 2011)
$\Delta rcnA\Delta rcnB$	W3110 $\Delta rcnA\Delta rcnB$	laboratoire
$\Delta rcnA\Delta rcnBM_{86A}$	W3110 $\Delta rcnA\Delta rcnB$ (M <sub>86A</sub> )	ce travail
$\Delta cueO$	W3110, <i>cueO</i> : : <i>kan<sup>r</sup></i>	ce travail
$\Delta cusF$	W3110, <i>cusF</i> : : <i>kan<sup>r</sup></i>	ce travail
$\Delta cusCFBA$	W3110, <i>cusCFBA</i> : : <i>Cm<sup>r</sup></i>	(Grass and Rensing, 2001a)
$\Delta rcnB\Delta cueO$	W3110, <i>rcnB</i> : : <i>cm<sup>r</sup>cueO</i> : : <i>kan<sup>r</sup></i>	ce travail
$\Delta rcnB\Delta cusF$	W3110, <i>rcnB</i> : : <i>cm<sup>r</sup>cusF</i> : : <i>kan<sup>r</sup></i>	ce travail
QC2949	MG1655 (F <sup>-</sup> $\lambda$ - <i>rph</i> ) $\Delta fhuF$ : : <i>lacIZ</i> ,	(D'Autreaux et al., 2002)
QC6009	QC2949, $\Delta fur$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(D'Autreaux et al., 2002)
ME9062	BW25113 <i>lacI<sup>q</sup>rrnB<sub>T</sub>14</i> $\Delta lacZ_{WJ16}$ <i>hsdR514</i> <i>\Delta araBAD<sub>A</sub>H33</i> $\Delta rhaBAD_{LD78}$	(Baba et al., 2006)
$\Delta cusA$	BW25113, $\Delta cusA$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta evgA$	BW25113, $\Delta evgA$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta evgS$	BW25113, $\Delta evgS$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta gadE$	BW25113, $\Delta gadE$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta mdtD$	BW25113, $\Delta mdtD$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta mdtE$	BW25113, $\Delta mdtE$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta mdtF$	BW25113, $\Delta mdtF$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta ompA$	BW25113, $\Delta ompA$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta ompC$	BW25113, $\Delta ompC$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta ybhF$	BW25113, $\Delta ybhF$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta ybhG$	BW25113, $\Delta ybhG$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta ybhS$	BW25113, $\Delta ybhS$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta yddA$	BW25113, $\Delta yddA$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta yddB$	BW25113, $\Delta yddB$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta ydeO$	BW25113, $\Delta ydeO$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta yibH$	BW25113, $\Delta yibH$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta yojI$	BW25113, $\Delta yojI$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta znuA$	BW25113, $\Delta znuA$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta znuB$	BW25113, $\Delta znuB$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
$\Delta znuC$	BW25113, $\Delta znuC$ : : <i>kan<sup>r</sup></i>	(Baba et al., 2006)
AW405	F <sup>-</sup> <i>gal<sub>1</sub><sup>-</sup> gal<sub>2</sub><sup>-</sup> ara<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> xyt<sup>-</sup> thr<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> B<sub>1</sub><sup>-</sup></i>	(Armstrong et al., 1967)
HCB1737	AW405, <i>fliC</i> (S219C)	(Yuan and Berg, 2008)

Tableau 6 – Plasmides utilisés pour cette étude

plasmides	génotypes	références
pUC18	<i>lac amp<sup>r</sup></i>	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pAR123	pUC18, <i>rcnRAB</i>	(Rodrigue et al., 2005)
pMG10	pAR123, <i>rcnBM<sub>86A</sub></i>	ce travail
pET30	pT7, <i>kan<sup>r</sup></i>	Novagen
pETRCB	pET30, <i>rcnB</i>	(Blériot et al., 2011)
pETRBM	pET30, <i>rcnBM<sub>86A</sub></i>	ce travail
pEGL16	fragment PCR $\Delta rcnAB$ in pKO3, <i>Cm<sup>r</sup></i>	laboratoire
pRR-GFP	pBAD24, GFP, séquence signal Tat en N-ter, <i>Amp<sup>r</sup></i>	(Santini et al., 2001)
pSL38YFP	intégration de Ppen - Tet <sup>r</sup> - <i>yfp</i> dans <i>cgeD</i>	(Lee and Grossman, 2006)

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.

### 3.1.3 Conditions de culture pour l'analyse transcriptomique

Deux cultures de 85 mL de milieu M63, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) et ensemencé avec la souche sauvage *E. coli* W3110 sont réalisées dans des erlens de 250 mL. Ces cultures sont placées au bain-marie à 37 °C avec une agitation orbitale de 130 rpm jusqu'à obtention d'une D.O<sub>600nm</sub> de 0,3. Un stress de 10 min est réalisé dans l'un des deux erlens avec 50µM final de NiCl<sub>2</sub>. 40mL de culture sont ensuite centrifugés 10 minutes à 5000 rpm à 4°C . Les culots bactériens sont immédiatement congelés avec de l'azote liquide et conservés à -80°C en attente de l'extraction des ARN. Cette expérience à été reproduite 3 fois.

### 3.1.4 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'à l'obtention d'une D.O<sub>600nm</sub> de 0,6. La culture est ensuite diluée en cascades de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup> dans du milieu M63. 5 µl des dilutions contenant de 10<sup>2</sup> à 10<sup>7</sup> bactéries/mL 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 en milieu liquide

Des précultures liquides sont effectuées comme précédemment décrit en absence de métaux jusqu'à l'obtention d'une D.O<sub>600nm</sub> de 0,6. Puis les cultures de 2mL sont réalisées en milieu minimum supplémenté par des concentrations croissantes de métaux. La D.O<sub>600nm</sub> est lue après 16 h de croissance à 37°C avec agitation pour estimer la croissance bactérienne des différentes souches.

#### Croissance en milieu liquide avec le técan

Des précultures liquides sont effectuées comme précédemment décrit en absence de métaux jusqu'à l'obtention d'une D.O<sub>600nm</sub> de 0,6. Puis les cultures de 200µl sont réalisées en milieu minimum supplémenté par des concentrations croissantes de métaux déposées dans une plaque 96 puits transparentes (Nunc®). La D.O<sub>600nm</sub> est lue toutes les 30 min grâce à un lecteur de plaque Infinite®M200<sup>3</sup> pendant 16h. Les cultures sont agitées à 37°C pendant 26 min chaque lecture de D.O<sub>600nm</sub> .



## 3.2 Méthodes génétiques et de biologie moléculaire

### 3.2.1 Extraction d'ADN

#### Extraction d'ADN plasmidique

Les extractions des plasmides en grande et petite quantité, basées sur la technique de lyse alcaline, ont été réalisées avec respectivement les kits NucleoBond® Xtra Midi et Nucleospin® Plasmid en suivant les indications du fournisseur.<sup>4</sup>

#### Extraction d'ADN chromosomique

Les extractions d'ADN chromosomique ont été réalisés avec le kit Wizard® Genomic DNA Purification. Le protocole suivi est celui fourni par le fabricant<sup>5</sup>.

### 3.2.2 Extraction des ARNs par la méthode au phénol froid

Les ARNs ont été extraits par la méthode au phénol froid protocole adapté de (maes et messens 1992 ou schmitt 1990). Cette méthode est basée sur la précipitation différentielle entre les composants cellulaires à pH acide. En effet, les ARNs en présence de phénol (pH 4,3) restent solubles dans la phase aqueuse alors que l'ADN et les protéines sont insolubles.

Les culots de cellules sont resuspendus dans 500 $\mu$ l de Tris 25mM pH7,6, EDTA 10mM, glucose 20%. Les cellules sont ensuite transvasées dans des tube vissés autoclavés, préalablement remplis avec 0,4g de billes (150 - 212  $\mu$ m de diamètre). 500 $\mu$ l de phénol froid, sont rajoutés. Les cellules sont cassées à l'aide d'un appareil FastPrep® -24<sup>6</sup> en 3 cycles de 20 sec à vitesse 6 avec 5 min d'attente dans la glace entre chaque cycle. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min à 13000 rpm à 4°C . Les surnageants sont récupérés et soumis à deux traitements phénol-chlorophorme-alcool isoamylique (25 :24 :1) ajoutés à un volume équivalent de celui du surnageant. Puis à un dernier traitement chlorophorme-alcool isoamylique (24 :1) afin d'éliminer les traces de phénol. La précipitation des acides nucléiques est réalisée avec 0,1 volume d'acétate de sodium à 3M et 2 volumes d'éthanol 100%. Après 30 min à -20°C , les ARN sont centrifugés 10 min à 12000 rpm à 4°C et puis à nouveau resuspendus dans de l'éthanol 75%. Les culots d'ARNs sont ensuite séchés à 42°C pendant 10 min afin d'éliminer les traces d'éthanol. Puis les culots sont solubilisés avec de l'eau traité au DEPC pendant 10 min à 60°C . Les restes d'ADNs sont éliminés par deux traitements avec le kit DNA-Free<sup>TM</sup> Ambion<sup>7</sup>. Les quantités des ARNs extraits sont dosés au nanodrop par mesure de la D.O<sub>260nm</sub>. Leurs qualités sont vérifiés sur gel d'agarose 1% et leurs puretés sont analysés par PCR (voir 3.2.4). Les ARNs peuvent être alors conservés à -80°C .

---

4. Macherey-Nagel

5. Promega

6. MP Biomedicals

7. Ambion RNA by Life Technology

### 3.2.3 Rétrotranscription

Une quantité équivalente (2,104 copies/ $\mu$ L) de l'ARN de synthèse pAW (Applied Biosystems® GeneAmp® pAW109 RNA Control Template<sup>8</sup>) a été ajoutée à tous les échantillons d'ARNs. Cet ARN sert de contrôle endogène et permet de normaliser les variations d'efficacité de la transcription inverse liées à la qualité des échantillons. Les ARNs ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide du kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis en suivant les instructions du fournisseur<sup>9</sup>. La M-MuLV rétrotranscriptase utilisée est une ADN polymérase ARN dépendante isolée du rétrovirus de la leucémie murine. Les amorces sont des hexamères qui se fixent aléatoirement sur les matrices ARN. A la fin de la rétrotranscription, les échantillons ont été incubés à 70°C pendant 15 min pour dégrader les ARN engagés dans les complexes ARN-ADNc. En effet, les ARN deviennent instables à haute température en présence de fortes concentrations en ions magnésium (dans ce cas, 5 mM). Les ADNc néosynthétisés ont été aliquotés et conservés à -20°C.

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

La technique de PCR<sup>10</sup> 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 thermostable<sup>11</sup> 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.

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 Mycycler<sup>12</sup>. 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.

### 3.2.5 PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Cette technique est basée sur les mêmes principes que la PCR classique (voir 3.2.4) mais elle quantifie précisément l'ADN, ce qui permet au final de mesurer l'expression des gènes dans l'échantillon testé. La quantification est basée sur la mesure, à chaque cycle, de la fluorescence émise par le SYBR Green qui s'est intercalé dans la double hélice d'ADN. Le kit LightCycler®

8. Life Technology

9. ThermoFisher Scientific

10. Polymerase Chain Reaction

11. Taq polymérase, Promega

12. Biorad

480 SYBR Green I Master<sup>13</sup> a été utilisé. Pour chaque gène étudié par PCR quantitative en temps réel, une gamme étalon a été établie à partir de différentes dilutions de l'ADN génomique de la souche sauvage W3110 *E. coli* purifié (de 1 à 10<sup>-8</sup> ng/ $\mu$ L d'ADN). Elle permet d'évaluer l'efficacité de l'amplification mais aussi de quantifier les transcrits du gène d'intérêt présents dans les différents échantillons. Les milieux réactionnels ont été préparés selon les instructions du fournisseur. Chaque réaction est effectuée sur 1  $\mu$ L d'échantillon (gamme étalon et ADNc) dans un volume final réactionnel de 10 $\mu$ L. Un cycle de synthèse est constitué des trois étapes :

1. La dénaturation de la matrice ADNc par chauffage à 95°C (15 sec).
2. L'hybridation des amorces réalisée à une température dépendante de la composition en base des oligonucléotides (15 sec).
3. L'extension des amorces est réalisée à 72°C (20 sec).

Une amplification classique comporte 45 cycles, précédés d'une étape de dénaturation de 10 min à 95°C et s'achevant par un cycle comprenant une étape d'hybridation d'une sec à 95°C d'une hybridation 1 min à 65°C et d'un refroidissement de 30 sec à 40°C. Les cycles des chauffages successifs sont assurés par l'appareil LightCycler<sup>14</sup>.

Le logiciel calcule ensuite, pour chaque échantillon, le nombre de cycles nécessaire à la détection de la fluorescence dans la zone propice à la quantification (début de la phase linéaire d'émission de la fluorescence). Ce nombre correspond au "Crossing Point" (CP). La comparaison des seuils de détection des ADNc avec les CP de la gamme étalon permet de calculer leur concentration et de ce fait la quantité de transcrits du gène amplifié. Ces expressions ont ensuite été normalisées en se référant à l'expression d'un gène dont l'expression est stable dans les conditions de l'étude. Ici, le gène choisi est *fabZ*, gène étant le plus stable lors de l'analyse transcriptomique code une  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP déshydratase. Le ratio d'expression (Fold Change, FC) est calculé selon la formule suivante :

$$FC = \frac{[ADNc \text{ gène d'intérêt}]}{[ADNc \text{ gène de référence}]}$$

### 3.2.6 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 (Chung et al., 1989). 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 1,5.10<sup>8</sup> cellules.ml<sup>-1</sup>. Le culot est repris délicatement par 0,1 ml d'une solution de TSS froide (PEG 3350 10 %, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 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  $\mu$ g de plasmide est ajouté aux cellules compétentes. Le mélange est laissé 30 min dans la glace, puis 900  $\mu$ l de LB sont ajoutés et la culture est incubée à 37°C pendant 1 h minimum pour permettre l'expression

13. Roche Applied Science

14. Roche

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  $\mu\text{l}$  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  $\Omega$ , capacité de 25  $\mu\text{Fd}$ , voltage de 12500  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ )<sup>15</sup>. 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.

### 3.2.7 Transduction généralisée avec le phage P1

Le stock de phages P1<sub>vir</sub> est réalisé en milieu liquide par infection de 5 ml de la souche donatrice cultivée à faible D.O<sub>600nm</sub>  $\approx 0,2$  en LB supplémenté en MgSO<sub>4</sub> 8 mM et CaCl<sub>2</sub> 4 mM avec 0,5 ml d'une dilution 10<sup>-2</sup> 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<sub>4</sub> 8 mM et CaCl<sub>2</sub> 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.

### 3.2.8 Mesure de la fréquence de mutation

Deux tests adaptés de ceux décrits par Touati sont réalisés pour mesurer les fréquences de mutation suite à un stress provoqué par les ions Ni<sup>2+</sup> (Touati et al., 1995). Deux cultures de 50 ml de milieu M63, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) etensemencé avec la souche sauvage *E. coli* W3110 sont réalisées. Ces cultures sont placées au bain-marie à 37 °C avec une agitation orbitale de 130 rpm jusqu'à obtention d'une D.O<sub>600nm</sub> de 0,3. Des stress de 10 min et de 30 min sont réalisés dans l'un des deux erlens avec 50 $\mu\text{M}$  final de NiCl<sub>2</sub>. 5ml de culture sont ensuite centrifugés 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Les culots bactériens sont repris avec 5ml de milieu M63. Les cultures sont ajustées pour obtenir une suspension à 10<sup>8</sup> cellules/mL. 100  $\mu\text{l}$  de cette suspension sont étalés sur des boîte G additionnées d'acide nalidixique à 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ou de rifampicine à 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pour chaque condition, 3 réplicats sont réalisés. En parallèle, les

15. appareil Biorad

cultures sont diluées en cascade et 100  $\mu\text{l}$  sont étalés sur boîte G pour réaliser le dénombrement exact de la suspension initiale. Les clones résistants aux antibiotiques sont dénombrés après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose.

### 3.2.9 Evaluation du niveau d'enroulement de l'ADN par migration sur gel de chloroquine

L'analyse du niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique a été réalisée sur un gel d'agarose 0,8 % contenant de la chloroquine à 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La chloroquine est un agent intercalant qui se fixe préférentiellement sur l'ADN relâché et provoque son étirement. Cet étirement de la molécule d'ADN va ralentir sa vitesse de migration. La migration électrophorétique a été effectuée dans une cuve de 20 cm de long contenant du tampon Tris-Borate EDTA (TBE) 1X pH 8,3 et également de la chloroquine à 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant 16 h à voltage constant (2,5 V/cm). La présence d'une quantité équivalente de chloroquine à la fois dans le gel d'agarose et dans le tampon de migration est nécessaire à la conservation d'un équilibre. Dans ces conditions, l'ADN superenroulé migre plus vite que l'ADN relâché. Après la migration électrophorétique, la chloroquine a été éliminée du gel d'agarose par des lavages successifs à l'eau distillée pendant 2 h toutes les 30 min puis pendant 3 h toutes les heures. Le gel d'agarose a été coloré pendant 30 min dans une solution de bromure d'éthidium (BrEt) à 1,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (V/V) puis décoloré pendant 15 min dans de l'eau distillée et finalement révélé sous la lumière UV. La répartition des topoisomères du plasmide permet d'estimer le niveau de surenroulement global de l'ADN.

### 3.2.10 Analyse transcriptomique par RNAseq

6 échantillons correspondant aux ARNs extraits de la souche W3110 avec ou sans stress nickel ont été séquencés par la plateforme de séquençage ProfileXpert-LCMT. Les ARNs ont subi un second contrôle qualité par un dosage Ribogreen sur Qubit® et Agilent 2100 Bioanalyser®. Les ARNs ribosomiaux sont éliminés à l'aide du kit Ribo-Zero™ Magnetic Gram Negative Bacteria à partir de 3 $\mu\text{g}$  de chaque échantillon. Puis la purification finale des ARN est réalisé avec le kit Zymo. Ensuite, des banques directionnelles indexées sont créées à partir de 50ng d'ARN déplétés à l'aide du kit Epicentre ScriptSeq™v2 RNAseq Library Preparation. Brièvement, le principe consiste à fragmenter les ARN puis de fixer des adaptateurs spécifiques aux deux extrémités. Puis ces ARN possédant les adaptateurs sont rétrotranscrits en ADN complémentaires double brin (ADNc). Ces ADNc sont ensuite amplifiés par 12 cycles PCR créant ainsi des ponts d'amplification. Les échantillons sont ensuite multipléxés et déposés sur une ligne de *Flow Cell* (v3). Un échantillon d'ADN du bactériophage PhiX a été ajouté comme contrôle à chaque échantillon à hauteur de 1% de la quantité d'ARNs totale. Le séquençage des échantillons a ensuite été réalisé sur un séquenceur HiSeq-2500 (Illumina) en *single read* de 50 cycles en kit v3 (51x7x0).

Le traitement des données brutes a été réalisé par la plateforme ProfileXpert. Une étape de démultiplexage a été réalisé à l'aide du logiciel CASAVA 1.8.2, pour reconstruire les séquences, et séparer les différents échantillons. Ensuite, l'alignement des séquences est effectué sur le génome de référence *E. coli* K12 *substr* W3110 en ayant au préalable réalisé une étape de

filtration permettant de ne récupérer que les séquences de bonne qualité (Passing Filter). Puis l'expression des gènes est calculée à l'aide du logiciel Cufflinks 2.0.2.

### 3.3 Méthodes biochimiques

#### 3.3.1 Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase

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 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  $30^{\circ}C$ . De 5 à 100  $\mu l$  d'extrait cellulaire sont ajoutés et le volume est complété à 900  $\mu l$  par du tampon Z ( $Na_2HPO_4$  60 mM;  $NaH_2PO_4$  40 mM; KCl 10 mM;  $MgSO_4$  1 mM;  $\beta$ -mercaptoéthanol 50 mM pH 7) (Bardonnnet and Blanco, 1992). La réaction est déclenchée par l'addition de 100  $\mu l$  de substrat ONPG à 4 mg/mL et la quantité de produit libéré coloré ONP est mesurée à 420 nm pour les dosages  $\beta$ -galactosidase. 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  $\epsilon$  de l'ONPG est de  $4500 M^{-1}.cm^{-1}$ . L'activité spécifique est exprimée en nmol d'ONP apparu. $min^{-1}.mg^{-1}$  de PSB.

#### 3.3.2 Dosage d'activité hydrogénase

L'activité hydrogénase peut être détectée visuellement par recherche de la réduction du BV<sup>16</sup> 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 :



16. Benzyl-Viologène

Le substrat benzyl viologène à 1 M est injecté à la seringue dans une cuve calibrée, remplie de tampon phosphate 100 mM saturé en  $H_2$ . 50 mM de dithionite de sodium  $Na_2S_2O_4$  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<sup>-1</sup>. L'activité spécifique est exprimée en  $\mu\text{mol}$  de BV réduit.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de PSB avec  $\epsilon = 7,4 \text{ mM.cm}^{-1}$ .

Une autre technique non quantitative, basé sur le même principe, a été utilisée pour mesurer l'activité hydrogénase. Une colonie des souches à tester sont patchés sur des boîtes de GL + glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) + BV, puis placé à 37°C en anaérobiose pendant 24h. Ensuite, les boîtes sont placées dans un sachet sous atmosphère hydrogène. Les colonies deviennent violettes si une activité hydrogénase est présente.

### 3.3.3 Cinétique de transport du nickel

#### Evaluation de l'efflux du Nickel

Ces manipulations visent à déterminer la concentration intracellulaire en ions nickel. Pour ce faire, l'isotope radioactif <sup>63</sup>Ni est utilisé. Celui-ci possède une demi-vie d'une centaine d'années et se caractérise par des émissions  $\beta^-$  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  $\mu\text{M}$  de  $NiSO_4$  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 5 min. Puis, 4 à 5  $\mu\text{M}$  de <sup>63</sup>NiCl<sub>2</sub> sont ajoutés et un aliquot de 100  $\mu\text{l}$  est filtré (0,45  $\mu\text{m}$ ) 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 OCS<sup>17</sup> et comptés au compteur à scintillation<sup>18</sup>. Les résultats sont exprimés en pmol de <sup>63</sup>Ni accumulé.mg<sup>-1</sup> PSB.

#### Evaluation de l'entrée du Nickel

Les cultures sont réalisées en BL en anaérobiose comme précédemment décrit pour induire le système *nik* 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 10mM de  $MgCl_2$  pour empêcher l'entrée du Ni par le transporteur du magnésium CorA. Les cellules sont placées à 30°C pendant 5 min. Puis, 150nM de <sup>63</sup>NiCl<sub>2</sub> sont ajoutés et un aliquot de 100  $\mu\text{l}$  est filtré (0,45  $\mu\text{m}$ ) 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

---

17. Amersham Biosciences

18. Packard

dépôt des bactéries. Les filtres sont ensuite séchés totalement puis plongés dans 5 ml de liquide scintillant OCS<sup>19</sup> et comptés au compteur à scintillation<sup>20</sup>. Les résultats sont exprimés en pmol de <sup>63</sup>Ni accumulé.mg<sup>-1</sup> PSB.

### 3.3.4 Séparation des protéines par électrophorèse

#### Electrophorèse dénaturante des protéines sur gel SDS-PAGE

Cette méthode, décrite par Laemmli (Laemmli, 1970), 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  $\beta$ -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 h<sup>21</sup>. 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 (Schagger and Jagow, 1987). 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.

### 3.3.5 Purification de la protéine RcnB

La purification de RcnBM86A est identique à celle de RcnB.

#### Surproduction de RcnB

Le gène *rcnB* cloné dans le vecteur de surexpression pET30<sup>22</sup> est placé sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7, la production de cette enzyme étant placée sous le contrôle de l'opérateur *lac* inductible par l'IPTG<sup>23</sup>. 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 DO<sub>600</sub>  $\approx$  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

19. Amersham Biosciences

20. Packard

21. appareil protean, Biorad

22. Novagen

23. isopropyl  $\beta$ -D thiogalactopyranoside



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 centrifugés (10 min, 10000 rpm, 4°C). Le surnageant est filtré à 0,45  $\mu\text{m}$  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 Phenyl<sup>24</sup> montée sur un appareil FPLC<sup>25</sup>. Le débit est maintenu constant à 1 ml.min<sup>-1</sup> pendant toute la chromatographie pour une pression de  $\approx$  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  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . L'échantillon est alors injecté puis élué par un gradient linéaire de 1,5 M à 0 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Pour plus d'efficacité de cette étape, l'élution 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  $\mu\text{l}$  + 4  $\mu\text{l}$  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 Biotech<sup>26</sup> 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  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

#### Chromatographie d'échange d'anions

La colonne utilisée est une Uno-Q1<sup>27</sup> montée sur le même appareil FPLC. Le débit est maintenu constant à 1 ml.min<sup>-1</sup> pendant tout le processus pour une pression de  $\approx$  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  $\mu\text{l}$  + 4  $\mu\text{l}$  de bleu de dépôt de chaque sur gel Tris-Tricine 15 %. La protéine RcnB n'a aucune affinité pour la colonne et est donc éluee 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.

### 3.3.6 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

---

24. GE Healthcare

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

26. Spectrumlabs

27. Biorad

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 effectué<sup>28</sup> 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<sup>ème</sup> au 1/10000<sup>ème</sup> 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<sup>ème</sup> 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 ECL<sup>29</sup>. Un substrat contenant du luminol est mis en contact avec la membrane ; une émission de lumière brève<sup>30</sup>, conséquence de l'oxydation du substrat par la peroxydase éventuellement présente sera détectée par exposition d'un film autoradiographique.

### 3.3.7 Mesure du pH intracellulaire

Afin de déterminer l'impact des métaux sur le pH intracellulaire bactérien une technique basée sur la sensibilité au pH de la GFP (Kneen et al., 1998) (Wilks and Slonczewski, 2007) a été mise en place. En effet, la sérine 65, la tyrosine 66 et la glycine 67, acides aminés composants le chromophore de la GFP peuvent être protonés en présence d'un pH acide modifiant ainsi la fluorescence de la protéine. Cette différence de fluorescence pouvant être mesurée avec un spectrofluoromètre.

#### Mesure du pH cytoplasmique

Pour mesurer le pH cytoplasmique, des souches sauvages ou mutantes contenant le plasmide pYFP ont été utilisées. Les cultures et précultures sont réalisées en milieu minimum, PIPES<sup>31</sup> 20mM, pH 7,5 complété par du glycérol 0,8% , de l'hydrolysate de caséine à 1,5% et de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) comme source de carbone. Les cellules sont cultivées à 37°C jusqu'à D.O<sub>600nm</sub> 0,8. A l'arrêt de la culture, 0,4 de D.O<sub>600nm</sub> de cellules sont réparties dans des microtubes. Les cellules sont centrifugées 2 min à 8000 rpm. Ensuite les culots sont repris avec 1mL de milieu de resuspension (M63, PIPES, glucose, glycérol, et de l'hydrolysate de caséine à différents pH (de 5 à 7,5). Les cellules sont laissées 30 min à température ambiante. La fluorescence est mesurée grâce à un lecteur de plaque Infinite®M200<sup>32</sup>. 200 µl d'échantillon sont déposés dans une plaque noire 96 puits à fond transparent (COSAR®). La GFP et la YFP émettent de la lumière à 550 nm lorsqu'elles sont excitées par une longueur d'onde de 505 nm à 30°C . Le gain a été fixé manuellement à 150 suite à une mise au point du protocole. La fluorescence est

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

31. acide 1,4-Piperazine-2- Ethanesulfonique

32. Tecan

mesurée durant 5 min, puis est rajouté 5  $\mu\text{l}$  de métaux  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  à 2,5 mM final ou 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{HCl}$  à 10mM pour les témoins.

### Mesure du pH périplasmique

Pour mesurer le pH du périplasma, des souches sauvages ou mutantes contenant le plasmide pRRGFP ont été utilisées. Ce plasmide contient le gène codant pour la GFP sous contrôle d'un promoteur ParaBAD inductible par l'arabinose. Une séquence signal tat a été fusionnée à ce gène permettant ainsi l'export de la GFP dans le périplasma. Les cultures et précultures sont réalisées en milieu minimum, PIPES 20mM pH 7,5, glycérol et de l'hydrolysate de caséine supplémenté par du glucose (2  $\text{g.l}^{-1}$ ) pour induire la répression catabolique. Les cellules sont cultivées à 37°C jusqu'à D.O<sub>600nm</sub> 0,8. Les cultures sont centrifugées 5 min à 5000 rpm et resuspendues dans le même milieu mais à la place du glucose, le milieu est supplémenté par 0,2% d'arabinose. L'induction va permettre la production de la GFP et son transport vers le périplasma pendant 1h à 30°C. La production est stoppée par l'ajout de rifampicine à une concentration finale de 150 $\mu\text{g/ml}$  durant 1h à 30°C. Cet antibiotique a pour cible l'ARN polymérase permettant ainsi la disparition de la GFP dans le cytoplasme. Afin de vérifier la bonne exportation de la GFP dans le périplasma, les cellules sont visualisées au microscope à épifluorescence.

### 3.3.8 Double hybride membranaire

**Principe** Pour étudier l'interaction entre RcnA et RcnB, la technique du double hybride membranaire chez la levure, SUS<sup>33</sup> a été mise en place. Cette technique développée par Stagljar est basée sur la capacité de reconstitution en protéine fonctionnelle de l'ubiquitine entre la partie N-terminale "Nub" avec la partie C-terminale "Cub" (Stagljar et al., 1998). NubG est un mutant dont l'affinité pour Cub est fortement diminuée. L'ubiquitine fonctionnelle est reconstituée seulement si NubG est à proximité de Cub et que les deux parties de protéines interagissent. L'ubiquitine fonctionnelle est ensuite reconnue par les protéases spécifiques de l'ubiquitine (USPs). Ce dernier va cliver le facteur de transcription PLV (protéine A-LexA-VP16) fusionné à la partie C-terminale Cub. Ce facteur de transcription va pouvoir activer les gènes rapporteurs (*lexA*, *HIS3* et *lacZ*). RcnB a été fusionnée au facteur NubG et la protéine RcnA au facteur Cub. L'activité  $\beta$ -galactosidase a été mesurée (voir 3.3.1).

**Souches, milieux et conditions de culture** Les souches de levures utilisées ont les génotypes suivant : THY.AP4 [*MATa ura3 leu2 lexA ::lacZ ::trp1 lexA ::HIS3 lexA ::ADE2*] et THY.AP5 [*MAT $\alpha$  URA3 leu2 trp1 his3 loxP ::ade2*]

Les levures sont cultivées dans du milieu riche YPG : Ce milieu nutritif est composé d'extrait de levure 10  $\text{g.l}^{-1}$ ; bactopeptone 10  $\text{g.l}^{-1}$  et glucose 20  $\text{g.l}^{-1}$ . Il peut être utilisé sous forme solide par addition d'agar à 2 % . Des milieux sélectifs ont été utilisés pour sélectionner les levures en fonction des auxotrophies des levures. Le milieu minimum W0 (0,7 % Yeast Nitrogen Base dépourvu d'acides aminés et 2% glucose) peut être supplémenté avec tous les acides aminés sauf

celui correspondant au marqueur du plasmide utilisé (uracile, histidine et leucine respectivement pour les milieux sélectifs -Ura, -His et -Leu -Trp).

Les cultures de levures sont effectuées à 28°C en milieu YPG ou milieu sélectif. Afin d'assurer une bonne croissance avec une bonne aération, les cultures réalisées en milieux liquides en erlenmeyer sont agitées à 180 rpm. L'ensemencement a été effectué à 0,001% à partir d'une préculture cultivée dans les mêmes conditions et ayant atteint la phase stationnaire.

**Construction des souches** Amorces utilisées :

MetYC-RcnA F : 5' acaagtttgtacaaaaaagcaggctctccaaccaccatgaccgaatttacaactct 3'

MetYC-RcnA R : 5' tccgccaccaccaaccactttgtacaagaaagctgggtatcgattatgcccatgaagc 3'

NubG -RcnB F : 5'-acaagtttgtacaaaaaagcaggctctccaaccaccatggcgggtcgaccaatacctc-3'

NubG -RcnB R : 5' acaagtttgtacaaaaaagcaggctctccaaccaccatggcgggttcgaccaatacctc 3'

Le gène *rcnA* est amplifié par PCR avec les amorces MetYC-RcnA F et MetYC-RcnA R puis le fragment d'ADN est purifié. Le vecteur pMetYCGate est digéré par les enzymes de restriction PstI et HindIII. De la même façon le gène *rcnB* est amplifié par PCR avec les amorces NubG-RcnBss F (*rcnB* sans séquence signal) et NubG -RcnB R. Les vecteurs pNXgate32-HA (pour la construction NubG-RcnB) et pXNgate3HA (pour la construction RcnB-NubG) sont digérés par les enzymes EcoRI et HindIII. Les clonages sont réalisés *in vivo* dans les souches THY.AP4 et THY.AP5 pour respectivement les gènes *rcnA* et *rcnB* par une transformation avec la méthode à l'acétate de lithium.

Brièvement, les levures sont cultivées pendant une nuit et récupérées à  $D.O_{600nm} = 1-2$ . Après un lavage à l'eau, les cellules sont remises en suspension dans un tampon lithium acétate (0,1 M) et Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA pH 8). L'équivalent de 1 de  $D.O_{600nm}$  de cellule est ensuite mélangé avec 2  $\mu$ g d'ADN plasmidique et 30  $\mu$ g d'ADN de sperme de saumon puis avec du tampon lithium acétate/TE/PEG (0, 1 lithium acétate, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA pH 8, Polyéthylène glycol 4000 40%). Le mélange est ensuite incubé 30 min à 30°C puis un choc thermique est appliqué 20 min à 42°C . Les cellules sont ensuite étalées sur milieu sélectif.

**Mise en évidence des interactions** Des cultures en phase stationnaire de croissance sont récoltées et remises en suspension dans du milieu YPG. Les souches THY.AP 4 (RcnA-Cub) ou (KAT1-Cub) et THY.AP5 (RcnB-Nub) ou (KAT1-Cub) sont croisées sur boîte YPD. Après 6-8 h à 28°C , les cellules diploïdes sont sélectionnées et incubées à 28°C pendant 2-3 jours. Pour les dosages de l'activité  $\beta$ -galactosidase, voir section 3.3.1.

Puis la mesure de la fluorescence est réalisées comme précédemment décrit.

## 3.4 Techniques biophysiques de caractérisation des biomolécules

### Spectroscopie UV-Visible

L'appareil utilisé pour étudier les interactions protéine/métal est un Nicolet Evolution 100<sup>34</sup>.

34. Thermo Scientific

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  $\mu\text{l}$  pour une concentration finale de 300  $\mu\text{M}$ . Les ions métalliques sont ajoutés équivalent par équivalent dans un volume n'excédant pas 1/100<sup>ème</sup> du volume final (1  $\mu\text{l}$ ) 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.

#### 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  $\mu\text{M}$ . Dans un premier temps, la longueur d'onde maximale d'excitation ( $\lambda_{max}$  exc) est déterminée en fixant arbitrairement la longueur d'onde d'émission ( $\lambda$  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  $\lambda_{max}$  exc. Pour RcnB,  $\lambda_{max}$  exc = 280 nm. Cette longueur d'onde correspond à l'excitation du résidu tryptophane<sup>35</sup> qui génère un signal beaucoup plus important que les autres acides aminés aromatiques. Cette valeur de  $\lambda_{max}$  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  $\lambda_{max}$  em. Pour RcnB,  $\lambda_{max}$  em = 319 nm. Toutes les mesures sont donc effectuées avec  $\lambda$  exc = 280 nm et  $\lambda$  em = 319 nm pour générer le meilleur signal possible. Ensuite, un excès de métal (100  $\mu\text{M}$  = 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  $\text{CuSO}_4$ . 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 (Gold et al., 2008). 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-TOF<sup>36</sup>. 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  $\mu\text{M}$  dans une solution d'ions  $\text{NH}_4^+$  20 mM. En conditions dénaturantes, 0,2 % d'acide formique sont ajoutés. Un spectre de masse est alors enregistré puis 10 équivalents d'ions  $\text{CuSO}_4$  sont ajoutés et un deuxième spectre est enregistré. Les spectres obtenus peuvent alors être traités puis superposés.

35. la séquence de RcnB mature possède 2 résidus W

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

## Dosage des métaux par ICP-MS

Le dosage par ICP-MS<sup>37</sup> permet de quantifier précisément les métaux présents dans un échantillon. Les cultures sont effectuées en M63 glucose en présence ou non de métaux en gros volumes (250 ml) pendant 16h à 37°C. Les bactéries sont récoltées par centrifugation puis lavées avec 10 mL de tampon phosphate ou 10 mL de tampon phosphate +EDTA. Le culot est ensuite lyophilisé pendant 24h et pesé avant d'être dissous dans 2 ml d'acide nitrique HNO<sub>3</sub> concentré. La minéralisation est effectuée pendant 16h à 80°C jusqu'à la dissolution complète des cellules. Les échantillons sont par la suite complétés à 7 ml par de l'eau ultrapure avant d'être analysés<sup>38</sup>. Une gamme de métaux purs est réalisée en parallèle. Tous les dosages sont effectués en triplicata. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de métaux.g<sup>-1</sup> de PSB<sup>39</sup>.

## 3.5 Motilité cellulaire

### 3.5.1 Test de motilité en boîte de "nage", test de swimming

La motilité bactérienne est estimée sur des boîtes de gélose molle (agar 0,2%) de milieu minimum supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) et de concentrations croissantes de nickel. 5 $\mu\text{l}$  de bactéries à D.O<sub>600nm</sub> = 0,6 sont déposés au centre des boîtes en piquant verticalement dans l'épaisseur de la gélose. Les diamètres des halos de nage sont mesurés après 48h d'incubation à 30°C en aérobiose.

### 3.5.2 Marquage et observation des flagelles

Le protocole de marquage et d'observation de flagelles est adapté selon les travaux de Turner (Turner et al., 2000). La souche d'*E. coli* HCB1737 portant une substitution d'une sérine en cystéine dans le gène *flhC* codant pour les filaments de flagelles est utilisée. Cet acide aminé possède un groupement thiol permettant la réaction avec l'Alexa Fluor® 488 C5 Maleimide<sup>40</sup> et entraîne ainsi la fluorescence des flagelles. Une culture est réalisée dans du milieu minimum supplémenté par du glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) de la leucine 0,4%, de l'histidine, 0,4% et de la thréonine 0,4%. La culture est réalisée à 30°C jusqu'à l'obtention d'une D.O<sub>600nm</sub> = 0,6. Les cellules sont centrifugées lentement à 1000 rpm pendant 10 minutes. 8 ml de surnageant sont retirés afin de ne récupérer que 2mL final. Ces 2 mL de cultures sont centrifugés dans des microtubes de 2 mL. Le culot est repris dans 2mL de tampon de motilité, MB (tampon phosphate 10mM à pH 7, EDTA 100  $\mu\text{M}$ , NaCl 67mM, Triton, 0,0001%) puis centrifugé 10 minutes à 1000 rpm. 3 lavages successifs sont réalisés. Après la troisième centrifugation, les cellules sont resuspendues dans 150 $\mu\text{l}$  de MB additionné de 10  $\mu\text{l}$  d'Alexa Fluor® 488 C5 Maleimide<sup>41</sup> à 5 mg/ml. Le tube est placé dans le noir et déposé sur une plateforme oscillante durant une heure à température ambiante. Puis les cellules sont centrifugées 10 minutes à 1000 rpm. Le culot est à nouveau resuspendu dans 1 ml de MB. Puis 2 autres lavages sont réalisés. Le dernier culot est repris

37. Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry

38. appareil ICP demandé la marque de l'appareil

39. parties par millions ou ppm

40. Life technologies

41. Life Technologie

avec 250 $\mu$ l de MB. Les cellules sont déposés dans de l'agarose à 0,3% afin de piéger les cellules. L'observation des flagelles est réalisée avec un microscope à épifluorescence Zeiss AxioSkop2.

## 3.6 Outils bioinformatiques

### 3.6.1 Alignements de séquences protéiques

Les séquences des protéines sont récupérées dans la base de données SWISSPROT<sup>42</sup>. En plus des séquences primaires des protéines, 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  $\epsilon$ . La recherche de protéines homologues a été effectuée grâce à l'algorithme BLAST<sup>43</sup> disponible en ligne sur le site du NCBI<sup>44</sup>. 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 ClustalW2<sup>45</sup> et le résultat est visualisé par le logiciel CLC viewer.

### 3.6.2 Prédiction de la topologie des protéines

Le serveur SignalP 3.0<sup>46</sup> 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.

### 3.6.3 Recherche de domaines protéiques

La recherche de domaines caractéristiques a été effectuée sur la séquence de RcnB grâce au serveur InterProScan<sup>47</sup>. Les domaines ainsi obtenus sont référencés dans la base de données Pfam<sup>48</sup>. L'interrogation de celle-ci permet de retrouver les bactéries possédant des protéines contenant ces domaines et potentiellement caractérisées.

### 3.6.4 Prédiction des structures secondaires

Les prédictions des structures secondaires des protéine YddA et YddA ont été réalisées avec les serveurs Psipred<sup>49</sup> et le serveur NPSA<sup>50</sup>, du pôle bioinformatique Lyonnais.

---

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

43. Basic Local Alignment Sequence Tool

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

45. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

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

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

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

49. <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

50. <https://npsa-prabi.ibcp.fr/>

# Troisième partie

## Résultats





# Chapitre 4

## Etude du système RcnAB et caractérisation de RcnB

L'introduction bibliographique de ce manuscrit s'est axé sur l'homéostasie métallique, phénomène essentiel aux micro-organismes pour contrôler la teneur intracellulaire en métaux (cf chapitre 2). Le principal mécanisme que les bactéries mettent en place pour lutter contre la toxicité des métaux, est la synthèse des systèmes d'efflux de cations. Chez *E. coli*, la pompe d'efflux RcnA permet la détoxification en ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  du cytoplasme. RcnA est une protéine de la membrane interne et l'expression du gène codant cette pompe est induite *in vivo* uniquement par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  (Rodrigue et al., 2005) (Iwig et al., 2006). Le métallo-régulateur RcnR réprime l'expression de *rcnA* ainsi que sa propre expression, puisque ce dernier est orienté en sens inverse du gène *rcnA* (Iwig et al., 2006) (Blaha et al., 2011). Un troisième partenaire intervenant dans l'homéostasie du nickel a été décrit. RcnB est une protéine périplasmique essentielle au contrôle de la teneur intracellulaire en ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  (Blériot et al., 2011).

### 4.1 Modulation de l'efflux des ions $\text{Ni}^{2+}$ et $\text{Co}^{2+}$ : hypothèse de l'interaction entre RcnA et RcnB

Les études effectuées précédemment au laboratoire ont révélées que RcnB et RcnA intervenaient dans l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ . Les expériences de transport d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  et de détermination de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) suggèrent que ces derniers traversent la membrane interne par l'intermédiaire de la pompe RcnA et que RcnB participe à ce transport en modulant cet efflux [Figure 18]. Cela suggère une interaction entre RcnA et RcnB, et que cette interaction est dépendante de la concentration intracellulaire en ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  [Figure 21].

En cas de faible concentration en ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  dans le cytoplasme, RcnB interagirait avec RcnA mettant le système d'efflux en mode "off". Au contraire, lors d'un stress métallique, les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  étant en quantité trop importante, RcnB se décrocherait de RcnA laissant passer les ions à travers la pompe (mode "on"). Le cytoplasme serait alors détoxiqué de l'excès de métaux expliquant ainsi le phénotype de résistance aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  du mutant  $\Delta rcnB$ .

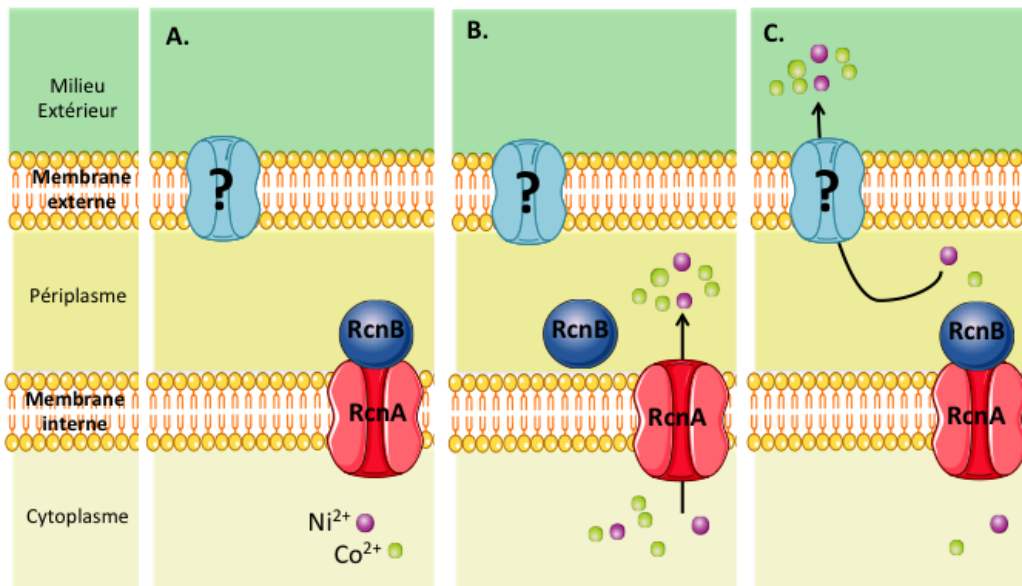


Figure 21 – Le système RcnAB dans le contrôle de l'homéostasie des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  : Hypothèse de l'interaction entre RcnA et RcnB dans la modulation de l'efflux des ions.

**A.** Quand les concentrations intracellulaires en  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  sont faibles, RcnB viendrait bloquer l'efflux en interagissant avec la pompe RcnA (mode "off"). **B.** En présence d'une forte concentration en ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ , RcnB se décrocherait laissant ainsi les ions traverser la membrane interne (mode "on"). **C.** Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  seraient ensuite efflués dans le milieu extérieur par un transporteur inconnu à l'heure actuelle.

Afin de valider ce modèle, nous avons initié une approche de double hybride membranaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette technique appelée SUS pour Split Ubiquitin System a été développée par (Stagljar et al., 1998). Elle est basée sur la capacité de reconstitution en protéine fonctionnelle de l'ubiquitine entre la partie N-terminale "Nub" avec la partie C-terminale "Cub". NubG est un mutant dont l'affinité pour Cub est fortement diminuée. L'ubiquitine fonctionnelle est reconstituée seulement si NubG est à proximité de Cub et que les deux parties de protéines interagissent. L'ubiquitine fonctionnelle est ensuite reconnue par les protéases spécifiques de l'ubiquitine (USPs). Ces protéases vont cliver le facteur de transcription PLV (protéine A-LexA-VP16) fusionné à la partie C-terminale Cub. Ce facteur de transcription va pouvoir activer le gène rapporteur *lacZ*. RcnB a été fusionnée au facteur NubG et la protéine RcnA au facteur Cub. KAT1, transporteur de cations  $\text{K}^+$  chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, est une protéine qui a la capacité de se dimériser. Une protéine KAT1 est fusionnée au facteur Cub mais également au facteur NubG. Ces fusions serviront de témoins positifs. L'activité  $\beta$ -galactosidase a été mesurée pour toutes les combinaisons de fusions.

Les fusions témoins, numéro 2 à 8 [Figure 22] présentent une activité enzymatique de base entre 0 et 5 nmol d'ONP libéré, comme attendu. Lorsque l'activité enzymatique est mesurée pour le témoin positif (KAT1-Cub/KAT1-Nub), une augmentation par 5 est observée par rap-

port à l'activité de base des témoins négatifs. Une activité enzymatique de même grandeur est mesurée lorsque les fusions RcnA-Cub et RcnB-NubG sont exprimées. Cela suggère que RcnA et RcnB interagissent.

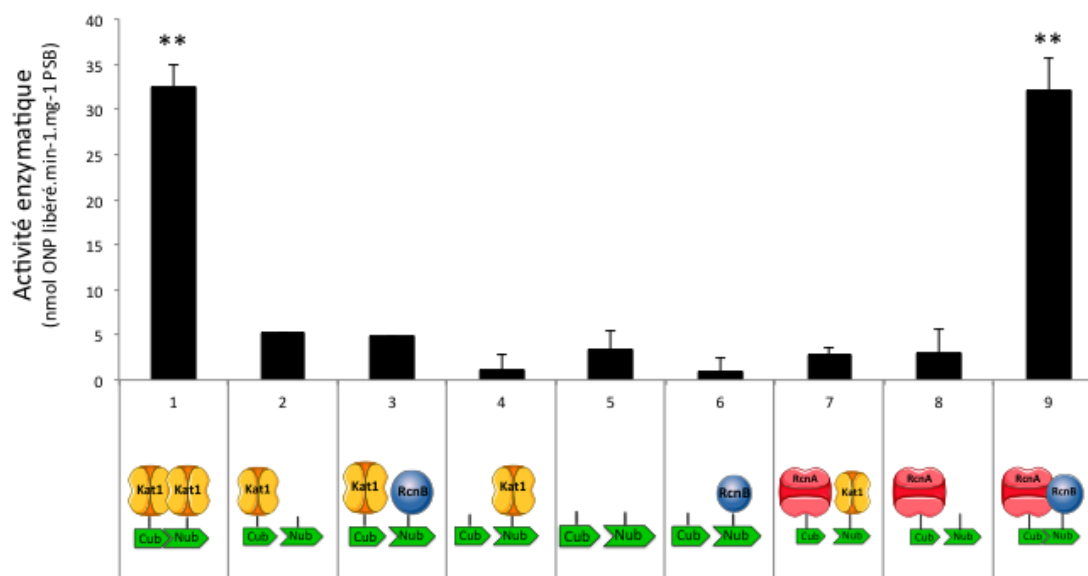


Figure 22 – Mise en évidence de l'interaction entre RcnA et RcnB par la technique du double hybride

Les cultures sont effectuées dans un milieu minimum en présence des acides aminés permettant la croissance des souches jusqu'à  $D.O_{600nm}=1$ . Les activités enzymatiques de la  $\beta$ -galactosidase des différentes combinaisons de fusions sont dosées. Les résultats sont exprimés en activité spécifique (nmol ONP libéré.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> PSB). La moyenne ainsi que l'écart type de trois réplicats sont représentés. (Test de Student, \*\* = valeur de  $p < 0,01$ . Les valeurs des fusions 1 et 9 sont comparées aux valeurs des fusions 2 à 8)

Ensuite, nous avons testé si la présence des ions  $Ni^{2+}$  modifiait l'interaction entre RcnA et RcnB. Par ailleurs, nous avons montré dans la suite de ce chapitre que RcnB fixait des ions  $Cu^{2+}$  (cf section 4.2). L'impact des ions  $Cu^{2+}$  sur l'interaction entre la pompe d'efflux et la protéine périplasmique a également été testé. Pour la fusion KAT1-Cub/KAT1-Nub, la présence des ions  $Cu^{2+}$  diminue l'activité enzymatique de manière significative. Cette construction témoin est sensible aux ions  $Cu^{2+}$ . Toutefois, lorsque les activités enzymatiques sont mesurées pour la fusion RcnA-Cub/ RcnB-NubG, aucune différence entre la condition sans métaux et la présence d'ions  $Ni^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  n'est observée. Le modèle levure utilisé ne nous permet pas de conclure quant aux rôles des ions Ni et Cu dans l'interaction entre RcnA et RcnB.

Ces résultats sont cohérents pour une interaction entre RcnA et RcnB. L'une des difficultés majeures de ces travaux est la protéine membranaire RcnA. En effet, sa surproduction et sa purification sont compliquées en raison de sa nature hautement hydrophobe. Néanmoins, d'autres techniques permettent de vérifier notre hypothèse. Nous avons initié une approche par BiFC<sup>1</sup>. Cependant aucun résultat n'est disponible à l'heure actuelle. Afin de compléter les deux techniques *in vivo*, une technique *in vitro* de réticulation chimique est envisagé.

Le rôle de RcnA comme pompe d'efflux est une hypothèse relativement acquise nécessitant

1. BiMolecular Fluorescence Complementation

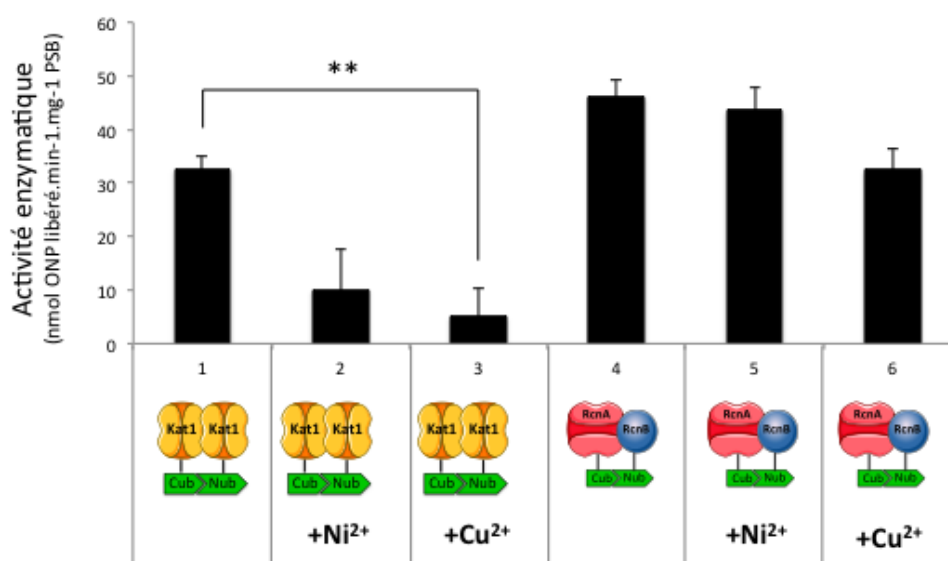


Figure 23 – La présence d’ions métalliques n’impacte pas l’interaction entre RcnA et RcnB

Les cultures sont effectuées dans un milieu minimum en présence des acides aminés permettant la croissance des souches jusqu’à  $D.O_{600nm}=1$  en présence ou non d’ions  $Ni^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  à  $200 \mu M$ . Les activités enzymatiques sont dosées et les résultats sont exprimés en activité spécifique (nmol ONP libéré.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> PSB). La moyenne ainsi que l’écart type de trois réplicats sont représentés (Test de Student, \*\* = valeur de  $p < 0,01$ ).

toutefois une caractérisation plus approfondie. La suite de ces travaux se sont focalisés sur la compréhension du rôle exact de RcnB et de sa caractérisation biochimique et fonctionnelle car cet élément est très intrigant.

## 4.2 RcnB fixe du cuivre

Afin de mieux comprendre la fonction de RcnB dans l’efflux des ions, l’hypothèse d’une interaction avec les ions  $Ni^{2+}$  et/ou les ions  $Co^{2+}$  a été posée. Pour répondre à cela, il a été réalisé des expériences de spectroscopie de fluorescence en collaboration avec le CEA de Cadarache. Brièvement, le principe de cette technique repose sur la capacité de fluorescence de la protéine RcnB. RcnB possède deux résidus tryptophane qui émettent de la fluorescence lorsqu’ils sont excités à une longueur d’onde  $\lambda = 280nm$ . Lors de la fixation du métal par la protéine, les environnements des tryptophanes seront modifiés et une variation de fluorescence sera mesurée. En présence d’ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  en excès, les spectres d’émission de fluorescence ne varient pas, comparés à la condition sans métaux<sup>2</sup>. Cependant lorsque les ions  $Cu^{2+}$  sont ajoutés, une extinction de la fluorescence est observée. Les ions  $Cu^{2+}$  modifient donc l’environnement d’au moins un résidu tryptophane, ce qui suggère une interaction entre la protéine RcnB et les ions  $Cu^{2+}$  *in vitro* [Figure 24 A].

2. données non montrées

Pour approfondir la caractérisation de l'interaction RcnB-Cu, une expérience de spectrométrie de masse a été réalisée. Un spectre de la protéine purifiée a été enregistré en absence ou en présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  en condition native [Figure 24 B]. Le pic en absence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  correspond à une masse de 9826 Da. En présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$ , le pic représente une masse de 9889 Da. La différence de masse entre les deux mesures est de 63 Da. Elle coïncide parfaitement à la masse d'un atome de cuivre. Il en est déduit que RcnB fixe un atome de cuivre par monomère.

Enfin, pour déterminer la constante de dissociation entre RcnB et l'ion  $\text{Cu}^{2+}$ , la technique de titration calorimétrique isotherme a été employée. Cette technique est basée sur la mesure des variations d'enthalpie lors d'une interaction entre une protéine et son ligand. La figure 24 C représente la titration de RcnB avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$ . Le  $K_D$  de cette interaction est de  $1,8 \mu\text{M}$  (+/-0,8) et la stoechiométrie est de 0,81 (+/- 0,01).

Pour conclure RcnB fixe un atome de cuivre par monomère avec une affinité de l'ordre du micromolaire.

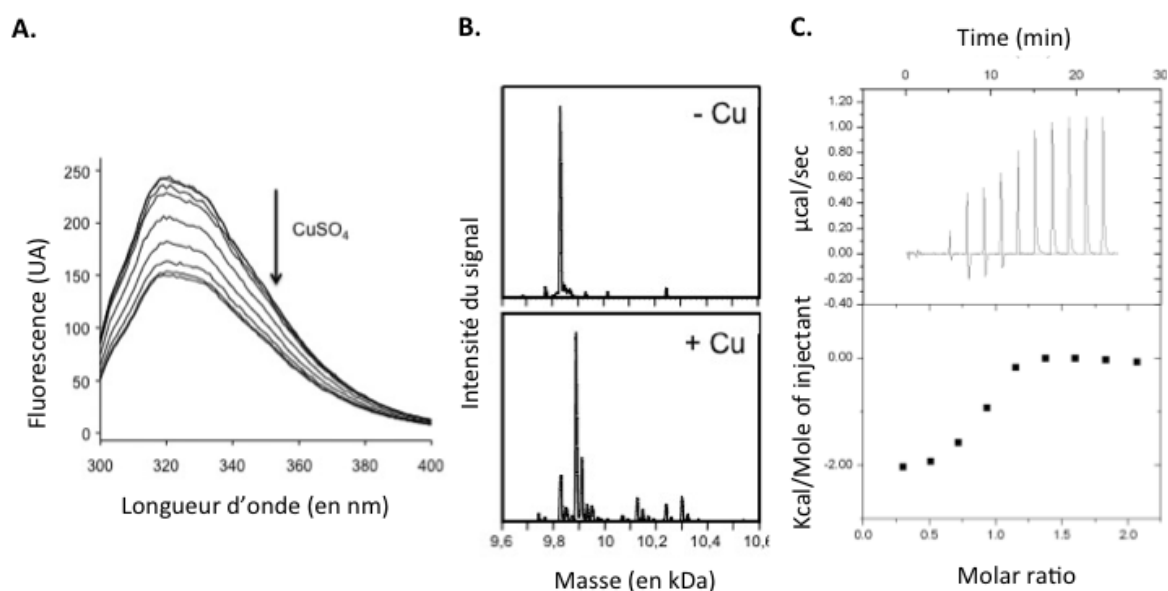


Figure 24 – RcnB fixe du cuivre

**A.** Spectre d'émission de fluorescence mesuré à température ambiante en augmentant les concentrations de  $\text{CuSO}_4$ . La protéine RcnB est diluée dans du tampon Bis Tris Propane 100 mM pH 6 à une concentration finale de  $5 \mu\text{M}$ . **B.** Spectre de masse de la protéine RcnB pure ( $5 \mu\text{M}$  dans solution de  $\text{NH}_4^+$ , 20 mM) sans et avec 10 équivalents de  $\text{CuSO}_4$ . **C.** Titration calorimétrique isotherme de RcnB par le  $\text{CuSO}_4$ . Le panneau du haut montre le thermogramme et le panneau du bas, la chaleur dégagée en fonction du ratio cuivre/ RcnB correspondant au titrage obtenu au dessus. Les mesures ont été réalisées à  $30^\circ\text{C}$  dans 10 mM de tampon Pipes pH 7, en présence de  $150 \mu\text{M}$  de RcnB et de 1,5 mM de  $\text{CuSO}_4$ .

### 4.3 Le cuivre agit sur la stabilité de RcnB

La suite de ces travaux a consisté en la caractérisation de l'impact des ions Cu sur la structuration de RcnB. Pour cela, il a été réalisé une analyse de dichroïsme circulaire de la protéine RcnB en condition native. Les résultats montrent un spectre avec un pic positif à 230

nm probablement dû à des résidus aromatiques et un pic négatif autour de 210 nm [Figure 25 A]. Une déconvolution des spectres par bioinformatique prédit que *RcnB* contient 36% de feuillets  $\beta$  mais possède peu de structures en hélice  $\alpha$ . Lorsque *RcnB* est chauffée à 90°C puis renaturée à 25°C, un spectre similaire à la condition non dénaturante est observé. Ce processus est donc réversible. Des dénaturations thermiques sont alors réalisées en présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  [Figure 25 B]. En présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ , le processus de dénaturation/renaturation est similaire à celui obtenu pour la protéine seule. Au contraire, le spectre correspondant à *RcnB* en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  après dénaturation est différent que celui de la protéine seule. Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  ont donc un impact sur la stabilité de la protéine *RcnB*.

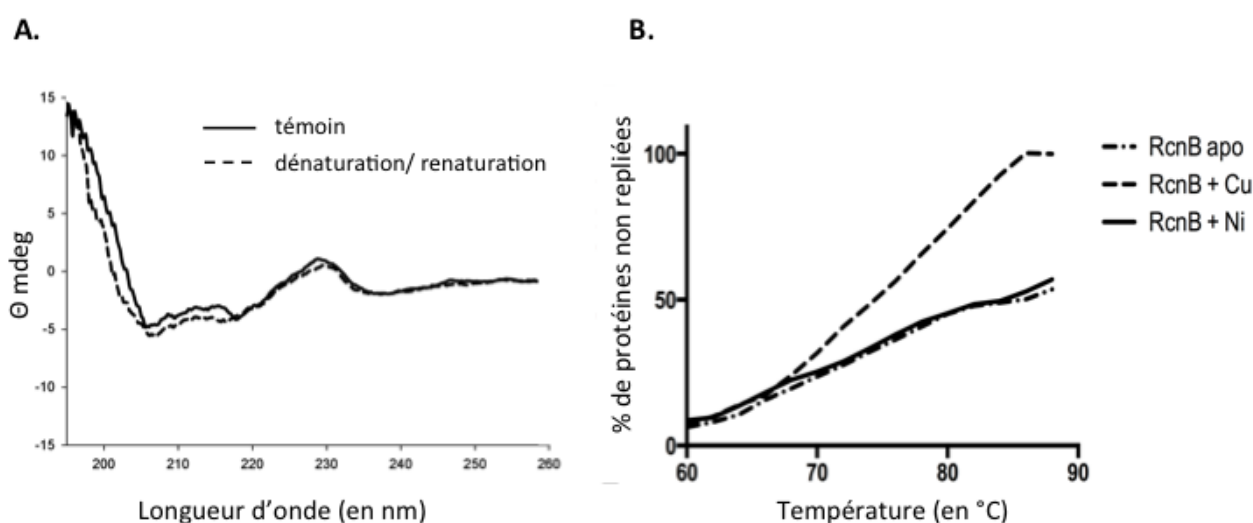


Figure 25 – Le Cu stabilise *RcnB*

**A.** Spectres de dichroïsme circulaire de la protéine *RcnB*. Le spectre est réalisé à 25°C dans une cuve droite de 1cm. La protéine est diluée à 25  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7. La courbe pleine correspond au spectre de *RcnB* avant la dénaturation et la courbe en pointillés correspond au spectre de la protéine après dénaturation à 90 °C **B.** Dénaturation thermique de la protéine *RcnB*-apo (trait mixte), *RcnB* +  $\text{Ni}^{2+}$  (trait plein) , *RcnB* +  $\text{Cu}^{2+}$  (trait en pointillés). Les spectres de dichroïsme circulaire pour l'estimation des structures secondaires de *RcnB* ont été effectués à 220 nm.

*RcnB* fixe les ions  $\text{Cu}^{2+}$  à raison d'un atome de cuivre par monomère avec une affinité de l'ordre du micromolaire. Cet atome de cuivre a un impact sur la stabilité de la protéine. La question suivante a été de savoir si *RcnB* était impliquée dans l'homéostasie du cuivre

#### 4.4 La fixation du cuivre a un rôle physiologique

La caractérisation biochimique de *RcnB* a révélé que cette dernière fixait des ions  $\text{Cu}^{2+}$  *in vitro*. La fixation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  par *RcnB* a-t-elle une incidence sur la résistance d'*E. coli* aux ions  $\text{Cu}^{2+}$ ? Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les profils de résistance aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  chez le mutant  $\Delta rcnB$  comparé à la souche sauvage, complémenté ou non par un plasmide contenant le gène *rcnB* [Figure 26]. Le mutant  $\Delta rcnB$  et le mutant  $\Delta rcnB$  complémenté par le plasmide vide sont aussi sensibles que la souche sauvage sur un milieu minimum gélosé

additionné de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . Quand le mutant  $\Delta rcnB$  est complété par le plasmide multicopies portant le gène *rcnB*, une résistance accrue aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  est visualisée. Ces résultats sont similaires en anaérobiose comme en aérobie avec une toxicité légèrement plus importante en anaérobiose comme observé dans une précédente étude (Outten et al., 2001b). Le mutant  $\Delta rcnB$  n'est pas plus sensible aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  que la souche sauvage mais la surexpression de la protéine RcnB augmente significativement la résistance aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  ce qui montre que RcnB est capable de fixer les ions  $\text{Cu}^{2+}$  *in vivo*. La résistance accrue en cas de surexpression de RcnB s'expliquerait par une détoxification du périplasme des ions  $\text{Cu}^{2+}$ .

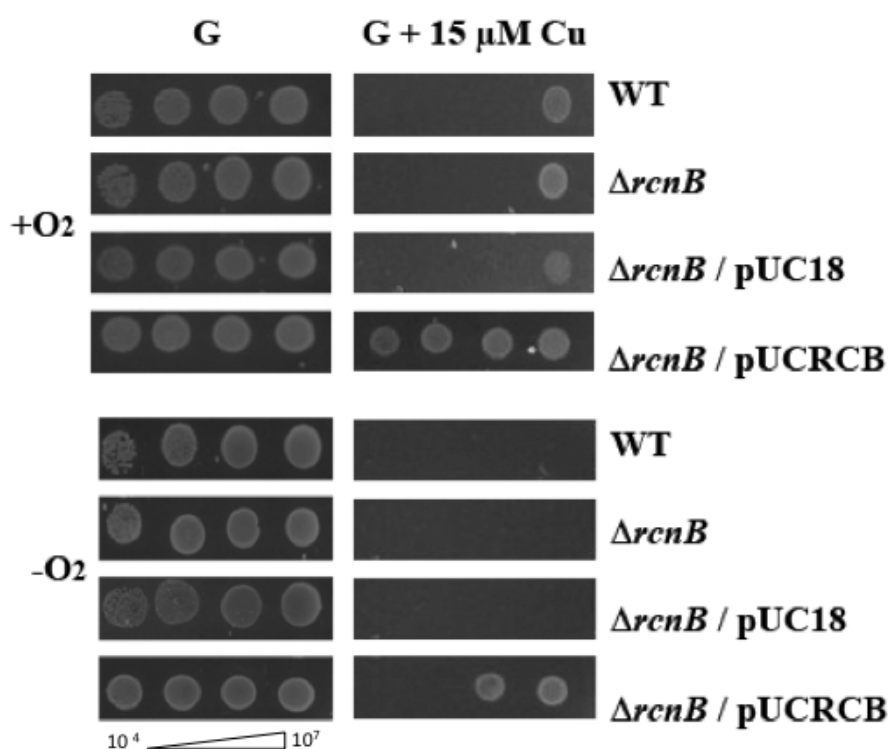


Figure 26 – Rôle physiologique de la fixation du Cu par RcnB

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum M63, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobie à 37 °C jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $D_{O_{600nm}} = 0,6$ ). Les cultures sont ensuite diluées en cascades de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  dans du milieu M63. 5  $\mu\text{l}$  des dilutions contenant de  $10^4$  à  $10^7$  bactéries/mL sont déposés sur boîte de milieu minimum supplémenté ou non par 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C en aérobie de 24 à 48 h (haut) et de 48 à 72 h en anaérobiose (bas).

## 4.5 RcnB n'est pas impliquée directement dans l'homéostasie du cuivre

Pour comprendre le mode d'action de RcnB, nous avons étudié le mutant  $\Delta rcnB$  et les mutants pour les autres systèmes de résistance impliqués dans l'homéostasie du cuivre. En effet, l'absence de sensibilité accrue au cuivre du mutant  $\Delta rcnB$  pourrait être liée à la redondance des systèmes de détoxification du cuivre chez *E. coli* qui compenseraient.



Le premier système étudié est le système *cus* car celui-ci possède une protéine périplasmique soluble CusF, de 10 kDa qui a la capacité de fixer des ions  $\text{Cu}^{2+}$  (Franke et al., 2003). Cette protéine appartient à un système d'efflux de type RND<sup>3</sup> composé de trois autres protéines CusCBA, permettant l'export des ions  $\text{Cu}^{2+}$  du cytoplasme vers le milieu extérieur (cf section 2.2). Le système *cus* s'exprime d'avantage en anaérobiose. C'est pourquoi les profils de résistance des mutants  $\Delta rcnB$ ,  $\Delta cusF$  et du double mutant  $\Delta rcnB\Delta cusF$  sont analysés sur boîtes gélosées supplémentées de 2  $\mu\text{M}$  de Cu en anaérobiose [Figure 27A]. Les résultats montrent de façon attendue que le mutant  $\Delta cusF$  est plus sensible que la souche sauvage. Cependant le double mutant  $\Delta rcnB\Delta cusF$  n'est pas plus sensible aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  que le simple mutant  $\Delta cusF$ . RcnB est donc une protéine périplasmique soluble fixant du cuivre comme la protéine CusF, mais ces deux protéines n'ont pas la même fonction.

Un autre système permet de détoxiquer le périplasma, il s'agit de l'oxydase à multi-cuivre, CueO, qui oxyde l'ion  $\text{Cu}^+$  en une forme moins toxique  $\text{Cu}^{2+}$ . De la même façon que pour les mutants  $\Delta cusF$  et  $\Delta cusF\Delta rcnB$ , les profils de résistance des mutants  $\Delta rcnB$ ,  $\Delta cueO$  et du double mutant  $\Delta rcnB\Delta cueO$  sont analysés en milieu liquide en présence d'une concentration croissante en ions  $\text{Cu}^{2+}$  [Figure 27C]. Les résultats montrent de façon attendue que le mutant  $\Delta cueO$  est plus sensible que la souche sauvage. Cependant le double mutant  $\Delta rcnB\Delta cueO$  n'est pas plus sensible aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  que le simple mutant  $\Delta cueO$ .

De plus, l'analyse des profils de résistance du mutant  $\Delta cueO$  et du mutant  $\Delta cueO$  complé-  
té par le plasmide multi-copies contenant le gène *rcnB* est réalisée [Figure 27B]. En présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$ , aucune dilution testée ne permet la croissance du mutant  $\Delta cueO$ . Par contre, la présence du gène *rcnB* sur le plasmide multi-copies restaure le phénotype de résistance aux ions  $\text{Cu}^{2+}$ . Une étude précédente a montré que le gène *cueO* était induit en présence d'ions  $\text{Ag}^{2+}$  (Stoyanov and Brown, 2003). Nous confirmons que le mutant  $\Delta cueO$  est bien sensible aux ions  $\text{Ag}^{2+}$  comparé à la souche sauvage. Cependant la complémentation du mutant  $\Delta cueO$  par le plasmide à haut nombre de copies pUCRCB, ne restaure pas le phénotype de la souche sauvage pour les ions  $\text{Ag}^{2+}$  contrairement aux ions  $\text{Cu}^{2+}$ . La réponse de RcnB est bien spécifique du cuivre.

Pour compléter les résultats précédents dans la compréhension du rôle de RcnB, nous avons entrepris d'analyser les profils d'expression du gène *rcnB* par RT-PCR [Figure 27D]. Les extractions des ARNs ont été réalisées à partir de cultures d'*E. coli* en BL supplémentées avec des ions  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ . Puis ces ARNs ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires. Les expressions des gènes *rcnB*, *cusF* et *cueO* sont analysés par PCR [Figure 27D]. Pour le gène *rcnB*, des oligonucléotides internes et externes à l'ORF<sup>4</sup> ont été utilisés. Lorsque les oligonucléotides sont dessinés à l'extérieur de *rcnB*, ce dernier est transcrit seulement en présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  dans le milieu. Au contraire, l'utilisation des oligonucléotides dessinés à l'intérieur, montre que le gène *rcnB* est transcrit dans toutes les conditions, suggérant une expression constitutive. Il avait été montré précédemment que le gène *rcnB* était co-transcrit avec *rcnA* grâce à un promoteur commun. Ces résultats suggèrent donc qu'il pourrait y avoir un promoteur intermédiaire dans la région intergénique de 200 paires de bases entre la fin du

3. Resistance-Nodulation cell-Division

4. Open-Reading Frame

gène de *rcnA* et le début du gène de *rcnB*. Au contraire, l'expression du gène *cusF* est détectée seulement lorsque la culture en BL est supplémentée avec du cuivre [Figure 27D]. L'expression du gène *cueO* est légèrement détectée dans toutes les conditions testées mais plus fortement quand les cultures sont supplémentées en cuivre. La transcription du gène *rcnB* n'est donc pas induite par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  à l'inverse des gènes *cusF* et *cueO*.

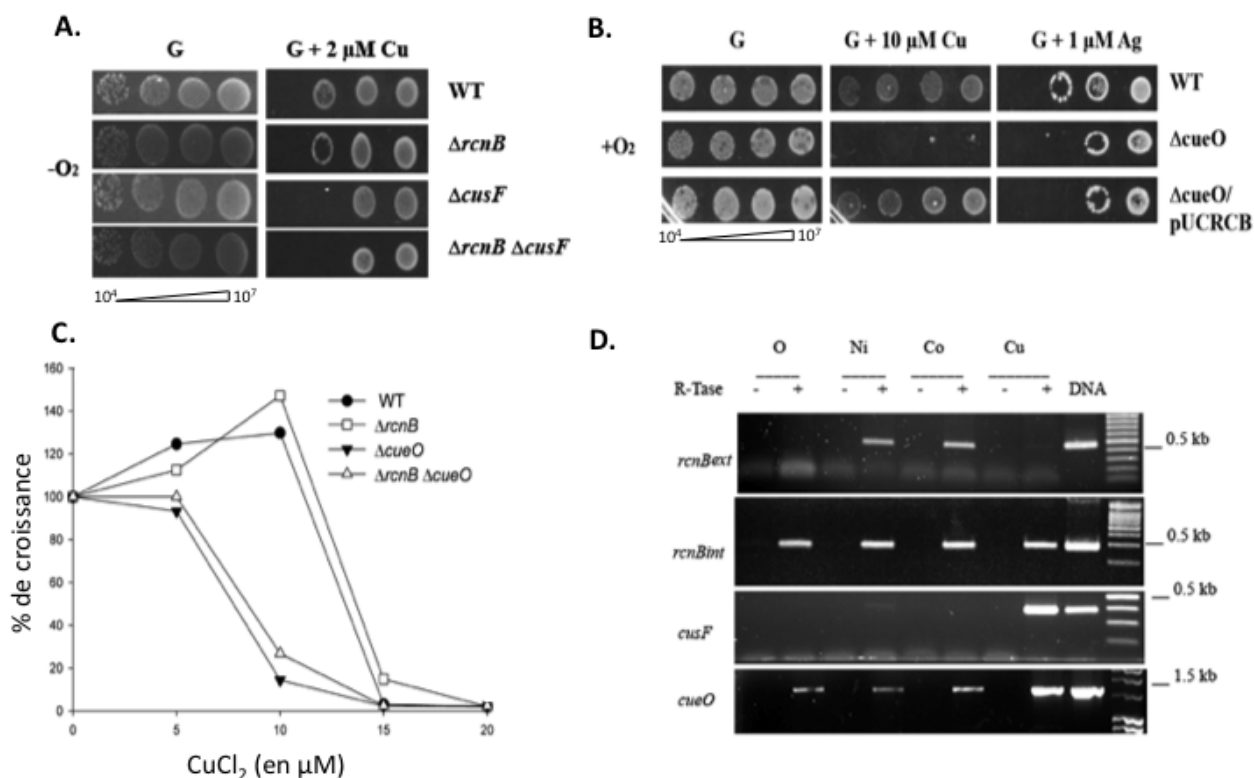


Figure 27 – *RcnB* n'est pas directement impliquée dans l'homéostasie du Cu

**A. et B.** Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $\text{D.O}_{600nm} = 0,6$ ). Les cultures sont ensuite diluées en cascades de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  dans du milieu M63.  $5 \mu\text{l}$  des dilutions contenant de  $10^4$  à  $10^7$  bactéries/mL sont déposés sur boîte de milieu minimum supplémenté ou non par  $2 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  (A) et  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  et  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{AgSO}_4$  (B). Les boîtes sont ensuite incubées à  $37^\circ\text{C}$  de 48 à 72 h en anaérobiose (A) et de 24 à 48 h en aérobie (B). **C.** Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum liquide, supplémenté de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à  $37^\circ\text{C}$  avec des concentrations croissantes de  $\text{CuSO}_4$  pendant 16h. Les  $\text{D.O}_{600nm}$  sont ensuite mesurées. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métaux. Une expérience représentative est présentée. **D.** Les ARNs totaux de la souche sauvage W3110 sont extraits à partir d'une culture en milieu BL sans ou avec des concentrations subinhibitives de  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$  ou  $\text{CuSO}_4$ . Les ARNs sont amplifiés sans (RTase-) ou avec (RTase+) une étape de transcription inverse. Les amplifications sont réalisées en utilisant des oligonucléotides spécifiques des gènes *rcnB*, *cusF* et *cueO* dont les séquences sont répertoriées dans la table 3 des annexes. Un gel d'agarose représentatif est présenté.

L'ensemble de ces résultats montre que *RcnB* fixe le cuivre mais que cette protéine n'intervient pas dans l'homéostasie de ce métal. La question suivante est donc de savoir quelle est la fonction exacte de la fixation du cuivre. Pour cela nous avons muté la protéine *RcnB* de façon

à abolir la fixation des ions  $\text{Cu}^{2+}$ .

## 4.6 Le mutant RcnBM<sub>86</sub>A, déficient pour la fixation du cuivre, affecte l'homéostasie du $\text{Ni}^{2+}$ et du $\text{Co}^{2+}$

Les expériences précédentes de spectrofluorescence [Figure 24 A] de la protéine RcnB additionnée d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  montrent clairement que l'un des deux résidus tryptophane de RcnB est proche du site de fixation du cuivre. L'alignement de séquences homologues de RcnB souligne un motif conservé chez les entérobactéries de type : H82W83XXM86. Les résidus histidine et méthionine sont connus pour être des ligands des ions  $\text{Cu}^{2+}$ . C'est pourquoi, il a été construit, par mutagenèse dirigée, les mutants H82 et M86 substitués par une alanine. Les protéines mutantes ont été surexprimées et purifiées par le même protocole utilisé pour la protéine RcnB sauvage développé précédemment au laboratoire. La protéine mutante RcnBH82A est instable, se dégrade et par conséquent sa purification et son analyse n'ont pu être réalisées. Une analyse par spectroscopie UV-visible a été entreprise en comparant la protéine RcnB sauvage et le mutant M86A.

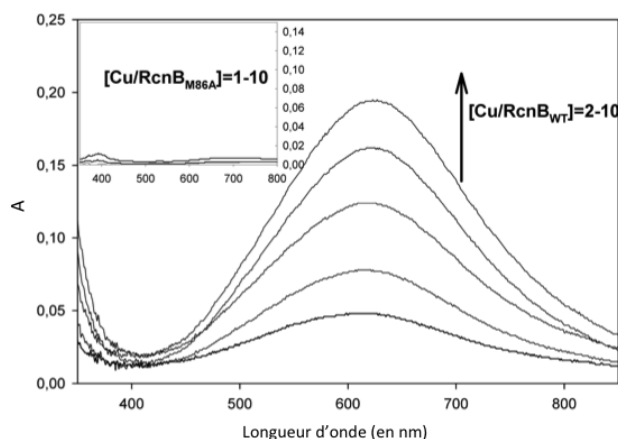


Figure 28 – La méthionine 86 est impliquée dans la fixation du cuivre

Spectres d'absorption UV-visible de RcnB et de RcnBM86A respectivement à 130  $\mu\text{M}$  et 80  $\mu\text{M}$  en présence de concentration croissante de  $\text{CuSO}_4$ . Les mesures sont réalisées à 25 °C dans du tampon Tris HCl 50 mM, pH 7. Les résultats sont présentés sous forme de spectres de différence, le spectre correspondant à la condition sans métal étant soustrait de celui enregistré en présence de métal.

Cette technique permet d'enregistrer des spectres mettant en évidence des bandes d'absorption résultant d'une interaction entre une protéine et son ligand. Un spectre de la forme apo de la protéine RcnB sauvage a tout d'abord été réalisé [Figure 28]. Puis des concentrations croissantes en ions  $\text{Cu}^{2+}$  (10 équivalents) ont été additionnées dans la cuve de mesure. On observe une augmentation d'absorbance à 610 nm résultant d'une interaction entre RcnB-Apo et les ions  $\text{Cu}^{2+}$ . Ces résultats confirment ceux obtenus par spectrofluorescence [Figure 24 A].

Lorsque l'on réalise la même expérience pour la protéine RcnBM86A, les spectres ne diffèrent pas de la protéine RcnBM86A-*apo*. Ceci suggère que le site de fixation impliquant la méthionine 86 a disparu et que le mutant perd sa capacité à fixer les ions  $\text{Cu}^{2+}$ .

Nous avons mis en évidence que la méthionine 86 était importante pour la fixation du cuivre par RcnB. Nous nous sommes ensuite demandés si la perte de cette fixation impactait la fonction physiologique de RcnB dans la modulation de l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ .

Le mutant RcnBM86A a été caractérisé en mesurant sa sensibilité aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ . Les profils de résistance de la souche sauvage et du double mutant  $\Delta rcnAB$ , complémentés par le vecteur vide, les gènes *rcnAB* et *rcnABM86A*, sont analysés sur boîtes gélosées supplémentées de  $40\mu\text{M}$  de  $\text{Ni}^{2+}$  ou  $15\mu\text{M}$  de  $\text{Co}^{2+}$  [Figure 29A] et en milieu liquide en présence de concentrations croissantes d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  [Figure 29B].

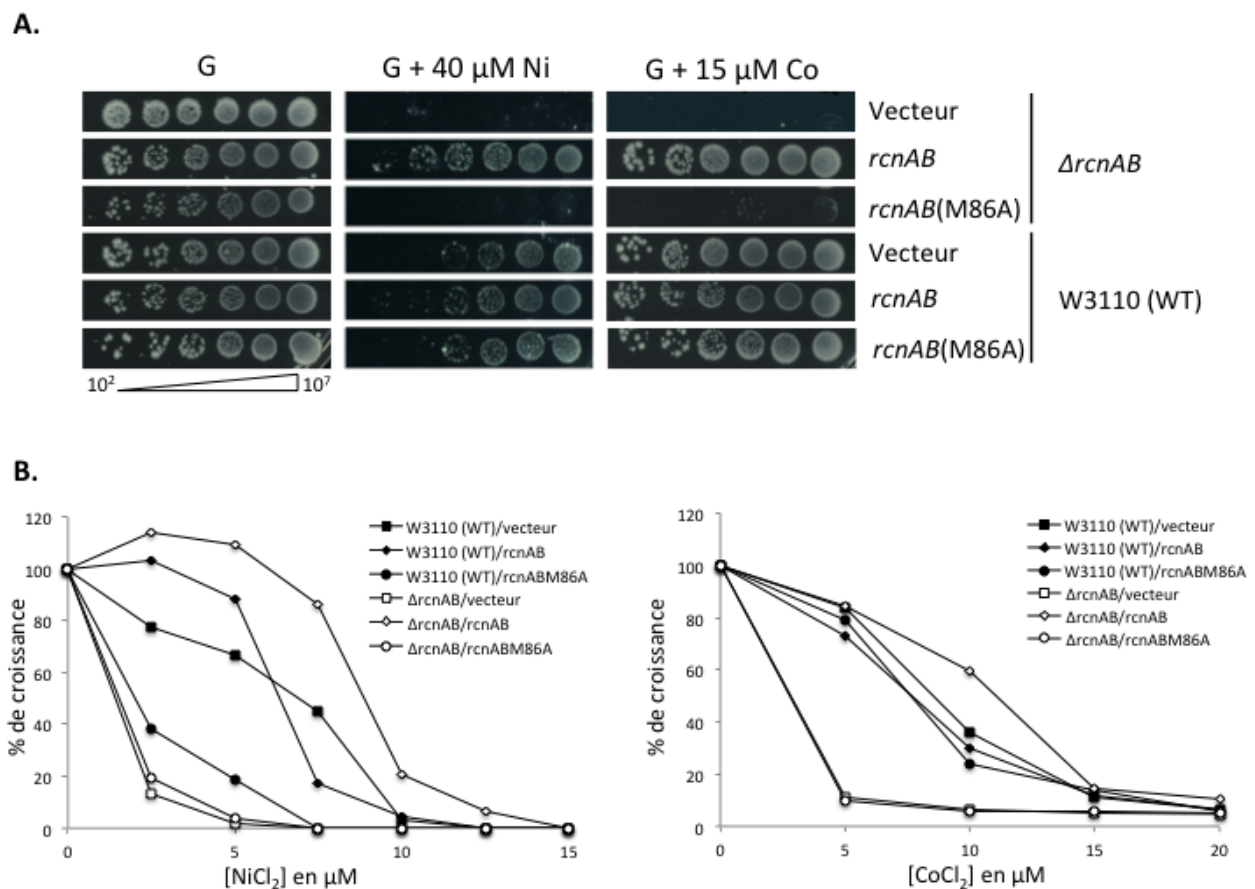


Figure 29 – Le mutant RcnB pour la méthionine 86 est déficient dans le contrôle de l'homéostasie du Ni et du Co.

**A.** Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose ( $2\text{ g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à  $37\text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $D_{600nm} = 0,6$ ). Les cultures sont ensuite diluées 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/mL sont déposés sur boîte de milieu minimum supplémenté ou non par  $40\ \mu\text{M}$  de  $\text{NiSO}_4$  ou  $15\ \mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$ . Les boîtes sont ensuite incubées à  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en aérobose de 24 à 48 h. **B.** Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum liquide, supplémenté de glucose ( $2\text{ g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à  $37\text{ }^\circ\text{C}$  avec des concentrations croissantes de  $\text{NiCl}_2$  ou  $\text{CoCl}_2$  pendant 16h. Les  $D_{600nm}$  sont ensuite mesurées. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métaux. Des expériences représentatives sont présentées.

Comme attendu, le double mutant  $\Delta rcnAB$  complétementé par le vecteur vide est plus sensible aux ions  $Ni^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  que la souche sauvage. Lorsque le plasmide contenant les gènes *rcnAB* est rapporté dans le double mutant, la résistance aux ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  est restaurée comme le profil de la souche sauvage. Ces résultats montrent un défaut dans l'efflux des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  chez le double mutant qui peut être restauré en ajoutant le système RcnAB. De manière intéressante, une forte sensibilité aux ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  chez le double mutant  $\Delta rcnAB$  complétementé par *rcnABM86A* est observé. La souche mutante pour RcnBM86A perd sa capacité à effluer les ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  malgré la présence de la pompe RcnA. Cela suggère que la perte de la fixation du cuivre par RcnB abolit la fonction d'efflux de RcnA et empêcherait l'efflux des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$ .

La stabilité des protéines RcnB et RcnBM86A a été vérifiée par immunodétection [Figure 30] en utilisant des anticorps dirigés contre RcnB. Les résultats montrent la présence de deux bandes correspondant à la forme mature et à la forme précurseur pour la protéine RcnB ainsi que pour la protéine RcnBM86A. Les profils de résistance obtenus précédemment sont bien dûs à une altération de l'efflux des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$ , induite par la perte de fixation du cuivre par RcnB, et non à une instabilité de la protéine mutante.

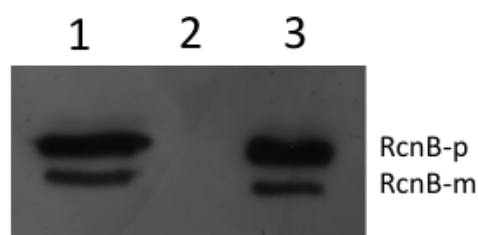


Figure 30 – **La mutation de la méthionine 86 n'affecte pas la stabilité de RcnB.**

Immunodétection de la protéine RcnB. 1 :BL21+pETRCB (pET30+RcnB), 2 :BL21+pET30, 3 :BL21+pETRCBM (pET30+RcnBM86A) RcnB-p= forme précurseur, RcnB-m= forme mature de RcnB.

La méthionine 86 est nécessaire à la fixation du cuivre pour la fonction de RcnB. Cette fixation du cuivre est donc indispensable pour le maintien de l'homéostasie du nickel et du cobalt. Cela suggère une interconnexion des homéostasies des ions  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  et que RcnB pourrait participer à cette interconnexion entre les pools de métaux. C'est pourquoi, une analyse par spectrométrie plasma des teneurs en ions  $Ni^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  a été réalisée sur la souche sauvage et chez le mutant  $\Delta rcnB$  cultivées en présence de  $Ni^{2+}$ , de  $Cu^{2+}$  et de  $Ni^{2+} + Cu^{2+}$  [Figure 31]. Chez la souche sauvage, l'ajout d'ions  $Cu^{2+}$  aux ions  $Ni^{2+}$ , augmente par 5 la quantité de Ni intracellulaire par rapport à l'ajout d'ions  $Ni^{2+}$  seul. Il existe bien une homéostasie croisée entre ces métaux. Par contre, aucune différence significative des teneurs en métaux n'est observée entre la souche sauvage et la souche  $\Delta rcnB$ . Cette interconnexion entre métaux semble donc être indépendante de la protéine RcnB.

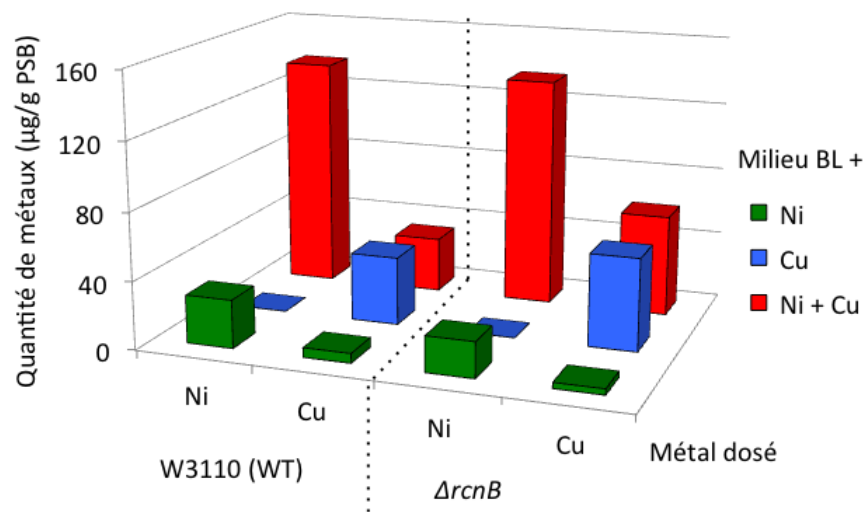


Figure 31 – RcnB n'est pas impliquée dans l'homéostasie croisée du nickel et du cuivre.

Les cultures de la souche sauvage W3110 et du mutant  $\Delta rcnB$  sont effectuées dans du milieu LB supplémenté par différentes quantités de métaux en conditions aérobie à 37°C et les bactéries sont récoltées à  $D.O_{600nm} = 0,6$ . Concentrations de métal utilisées :  $Ni^{2+}$  500  $\mu M$ ,  $Cu^{2+}$  500  $\mu M$  et  $Ni^{2+}$  500  $\mu M$  +  $Cu^{2+}$  500  $\mu M$ . Les résultats sont exprimés en  $\mu g$  métal. $g^{-1}$  PSB.

**Conclusion :** Dans la compréhension du mécanisme d'efflux des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$ , nous avons montré que RcnB et RcnA interagissent vraisemblablement. La protéine périsplasmique RcnB a été caractérisée comme pouvant fixer du cuivre *in vitro* ainsi qu'*in vivo* mais elle n'appartient pas à un système spécifique de maintien de l'homéostasie du cuivre. La fixation du cuivre implique la méthionine 86 et la perte de cette fixation entraîne un défaut de fonction de RcnB dans la résistance aux ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$ . RcnB une nouvelle protéine à cuivre impliquée dans l'homéostasie des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$ . La fixation du cuivre par RcnB suggère une interconnexion entre les pools de métaux. En effet, cette interconnexion est indépendante de RcnB. Pour mieux comprendre le lien entre ces homéostasies nous avons choisi de réaliser une analyse transcriptomique par RNA-Seq lors d'un stress provoqué par les ions  $Ni^{2+}$  afin d'évaluer les mécanismes cellulaires qui régissent cette interconnexion.



# Chapitre 5

## Evaluation de la réponse cellulaire à un stress provoqué par un excès de nickel

Dans le chapitre précédent nous nous sommes attachés à comprendre comment se déroulait le passage des ions  $\text{Ni}^{2+}$  à travers la membrane interne. A l'heure actuelle, chez *E. coli* aucun transporteur spécifique des ions  $\text{Ni}^{2+}$  n'a été identifié au niveau de la membrane externe permettant l'entrée ou l'efflux de ce métal. De plus, les travaux présentés dans le premier chapitre posent les questions suivantes. Quel est le lien exact entre les homéostasies des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ ? Et plus généralement, quels sont les mécanismes des l'homéostasies croisées entre les métaux? Pour répondre à ces questions nous avons entrepris une analyse globale d'un stress métallique chez *E. coli*. Nous avons décidé d'étudier cette bactérie modèle exposée aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  par une analyse transcriptomique de RNA-Sequencing (RNA-Seq). Cette technique a été adoptée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, très peu d'études ont utilisé la transcriptomique à haut débit pour comprendre les mécanismes de l'homéostasie des métaux chez *E. coli*. Ensuite, elle permet une mesure assez précise du taux d'expression de ces transcrits. D'autre part, suivant les critères choisis pour le traitement des ARNs, plusieurs informations peuvent être obtenues. Notamment, il peut être identifié de nouveaux gènes, des petits ARNs ainsi que des sites initiateurs de la transcription. Tout ceci nous permettra d'avoir une "vue globale" de l'état de la bactérie lors d'un stress aux ions métalliques. Cela permettra d'approfondir les connaissances sur les systèmes de régulation contrôlant l'homéostasie du nickel et éventuellement de mettre en évidence de nouveaux systèmes de résistance.

Avant toute chose, une série d'expériences préliminaires a été nécessaire afin de déterminer les conditions adéquates nous permettant de répondre au mieux à nos questions.

### 5.1 Mise au point des conditions de culture et d'extraction des ARNs pour la réalisation du RNA-Seq

#### 5.1.1 Choix de la souche, du milieu et de la phase de croissance

Au laboratoire nous travaillons sur la souche d' *E. coli* W3110 qui est une souche dérivée d' *E. coli* K12. Nous avons pris la décision de réaliser les cultures en milieu minimum et non en



milieu riche pour éviter la chélation des métaux par les composés présents dans le milieu riche. Pour comprendre les mécanismes de toxicité des ions  $\text{Ni}^{2+}$  chez les bactéries et en particulier chez *E. coli*, nous avons décidé de réaliser notre étude transcriptomique à une concentration en ions  $\text{Ni}^{2+}$  toxique pour les cellules. Nous avons testé plusieurs concentrations en métaux (10 et 30  $\mu\text{M}$ ) ainsi que l'ajout des métaux à  $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0,6$ , correspondant au milieu de la phase exponentielle de croissance<sup>1</sup>. Mais ces conditions n'entraînaient pas de toxicité assez marquée. Sur la figure 32, sont présentées les courbes de croissances des cultures de W3110 en présence ou non d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Les ions ont été ajoutés en début de phase exponentielle de croissance à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ . Un arrêt de croissance pour la culture stressée aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  est observé.

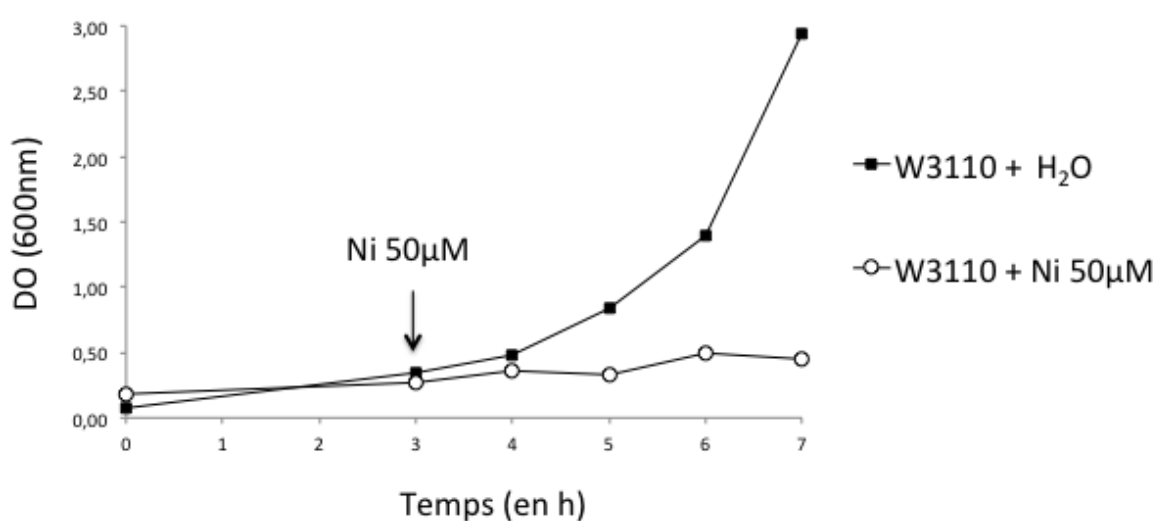


Figure 32 – Profil de croissance de la souche W3110 lors d'un stress aux ions  $\text{Ni}^{2+}$

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose (2  $\text{g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à 37 °C jusqu'à  $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0,3$ , puis ajout de 50  $\mu\text{M}$  d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Les prélèvements d'échantillons pour les mesures de  $\text{D.O}_{600\text{nm}}$  sont réalisés toutes les heures.

### 5.1.2 Mise au point de la technique d'extraction des ARNs

Au départ, les ARNs ont été extraits à partir du kit RNeasy® du fournisseur Quiagen®. Il s'est avéré que les ARNs n'étaient pas d'assez bonne qualité comparé à l'extraction par la méthode au phénol [Figure 33]. Les ARNs sont plus facilement dégradés lorsqu'ils sont extraits avec le kit. De plus, cette technique ne permettait pas d'avoir une quantité suffisante pour l'analyse du transcriptome. C'est pourquoi nous avons décidé d'extraire les ARNs par la technique au phénol froid [cf Chapitre 3.2.2].

1. données non montrées

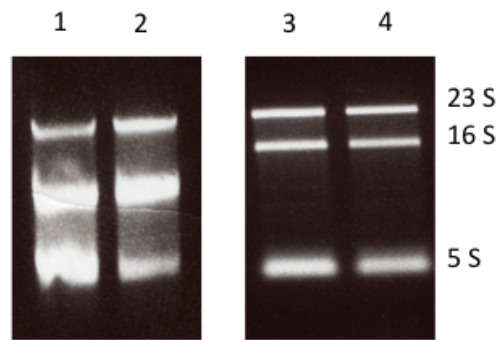


Figure 33 – **Qualité des ARNs selon le mode d'extraction**

1 et 2 représentent les ARNs extraits à l'aide du kit RNeasy® du fournisseur Quiagen® avec 1 : W3110+ H<sub>2</sub>O et 2 : W3110 + 50 μM de Ni<sup>2+</sup>. 3 et 4 représentent les ARNs extraits par la méthode au phénol avec 3 : W3110+ H<sub>2</sub>O et 4 : W3110 + 50 μM de Ni<sup>2+</sup>.

### 5.1.3 Détermination de la durée de l'exposition aux ions Ni<sup>2+</sup>

L'étape suivante a été de déterminer le temps du stress métallique. Pour cela nous avons prélevé des échantillons de culture à t=0, 10, 20 et 30 min après l'exposition aux ions. Nous avons extrait les ARNs par la méthode au phénol. Ces derniers ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires (cDNA). Puis nous avons réalisé une analyse par PCR quantitative de l'expression d'un gène qui est induit lors d'un stress aux ions Ni<sup>2+</sup>, le gène *rcnA* qui code pour la pompe d'efflux des ions Ni<sup>2+</sup>. Nous avons également analysé un gène dont l'expression ne varie pas, *fbxA*, qui code pour une 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] déshydrogénase (Macomber et al., 2011).

C'est après dix minutes d'exposition aux ions Ni<sup>2+</sup> que le gène *rcnA* est le plus fortement induit [Figure 34]. C'est pourquoi, l'analyse du transcriptome sera réalisée après dix minutes d'exposition aux ions.

Pour répondre à notre problématique, les ARNs ont été extraits par la technique au phénol froid en ayant au préalable réalisé des cultures de la souche W3110 en milieu minimum supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>). Les cellules à D.O<sub>600nm</sub> = 0,3 ont été soumises à un stress de 50 μM de Ni<sup>2+</sup> pendant 10 minutes. La qualité et la quantité des ARNs ont été vérifiées avant l'envoi au séquençage. Afin d'obtenir des résultats fiables et exploitables, 3 réplicats biologiques pour chaque échantillon ont été réalisés et ont été séquençés par RNA-Seq.

## 5.2 Séquençage

Les ARNs sont à nouveau vérifiés pour leur quantité et leur qualité par la plateforme de séquençage de ProfileXpert-LCMT. La création des banques directionnelles nous permettra de connaître le sens de transcription des gènes et de détecter la présence d'éventuels petits ARNs. Ces banques sont indexées par une séquence de 6 nucléotides spécifiques de chaque échantillon, nous permettant ainsi, après le séquençage, de les différencier lors du traitement des données.

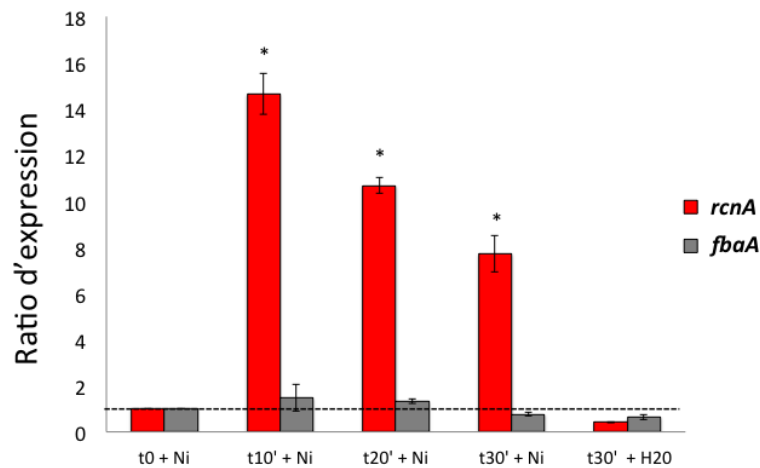


Figure 34 – Expression du gène *rcnA* induit en présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  en fonction du temps

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'à  $\text{D.O}_{600nm} = 0,3$ . Des aliquots sont récupérés à  $T=0, 10, 20$  et  $30$  min après un stress de  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ . Une culture sans stress  $\text{Ni}^{2+}$  est réalisée. Les ARNs sont extraits puis rétrotranscrits en ADN complémentaires. Les expressions des gènes *rcnA* et *fbaA* (gène dont l'expression ne varie pas en présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ ) sont évaluées par qPCR. La moyenne ainsi que l'écart-type de trois expériences indépendantes sont présentés. Un test de Student est réalisé, \* = valeur de  $p < 0,05$ .

Ce dernier est réalisé par un séquenceur HiSeq-2500 (Illumina) en *single read* de 50 cycles.

### 5.3 Traitement des données brutes du RNA-Seq

Le traitement des données brutes a également été réalisé par la plateforme ProfileXpert. Une fois le séquençage terminé, une étape de démultiplexage est nécessaire pour reconstruire les séquences, et séparer les différents échantillons. Ensuite, l'alignement des séquences est effectué sur le génome de référence en ayant au préalable réalisé une étape de filtration permettant de ne récupérer que les séquences de bonne qualité (Passing Filter). L'ensemble des données et des statistiques du séquençage pour chaque échantillon est résumé dans le tableau 7.

Tableau 7 – Résumé des données obtenues après le séquençage par RNA-Seq

Echantillons	Cluster (brut)	Cluster (PF)	% d'alignement	% $\geq Q30$ bases
WT + H <sub>2</sub> O (1)	20 755 136	17 682 267	97,37	91,66
WT + H <sub>2</sub> O (2)	18 228 722	15 671 005	98,00	91,73
WT + H <sub>2</sub> O (3)	19 643 022	16 628 904	97,58	91,79
WT + Ni (1)	20 614 112	17 788 123	97,99	91,74
WT + Ni (2)	18 904 907	16 111 158	97,52	91,76
WT + Ni (3)	20 552 733	17 469 877	97,90	91,66

Cluster (brut) = nombre de séquences brutes obtenues après le démultiplexage. Cluster (Passing Filter) = nombre de séquences obtenues après vérification de leur qualité. % d'alignement = nombre de séquences alignées au génome de référence.  $Qscore = -10 \log_{10}$  (probabilité qu'une base soit fautive) avec  $Q30 = 1$  erreur sur 1000 bases

Pour analyser l'expression différentielle de chaque gène, une étape de normalisation est nécessaire. Cette normalisation corrige les biais que peuvent produire par exemple la technique d'extraction des ARNs ou la technique de séquençage. Cela permet d'être certain que les différences d'expression obtenues résultent bien d'un effet biologique et non d'un artefact expérimental. Ainsi, il est calculé pour l'expression de chaque gène le RPKM<sup>2</sup>.

$$\text{RPKM} = \frac{10^9 \times \text{nombre de "reads" alignés sur le gène d'intérêt}}{\text{nombre total de "reads"} \times \text{la longueur du transcrits (en kb)}}$$

Pour la suite de nos travaux nous utiliserons uniquement les gènes exprimés, c'est dire possédant un RPKM  $\geq 1$ .

Une fois tout ceci réalisé, les différentiels d'expression entre les gènes peuvent être comparés entre les deux conditions expérimentales. Cela nous donne les taux de variation également appelé Fold Change (FC).

$$\text{FC} = \frac{\text{RPKM de la condition Ni}}{\text{RPKM de la condition contrôle}}$$

La répartition des gènes en fonction de leur RPKM (en Log2) entre la condition avec ou sans Ni<sup>2+</sup> sur la figure 35, donne un nuage de points plutôt éparpillé. Une droite est tracée représentant les valeurs de RPKM de 1,5. La majorité des gènes sont sur la diagonale. Il est important de noter que les gènes éloignés de cette diagonale représentent les gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions.

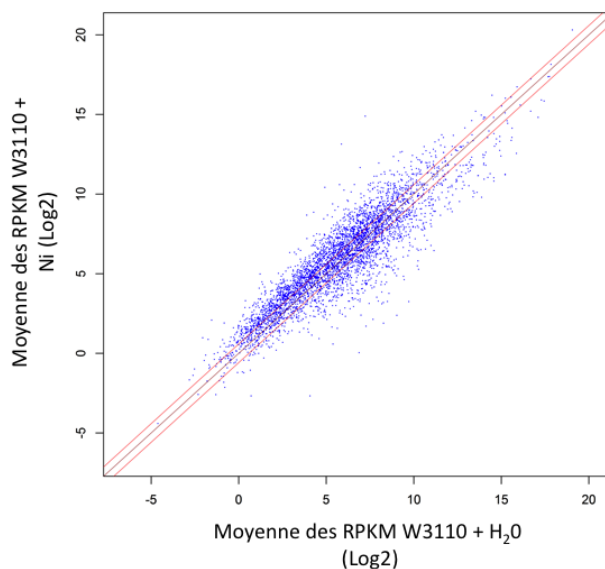


Figure 35 – Répartition des gènes en fonction de leur ratio d'expression

Nuage de point correspondant aux valeurs de RPKM<sup>3</sup> des moyennes des trois réplicats biologiques, exprimées en Log2, entre la condition des cultures stressées aux ions Ni<sup>2+</sup> et les cultures non stressées. Les diagonales rouges représentent les limites pour lesquelles le RPKM est de 1,5. (Figure de Nicolas Nazaret, ProfileXpert)

2. Reads Per Kilobase per Million mapped read

## 5.4 Validation expérimentale des données du RNA-Seq

Afin de vérifier que les données obtenues suite à l'analyse par RNA-Seq correspondent à des valeurs expérimentales nous avons réalisé des qRT-PCR. Pour cela, les ARNs ont été extraits à partir des mêmes cultures réalisées pour le transcriptome. L'expression de 30 gènes a été évaluée par qPCR en ayant au préalable synthétisé les ADNc. Les données sont présentées en comparant les ratios d'expression obtenus en qRT-PCR en fonction des ratios d'expression obtenus en RNA-Seq [Figure 36]. La régression linéaire obtenue à partir du nuage de points possède une valeur de  $R^2$  de 0,95. Les ratios d'expression entre les deux expériences sont bien corrélés.

Pour conclure, les données du transcriptome sont fiables et pourront donc être exploitées par la suite.

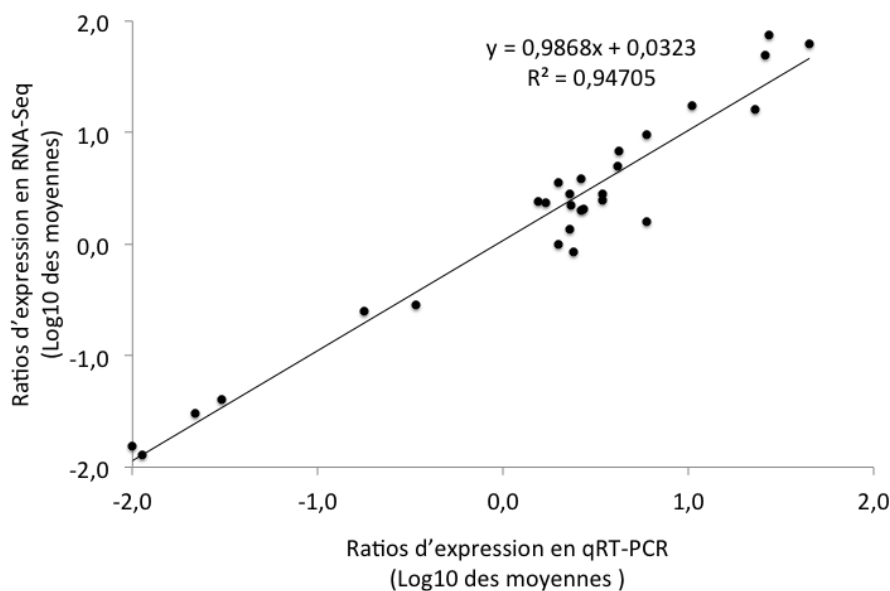


Figure 36 – Corrélation des ratios d'expression entre qPCR et RNA-Seq

Des cultures de la souche sauvage W3110 sont réalisées dans du milieu minimum, supplémentés de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'à  $D.O_{600nm} = 0,3$ . Les ARNs sont extraits après un stress de  $50\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$  pendant 10 min. Les expressions de 30 gènes sont analysées par qRT-PCR. Les ratios d'expression calculés sont comparés aux ratios d'expression obtenus par RNAseq. Les résultats sont présentés en Log10 des moyennes des ratios d'expression pour les 30 gènes analysés. Une régression linéaire est calculée à partir du nuage de point avec un  $R^2$  de 0,95.

## 5.5 Analyse globale des résultats

### 5.5.1 Détermination du jeu de données

Comme représenté sur la figure 35, un grand nombre de gènes sont différentiellement exprimés lors d'un stress aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ . En effet, sur les 4440 transcrits que possède *E. coli*, 2545 gènes sont différentiellement exprimés en considérant un ratio d'expression (ou Fold Change= FC) supérieur à 1,5 ou inférieur à -1,5 ( $p < 0,05$ ). Cela représente 57 % des transcrits et donc

plus de la moitié des gènes sont différentiellement exprimés entraînant une difficulté pour une analyse approfondie. C'est pourquoi nous avons décidé de réduire notre jeu de données. Pour cela, nous avons tout d'abord évalué la répartition de nos données en fonction de leurs ratios d'expression [Figure 37]. Comme attendu, les données suivent la loi normale avec des fréquences maximales obtenues pour les gènes ayant des ratios d'expression compris entre 1,5 et 2,5.

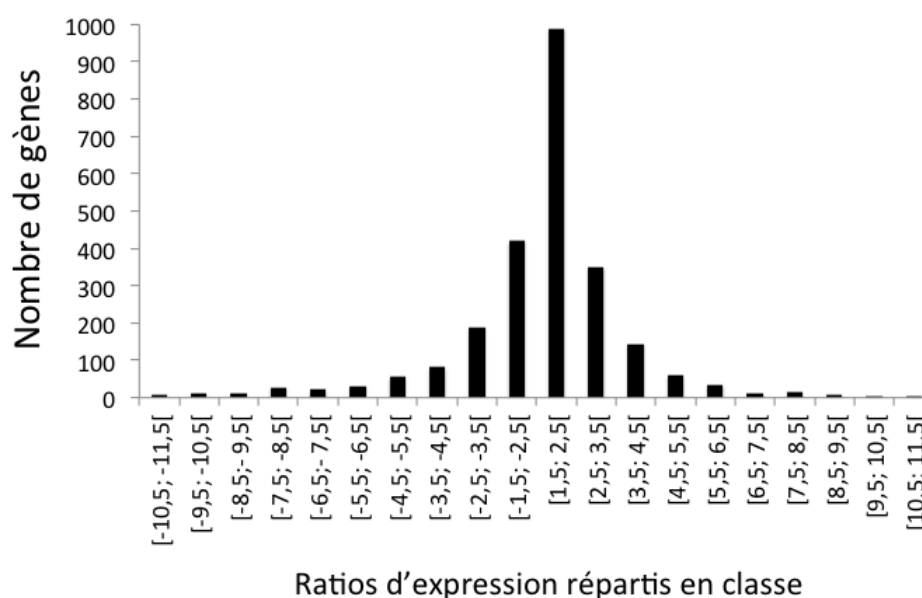


Figure 37 – Répartition des gènes différentiellement exprimés en fonction de leur ratio d'expression.

Les gènes différentiellement exprimés sont triés par classe en fonction de leur ratio d'expression.

Si nous sélectionnons tous les gènes qui ont un  $FC \geq 4,5$  en valeur absolue, cela représente 352 gènes, c'est à dire 16 % des gènes différentiellement exprimés. Ce jeu de données est plus adapté pour réaliser une étude approfondie. Dans ce jeu de données nous dénombrons 151 gènes activés et 201 gènes réprimés. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans la figure 38.

La Figure 39 illustre les gènes différentiellement exprimés lors du stress provoqué par les ions  $Ni^{2+}$  en fonction de leur position sur le chromosome et de leur ratio d'expression. Les ions  $Ni^{2+}$  n'impactent pas particulièrement l'expression de gènes dans une région spécifique du chromosome. Sur cette figure sont également représentés quelques gènes dont les ratios d'expression sont importants. Le gène *yohM* codant la protéine RcnA, pompe d'efflux des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  est fortement activé lors d'un excès de nickel (Rodrigue et al., 2005). Par contre, l'expression des gènes codant le système d'import des ions  $Ni^{2+}$ , *NikABCDE*, n'est pas affectée par l'excès d'ions  $Ni^{2+}$ . Les conditions aérobies utilisées pour cette étude ne permettent probablement pas la répression de l'expression des gènes *nikABCDE*. L'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du cuivre (en bleu) et du fer (en orange) sont respectivement activée et réprimée lors du stress provoqué par les ions  $Ni^{2+}$ . De plus amples investigations sur ces résultats sont abordées dans le chapitre 8 de ce manuscrit.

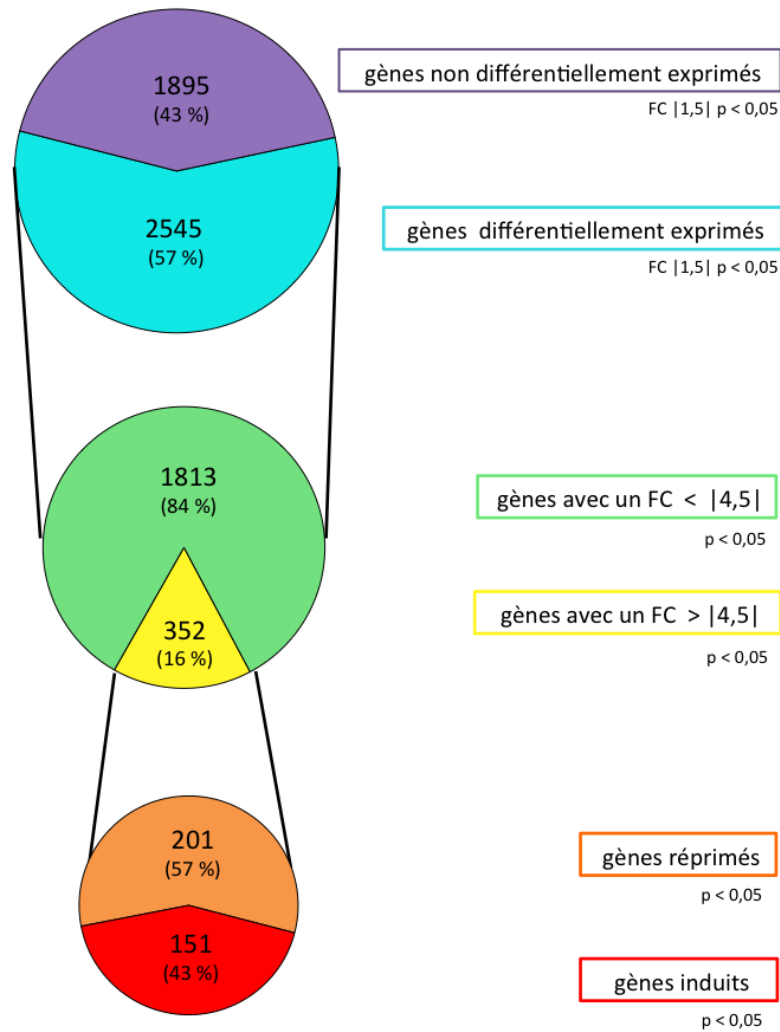


Figure 38 – Choix du jeu de données

Lors d'un stress aux ions  $Ni^{2+}$ , sur les 4440 transcrits chez *E. coli*, 57% des gènes sont différentiellement exprimés avec un ratio d'expression fixés à 1,5 ( $p < 0,05$ ). Sur ces 57 %, 16% correspondent aux gènes possédant un ratio d'expression supérieur à 4,5. L'analyse fonctionnelle sera réalisée sur ces 16%, dont 201 gènes sont des gènes réprimés lors d'un stress aux ions  $Ni^{2+}$  et 151 gènes sont induits en présence de ce métal. FC = Fold Change

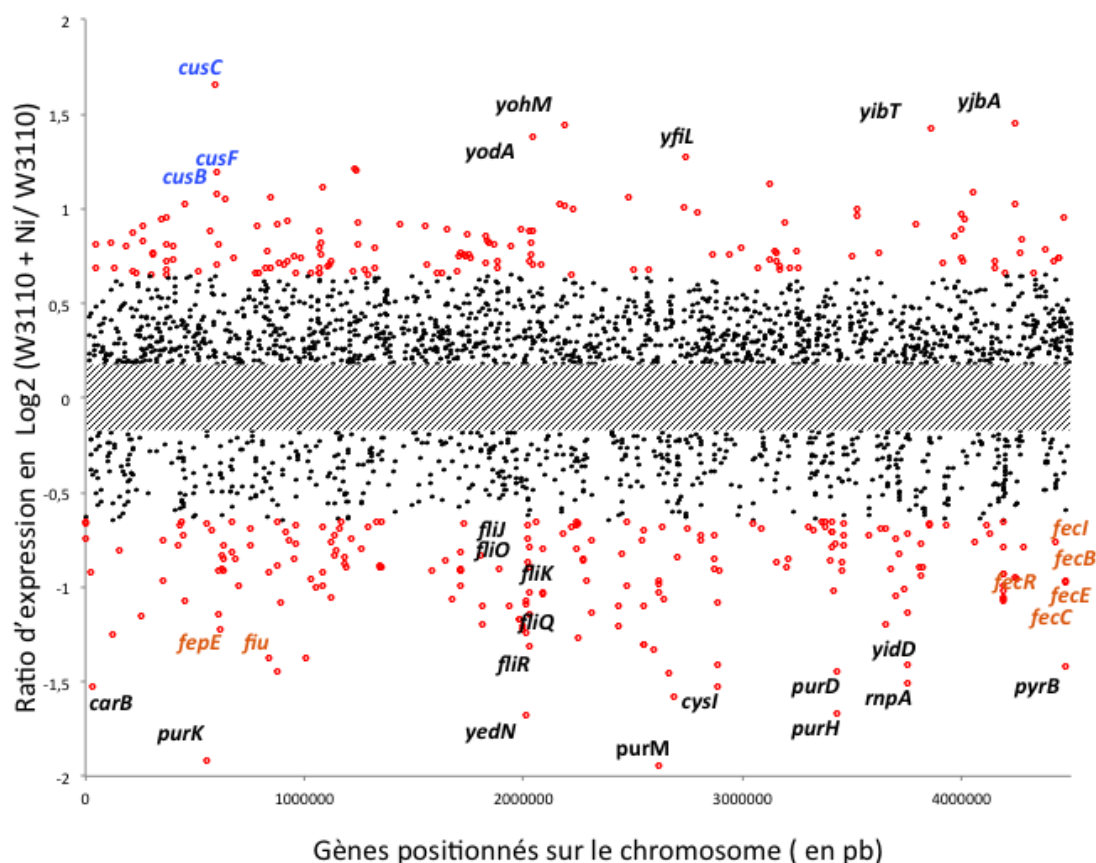


Figure 39 – Positionnement des gènes différentiellement exprimés sur le chromosome en fonction de leur ratio d’expression

Les gènes différentiellement exprimés entre la souche W3110+Ni et la souche W3110 non traitée sont positionnés en fonction de leur place sur le chromosome et de leur ratio d’expression en Log2 des FC. La bande zébrée centrale correspond aux gènes qui ne sont pas différentiellement exprimés lors de l’analyse. Les points noirs représentent les gènes pour lesquels les FC sont inférieure à 4,5 en valeur absolue ( $p < 0,05$ ) et les points rouges sont les gènes dont les ratio d’expression sont supérieure à 4,5 en valeur absolue ( $p < 0,05$ ). Les gènes très différentiellement exprimés sont annotés sur ce graphique et leur fonction sont répertoriées dans les tables 1 et 2 en annexes. En bleu, sont représentés les gènes impliqués dans l’homéostasie du cuivre et en orange dans l’homéostasie du fer. Le 0 de l’axe des abscisses correspond à l’origine de réplication OriC.

### 5.5.2 Analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés

Les 352 gènes différentiellement exprimés sont triés en fonction de leur annotation GO<sup>4</sup> et plus précisément par leur fonction biologique (cf table 1 et 2 en annexes). Pour des raisons de clarté nous avons regroupé les annotations GO en 38 catégories fonctionnelles afin d’évaluer quelle catégorie est la plus représentée. Les résultats sont présentés sur la figure 40.

Comme attendu, un grand nombre de gènes différentiellement exprimés appartiennent à la catégorie fonctionnelle ”traduction”. En effet, si le taux de variation est fixé à 4,5 ( $p < 0,05$ ), 13 % des gènes réprimés sont des gènes codant entre autre des protéines ribosomales. Ces résultats reflètent un arrêt de croissance de la bactérie en réponse directe face au stress métallique. La courbe de croissance obtenue lors des expériences préliminaires avant le séquençage illustre parfaitement ce phénomène [Figure 32].

Une autre catégorie fonctionnelle majeure regroupant un grand nombre de gènes différen-

4. Gene Ontology



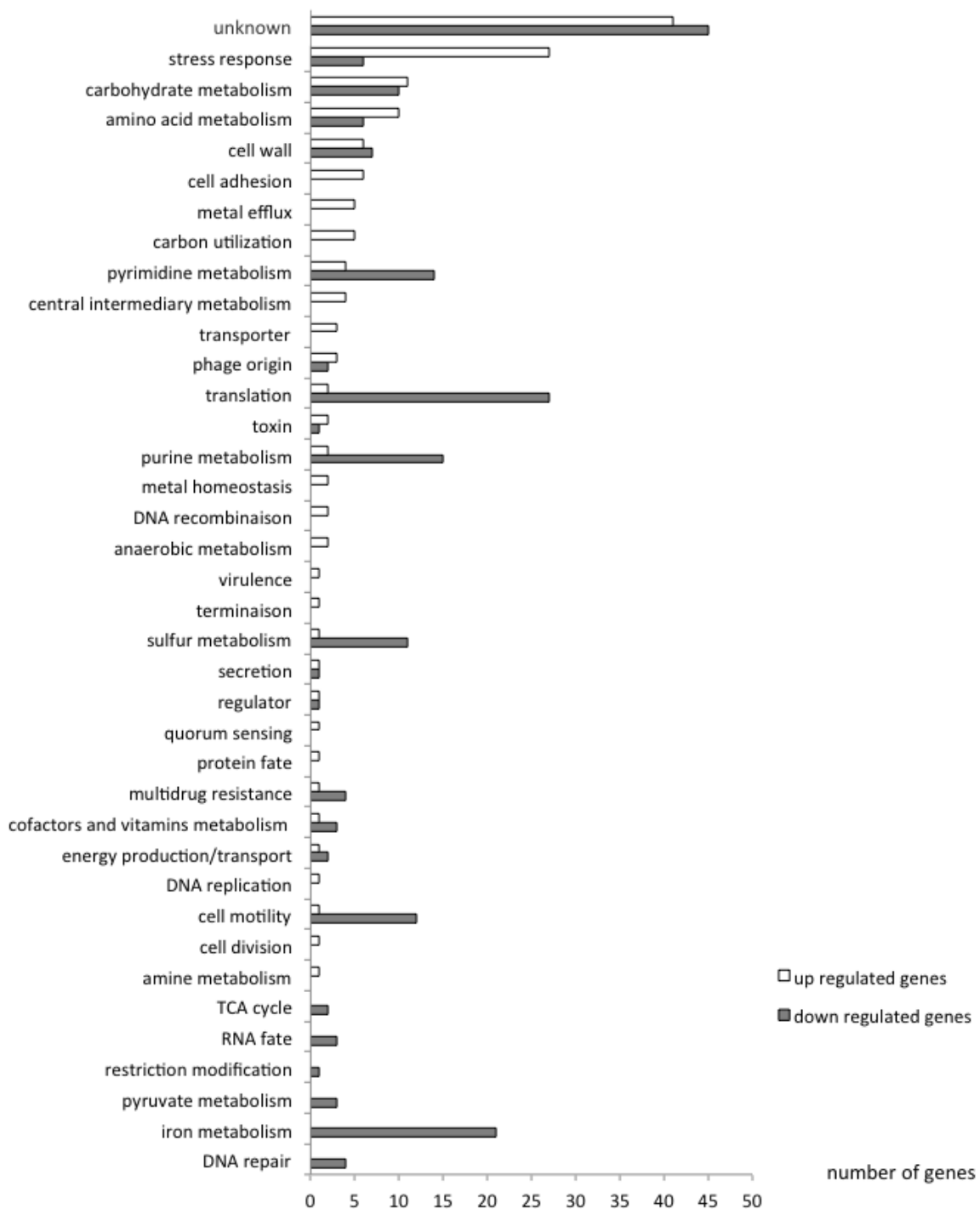


Figure 40 – Répartition des gènes différentiellement exprimés en fonction de leur rôle biologique.

Sur cet histogramme sont figurés les catégories GO les plus représentées en nombre de gènes différentiellement exprimés. En gris sont représentés les gènes pour lesquels les ratios d'expressions sont inférieurs à -4,5 donc réprimés en présence d'ions Ni<sup>2+</sup>. En blanc sont représentés les gènes pour lesquels les ratios d'expression sont supérieurs à 4,5 et donc activés en présence d'ions Ni<sup>2+</sup>.

tiellement exprimés est la "réponse au stress". On retrouve dans cette catégorie le régulateur central de réponse au stress *rpoS*, facteur *sigmaS* de la RNA polymérase. On retrouve également des systèmes d'efflux comme le gène *rcnA* codant la pompe d'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$ . De manière intéressante, les gènes codant le système d'efflux de type RND *cusCFBA*, permettant le transport des ions  $\text{Cu}^{2+}$ , sont fortement induits lors d'un stress  $\text{Ni}^{2+}$ . Quels sont les mécanismes liant ces deux homéostasies ?

Une analyse plus fine, c'est à dire des gènes différentiellement exprimés impliqués dans la réponse au stress entre 1,5 et 4,5<sup>5</sup>, révèle qu'un grand nombre de gènes sont impliqués dans la réponse au stress acide. Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  induisent-ils une diminution du pH intracellulaire ? Impactent-ils directement les enzymes essentielles au maintien du pH ou des gènes impliqués dans régulation de la réponse au stress acide ?

Au laboratoire, il avait été décrit que la présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  entraînait les bactéries à vivre sous forme de biofilms (Perrin et al., 2009). Dans notre cas d'étude, les gènes appartenant à la catégorie fonctionnelle "motilité cellulaire" sont réprimés. Pour la plupart, ils correspondent aux gènes intervenant au niveau de la synthèse des flagelles. Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  ont-ils également un rôle dans l'arrêt de la vie planctonique en même tant que le passage en mode de vie de type biofilm ? Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  impactent-ils directement les flagelles ?

Ensuite, nous remarquons qu'un grand nombre de gènes appartenant au métabolisme du fer sont réprimés. Ces gènes codent essentiellement des systèmes d'import du fer. Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  jouent-ils le même rôle que les ions  $\text{Fe}^{2+}$  dans la régulation de ces systèmes d'import du fer ?

Dans l'ensemble de ce jeu de données, on retrouve des gènes prédits pour coder des protéines de membranes de type porines, RND ou même des transporteurs TonB-dépendant. L'un de ces gènes code-t-il pour un transporteur spécifique des ions  $\text{Ni}^{2+}$  ?

**Conclusion : L'approche par RNA-Seq pour analyser l'impact des ions  $\text{Ni}^{2+}$  chez *E. coli* nous a permis d'obtenir un grand nombre de données. En effet, lors d'un stress toxique aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ , plus de la moitié des transcrits sont différentiellement exprimés (FC 1,5,  $p < 0,05$ ). L'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés (FC 4,5  $p < 0,05$ ) a engendré un grand nombre de questions quant aux stratégies d'adaptation de la bactérie, que nous essaierons d'éclaircir dans les chapitres suivants. Tout d'abord, nous nous interrogerons sur l'effet des ions  $\text{Ni}^{2+}$  sur le pH intracellulaire [cf Chapitre 6]. Nous regarderons l'impact des ions  $\text{Ni}^{2+}$  sur la motilité cellulaire [cf Chapitre 7]. Il apparait certain que l'homéostasie du nickel est étroitement liée à celle du fer et du cuivre. Nous analyserons de manière plus approfondie cet aspect [cf Chapitre 8]. Enfin, nous réaliserons un crible sur les différents gènes prédits pour être des transporteurs et nous évaluerons les phénotypes de résistance aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  chez les mutants de ces transporteurs [cf Chapitre 9].**

---

5. données non montrées



## Chapitre 6

# Impact des ions $\text{Ni}^{2+}$ sur le pH intracellulaire et sur les systèmes de résistance à l'acidité

Dans le chapitre 2 de ce manuscrit est défini l'homéostasie comme étant la mise en place de systèmes régulant les signaux perçus par la cellule. De la même façon que pour les métaux, les bactéries sont capables de détecter les variations de pH (Krulwich et al., 2011). La stratégie importante pour l'homéostasie du pH est l'utilisation des transporteurs actifs de protons. Les transporteurs primaires sont par exemple les pompes à protons de la chaîne respiratoire. Les antiporteurs à cations qui utilisent la force proton motrice générée par la respiration sont les transporteurs actifs secondaires. Chez *E. coli*, lorsque le pH extérieur est acide, les protons sont efflués à l'extérieur de la cellule en échange d'une entrée de cations tels que les  $\text{Na}^+$  ou les  $\text{K}^+$ . Inversement quand le pH extérieur devient basique, la cellule importe des protons en échange de cations cytoplasmiques (Krulwich et al., 2011).

Il est maintenant bien admis par la communauté scientifique que le pH et notamment un environnement acide augmente la biodisponibilité des métaux lourds. Cette propriété est d'ailleurs à l'heure actuelle très étudiée dans le domaine de la phytoremédiation. Par exemple, les bactéries rhizosphériques sont capables d'améliorer les processus de phytoremédiation en produisant des acides organiques. Ces acides réduisent le pH du sol permettant la solubilisation des métaux, les rendant ainsi biodisponibles pour les plantes (Rajkumar et al., 2012). Une analyse transcriptomique a été réalisée chez *E. coli* W3110 en cultivant les cellules à pH 5,7 et à pH 7 en anaérobiose (Hayes et al., 2006). Cette étude a révélé que le stress acide entraînait une activation des gènes codant les protéines de transport d'ions tels que le système d'import du nickel, Nik et activait également le gène *cusC* codant l'une des protéines du système RND permettant l'efflux des ions  $\text{Cu}^{2+}$ .

Ces deux exemples montrent ici le lien étroit entre les métaux et la teneur en pH.

La bactérie modèle *E. coli*, colonisatrice de l'intestin, possède plusieurs systèmes de résistance à l'acidité (AR) lorsqu'elle se retrouve à un pH faible. De manière très synthétique, on peut répertorier cinq systèmes de résistance. Le premier (AR1), appelé aussi système oxydatif, est le moins bien caractérisé. Il entre en jeu en phase stationnaire de croissance et implique le facteur sigma alternatif RpoS et le régulateur global CRP (cAMP receptor protein) (Castanie-Cornet et al., 1999). Les autres systèmes font intervenir des acides aminés comme le glutamate (AR2),

l'arginine (AR3), de la lysine (AR4) ou l'ornithine (AR5) (Kashiwagi et al., 1992) (Foster, 2004). En général, ces systèmes sont constitués d'une enzyme décarboxylase dont la synthèse est induite par un faible pH et d'un antiport spécifique d'un acide aminé [Figure 41]. Ces cinq systèmes AR induisent un niveau différent de protection envers les pH acides, les systèmes AR1 et AR4 offrant un niveau de protection minimal et AR3 une résistance moyenne. Le système glutamate-dépendant qui est le plus efficace, a été le plus étudié.

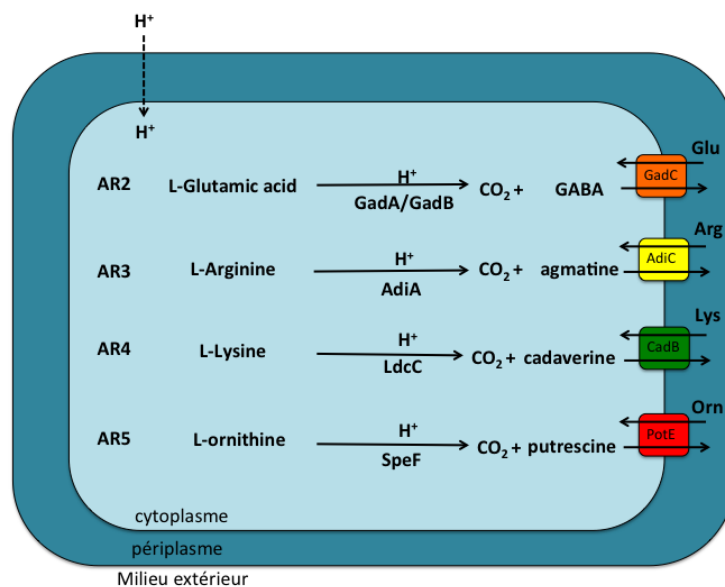


Figure 41 – Représentation schématique des différents systèmes de résistance à l'acide chez *E. coli*

Les acides aminés, les produits de décarboxylation et les protéines de transport sont répertoriés dans ce schéma ainsi que les enzymes responsables de ces réactions. Ces réactions de décarboxylation consomment un proton en relarguant du dioxyde de carbone. AR1 n'est pas mentionné car ce système est très peu caractérisé. Figure adaptée de (Zhao and Houry, 2010)

L'activation des gènes impliqués dans la réponse à l'acidité suite à une exposition aux ions  $Ni^{2+}$  nous a semblé être un résultat cohérent et très intéressant à explorer (cf Chapitre 5). Les gènes impliqués dans la résistance à l'acidité ainsi que leur ratio d'expression lors de l'analyse par RNA-Seq sont présentés dans le tableau 8.

L'une des premières étapes a été de vérifier les données du RNA-Seq, en réalisant des qPCR sur certains gènes impliqués dans ces différents systèmes de résistance. Les différentes voies constituant les mécanismes de résistance à l'acidité sont représentées schématiquement [Figure 42]. Pour compléter ces données, nous avons également analysé l'effet des ions  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , et  $Zn^{2+}$  sur l'expression des gènes impliqués dans la résistance au stress acide [Tableau 9]. Il est important de noter que la voie glutamate-dépendante est régulée par plus de 20 protéines et de 3 petits ARNs (Zhao and Houry, 2010).

Tableau 8 – Gènes impliqués dans la résistance à l'acidité chez *E. coli*

FC	Gènes	Fonction de la protéine	AR
n.d	<i>emrY</i>	Potentiel transporteur multidrogues (MFS)	/
n.d	<i>emrK</i>	Potentiel transporteur multidrogues (MFS)	/
n.d	<i>evgA</i>	Régulateur transcriptionnel	2
-2,95	<i>evgS</i>	Histidine kinase	2
n.d	<i>ydeO</i>	Régulateur transcriptionnel	2
1,98	<i>gadE</i>	Régulateur transcriptionnel	2
1,50	<i>mdtE</i>	Transporteur multidrogues (MFP)	2
n.d	<i>mdtF</i>	Transporteur multidrogues (perméase)	2
2,62	<i>gadC</i>	Transporteur de l'acide glutamique :4-aminobutyrate	2
1,81	<i>gadB</i>	Glutamate décarboxylase B	2
2,29	<i>gadX</i>	Régulateur transcriptionnel	2
2,31	<i>gadA</i>	Glutamate décarboxylase A	2
3,43	<i>hdeB</i>	Protéine chaperone	2
4,13	<i>hdeA</i>	Protéine chaperone	2
1,99	<i>hdeD</i>	Protéine de membrane	2
2,51	<i>adiC</i>	Transporteur de l'agmatine	3
3,42	<i>adiY</i>	Régulateur transcriptionnel	3
n.d	<i>adiA</i>	Arginine décarboxylase	3
n.d	<i>cadA</i>	Lysine décarboxylase	4
n.d	<i>cadB</i>	Transporteur de la cadaverine	4
n.d	<i>cadC</i>	Régulateur transcriptionnel 1	4
n.d	<i>ldcC</i>	Lysine décarboxylase 2	4
2,96	<i>potE</i>	Transporteur de l'ornithine	5
1,54	<i>speF</i>	Ornithine décarboxylase	5

FC= Fold change obtenus par l'analyse RNA-Seq. AR= Système de résistance. n.d=non déterminé

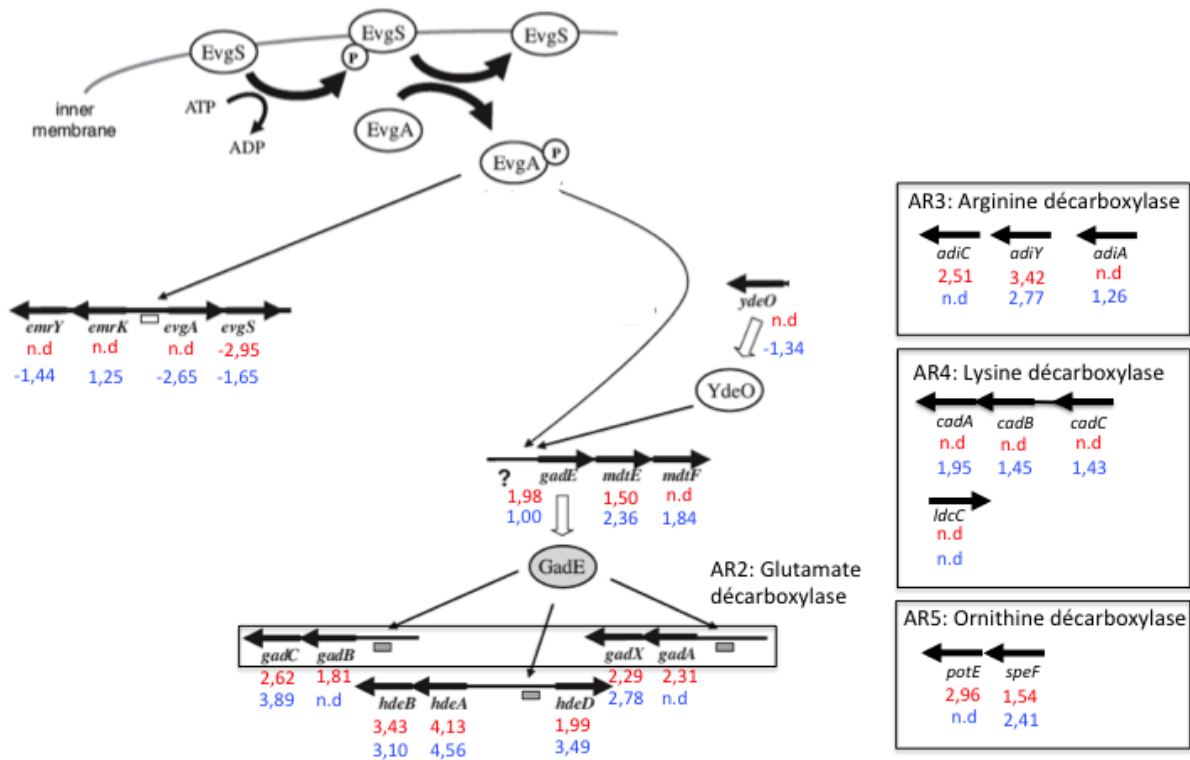


Figure 42 – Les ions  $Ni^{2+}$  induisent une activation de la transcription des gènes impliqués dans la résistance au stress acide

Le détail des gènes et des fonctions des protéines impliqués dans 4 des 5 systèmes de résistance à l'acidité chez *E. coli* sont répertoriés dans le tableau 8. En rouge, sont indiqués les FC obtenus par RNA-Seq et en bleu les FC obtenus par qPCR. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont répertoriées dans la table 3 en annexes. n.d=non déterminé. Figure adaptée de (Itou et al., 2009)

De manière générale, les valeurs de FC du RNA-Seq corroborent celles des qPCR concernant l'effet des ions  $Ni^{2+}$  [Tableau 9]. Ces résultats montrent une induction significative du système AR2 par les différents ions testés aussi bien au niveau des protéines effectrices que des protéines régulatrices. L'une des hypothèses possibles sur l'activation des gènes de résistance au stress acide, serait que la présence des ions métalliques entraîne une variation de pH. Pour vérifier cela, nous avons mesuré le pH intracellulaire chez *E. coli* en présence ou non d'ions  $Ni^{2+}$ .

## 6.1 L'addition d'ions $Ni^{2+}$ dans le milieu diminue le pH intracellulaire

### 6.1.1 Expériences préliminaires

La technique que nous avons mise en place pour mesurer le pH intracellulaire fait intervenir la GFP<sup>1</sup>. Cette protéine purifiée à partir de la méduse *Aequora Victoria*, adopte une structure en tonneau  $\beta$  et composée de 11 brins anti-parallèles et d'une hélice  $\alpha$ . Dans le centre du cylindre se trouve le chromophore composé des résidus 64 à 66 (Li et al., 1997). Le spectre d'excitation

1. Green Fluorescence Protein

Tableau 9 – Expression des gènes impliqués dans l'adaptation au stress acide en fonction de différents stress métalliques

Gènes	RNA-Seq	Ni	Co	Cu	Zn
<i>emrY</i>	n.d	-1,44	n.d	1,63	2,13
<i>emrK</i>	n.d	1,25	n.d	n.d	n.d
<i>evgA</i>	n.d	-2,65	1,92	2,93	2,28
<i>evgS</i>	-2,95	-1,65	-1,19	n.d	n.d
<i>ydeO</i>	n.d	1,34	1,06	4,48	n.d
<i>gadE</i>	1,98	1,00	-1,01	-1,37	1,40
<i>mdtE</i>	1,50	2,36	1,40	-1,55	n.d
<i>mdtF</i>	n.d	1,84	1,44	-1,07	n.d
<i>gadC</i>	2,62	3,89	1,76	1,05	2,10
<i>gadB</i>	1,81	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>gadX</i>	2,29	2,78	2,00	1,77	4,37
<i>gadA</i>	2,31	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>hdeB</i>	3,43	3,10	n.d	n.d	2,23
<i>hdeA</i>	4,13	4,56	1,28	2,45	3,59
<i>hdeD</i>	1,99	3,49	n.d	-1,61	2,32
<i>adiC</i>	2,51	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>adiY</i>	3,42	2,77	-1,56	-2,47	n.d
<i>adiA</i>	n.d	1,26	1,34	1,38	2,01
<i>cadA</i>	n.d	1,95	1,14	1,68	1,52
<i>cadB</i>	n.d	1,45	-1,99	-1,77	-1,01
<i>cadC</i>	n.d	1,43	1,21	1,18	1,69
<i>ldcC</i>	n.d	n.d	-1,74	-1,02	1,58
<i>potE</i>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>speF</i>	n.d	2,41	-1,32	n.d	1,45

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'à  $D.O_{600nm} = 0,3$  et  $50 \mu\text{M}$  d'ions  $Ni^{2+}$ , de  $50 \mu\text{M}$   $Co^{2+}$ , de  $50 \mu\text{M}$   $Cu^{2+}$  ou  $250 \mu\text{M}$  de  $Zn^{2+}$  sont ajoutés pendant 10 min. Les ARNs sont extraits puis rétrotranscrits en ADN complémentaires. Les expressions des gènes impliqués dans la réponse au stress acide obtenues lors de l'analyse par RNA-Seq sont présentées ainsi que celles obtenues en qPCR. Les oligonucléotides utilisés sont répertoriés dans la table 3 des annexes. Les résultats représentent les ratios d'expressions comparées à la condition sans métaux (n.d= non déterminé).



de la GFP comporte une bande majeure à 365 nm et une bande mineure à 470nm [Figure 43]. Le chromophore dans son état protoné, ne fluoresce presque pas. Suite à une excitation à 395nm, la tyrosine 66 protonée transfère son proton vers l'acide glutamique 222. Il en résulte un chromophore déprotoné et fluorescent (McAnaney et al., 2002). Le principe de la technique utilisée pour notre étude est basée cette protonation du chromophore lors d'un pH acide. La fluorescence de la protéine est donc modifiée et ces variations peuvent être mesurées avec un spectrofluoromètre (Kneen et al., 1998) (Wilks and Slonczewski, 2007).

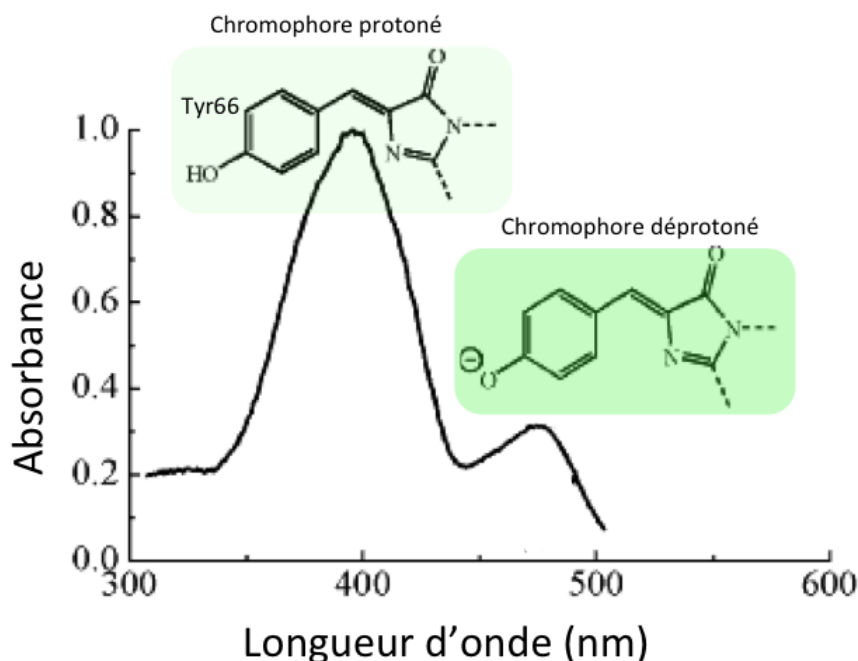


Figure 43 – **Etat de protonation et de déprotonation du chromophore de la GFP**

Spectre d'excitation de la GFP. Le pic majeur à 395 nm correspond au chromophore protoné fluorescent peu. Le pic mineur à 470 nm correspond au chromophore déprotoné fluorescent.

Avant de mettre au point cette technique nous permettant de mesurer le pH intracellulaire chez *E. coli*, nous avons au préalable vérifié que les ions  $Ni^{2+}$  ne diminuaient pas le pH du milieu. Nous avons mesuré le pH du milieu minimum M63 supplémenté de glucose, en ajoutant des concentrations croissantes d'ions  $Ni^{2+}$ . La présence des ions  $Ni^{2+}$  ne modifie pas la valeur du pH [Figure 44A.]. Les variations de fluorescence de la GFP pourraient être dues à un effet délétère direct des ions  $Ni^{2+}$  sur le fluorophore et/ou sur la structuration de la protéine *in vitro*. Il était donc important d'évaluer l'impact des ions  $Ni^{2+}$  sur la fluorescence de cette protéine. Pour cela, la GFP a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine Ni-NTA. Puis, nous avons mesuré la fluorescence de cette protéine avant et après l'ajout des ions  $Ni^{2+}$ . Un pourcentage de fluorescence en est déduit [Figure 44B.]. Lorsque les pourcentages de fluorescence sont comparés après l'ajout d' $H_2O$  ou du nickel, aucune différence entre le témoin et l'ajout des métaux n'est observée. Nous pouvons donc conclure que les ions  $Ni^{2+}$  n'impactent pas directement la fluorescence de la GFP.

En conclusion de ces expériences préliminaires, les ions  $Ni^{2+}$  ne diminuent pas le pH du

milieu, et n'affectent pas la fluorescence de la GFP.

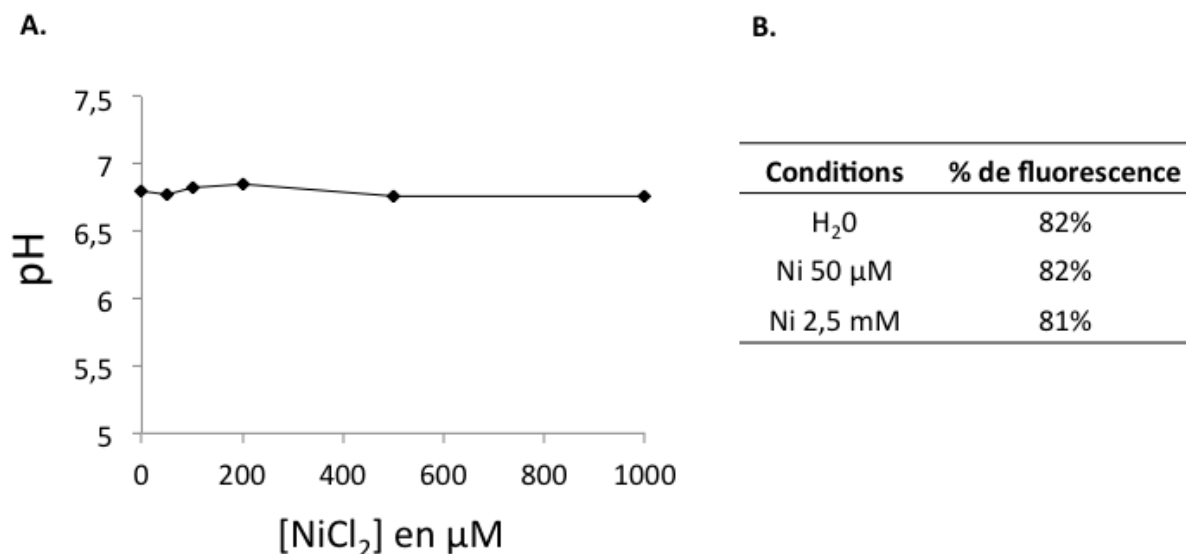


Figure 44 – Expériences préliminaires pour les mesures de pH intracellulaire.

**A.** Evaluation de l'impact des ions  $Ni^{2+}$  sur le pH du milieu. Le pH est mesuré après chaque ajout de concentration croissante d'ions  $Ni^{2+}$  dans du milieu minimum supplémenté de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ). **B.** La GFP a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine de Ni-NTA. Puis des mesures de fluorescence ont été réalisées sur un lecteur de plaque Infinite® M200<sup>2</sup> avant puis après incubation d' $H_2O$  ou d'ions  $Ni^{2+}$  à  $50 \mu\text{M}$  et à  $2,5 \text{ mM}$  pendant 10 min. Les résultats sont présentés en % de fluorescence entre les deux valeurs.

## 6.1.2 Mise au point de la technique

Dès les années 1980, des approches pour mesurer le pH ont été mises au point. Il s'agissait de titrer le phosphate et le méthylphosphonate par RMN<sup>3</sup> avec du  $^{31}\text{P}$  (Slonczewski et al., 1982) ou bien d'évaluer la pénétration des acides radiomarqués à travers la membrane (Zilberstein et al., 1984). Mais ces techniques ont une faible sensibilité et évaluent uniquement la différence de pH transmembranaire. Elle ne mesurent pas le pH cytoplasmique indépendamment du pH extérieur. Une alternative à ces techniques est proposée. Il s'agit d'utiliser des protéines fluorescentes sensibles au pH. Elles offrent de meilleures possibilités pour mesurer le pH intracellulaire. Afin de déterminer l'impact des métaux sur le pH intracellulaire bactérien, une technique basée sur la sensibilité au pH de la GFP (Kneen et al., 1998) (Wilks and Slonczewski, 2007) a été mise en place. L'objectif est de pouvoir mesurer à la fois le pH cytoplasmique et le pH périplasmique. Pour cela, deux constructions plasmidiques différentes sont nécessaires.

### 6.1.2.1 Mesure du pH cytoplasmique

Pour mesurer le pH cytoplasmique nous transformons les cellules d'*E. coli* avec un plasmide possédant la YFP<sup>4</sup> qui est une protéine dérivée de la GFP. En effet, cette protéine fluorescente reste dans le cytoplasme et est sensible aux réactions de protonation. Les cultures sont réalisées

3. Résonance Magnétique Nucléaire

4. Yellow Fluorescence Protein

en milieu minimum, PIPES<sup>5</sup>, pH 7,5 supplémenté par du glycérol, de l'hydrolysate de caséine et du glucose comme source de carbone. Les cellules sont cultivées à 37°C jusqu'à  $D.O_{600nm} = 0,8$ . Les cellules sont centrifugées et les culots sont repris dans du milieu de resuspension (M63, PIPES, glucose, glycérol, de l'hydrolysate de caséine à différents pH (de 5 à 7,5)). Nous pouvons ainsi réaliser une gamme étalon en mesurant la fluorescence de ces différents échantillons [Figure 45A.]. Une corrélation entre l'intensité de fluorescence et les valeurs de pH peut être observée.

Pour la mesure de l'effet du nickel, des cultures sont resuspendues dans du milieu de resuspension à pH 7,5. A ces cultures sont rajoutées soit de l' $H_2O$ , de l'acide chlorhydrique ou des ions  $Ni^{2+}$  [Figure 45B.]. En présence d'eau, après cinq minutes d'incubation, aucune variation de pH au cours du temps n'est mesurée. Au contraire, lorsque de l'acide chlorhydrique est additionné, une diminution de l'intensité de fluorescence reflétant une diminution du pH est observée. Cette diminution de pH est progressive. Dès la première minute, le pH initialement à 7,5 chute à pH 6 puis se stabilise à pH 5 après 6 minutes d'incubation. De la même façon, lorsque sont rajoutés les ions  $Ni^{2+}$  à 1 mM, une diminution de l'intensité de fluorescence est mesurée et de manière plus importante avec 5mM d'ions  $Ni^{2+}$ . En effet, le pH chute presque instantanément à pH 5. Cela suggère donc que les ions  $Ni^{2+}$  diminuent le pH cytoplasmique. La même expérience est répétée sur des cellules resuspendues dans le milieu de resuspension équilibré à différents pH durant cinq minutes d'incubation. Il est supposé qu'une équilibration s'opère entre le pH intracellulaire et le pH extracellulaire après les cinq minutes d'incubation. Lorsque de l' $H_2O$  est ajouté, après 5 minutes, aucune variation de pH n'est détectée [Figure 45C.]. Or, si la même expérience est réalisée en ajoutant des ions  $Ni^{2+}$ , une diminution de l'intensité de fluorescence est mesurée à pH 7,5; 7; 6,5 [Figure 45D.]. Les diminutions de la fluorescence reflètent une diminution du pH d'environ 0,5 unité de pH lors d'un stress aux ions  $Ni^{2+}$ . Les cultures resuspendues dans le milieu à pH 5 présentent une diminution de la fluorescence moindre. La solution de tampon PIPES maintient le pH à une valeur minimal de 6. C'est pourquoi les mesures à des pH plus faibles ne peuvent pas être réalisés et qu'une saturation du pH est observée.

Grâce à cette technique, nous sommes capables de mesurer dans le cytoplasme des variations de pH induites par les ions  $Ni^{2+}$ . Les mêmes résultats ont été obtenus avec les ions  $Co^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ <sup>6</sup>.

#### 6.1.2.2 Mesure du pH périplasmique

Pour mesurer le pH du périplasma, nous transformons les cellules avec un plasmide contenant une dérivée de la GFP, appelée RR-GFP. Ce plasmide contient le gène codant pour la GFP sous contrôle d'un promoteur ParaBAD inductible par l'arabinose. Une séquence signal Tat<sup>8</sup> a été fusionnée à ce gène permettant ainsi l'export de la GFP sous forme repliée dans le périplasma. Les cultures sont réalisées dans le même milieu que précédemment mais à  $D.O_{600nm} = 0,8$ , le glucose est remplacé par l'arabinose afin d'induire la synthèse de la protéine RR-GFP. L'induction va permettre la production de la GFP et son transport vers le périplasma. La

5. acide 1,4-Piperazine-2- Ethanesulfonique

6. données non montrées

8. Twin-arginine translocation

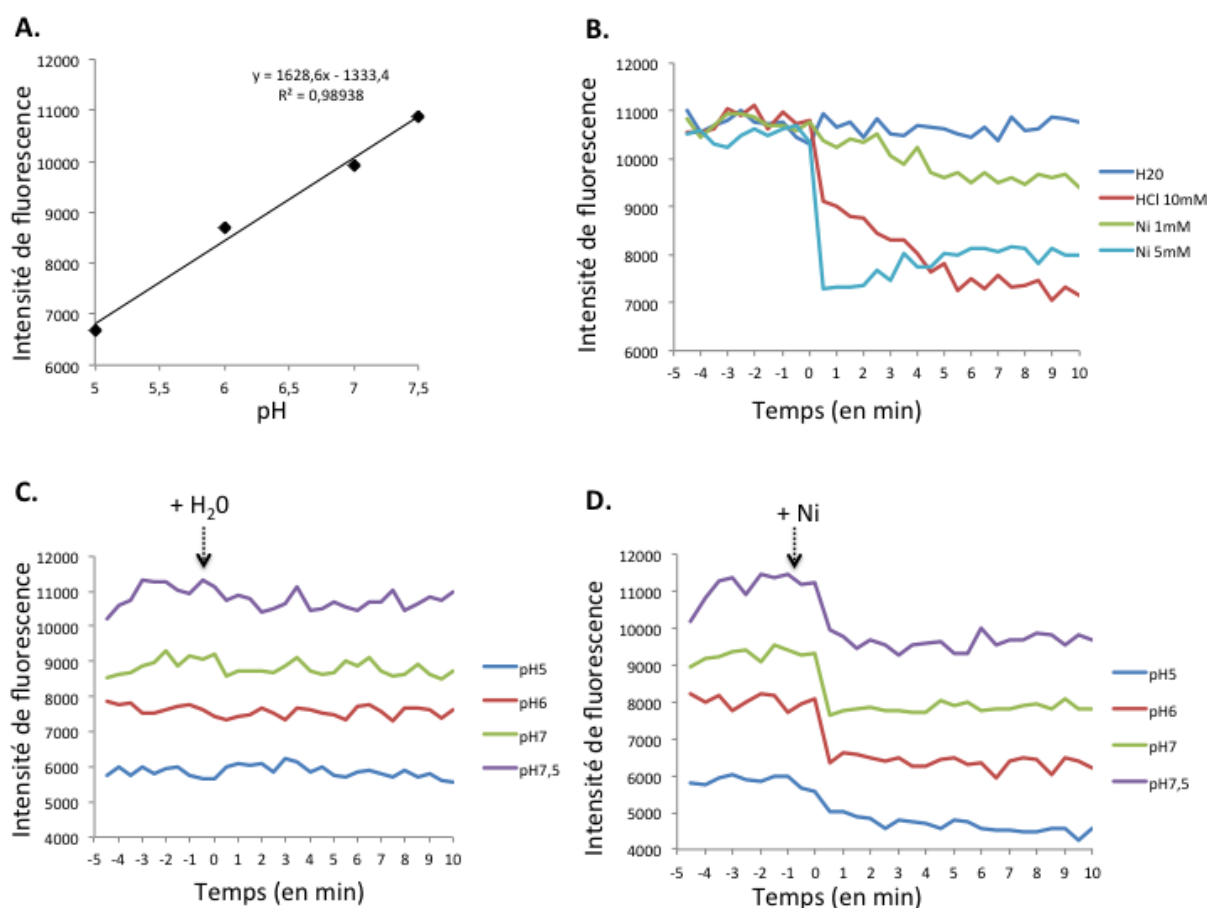


Figure 45 – Mesure du pH cytoplasmique et impact des ions  $Ni^{2+}$  sur le pH intracellulaire

Des cultures d'*E. coli* transformées avec un plasmide contenant la YFP sont réalisées dans du milieu minimum M63, PIPES<sup>7</sup> 20 mM, pH 7,5 supplémenté par du glycérol 0,8%, de l'hydrolysate de caséine 1,5% et de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>). Les cellules sont cultivées jusqu'à  $D.O_{600nm}$  0,8 à 37°C. 0,4 de  $D.O_{600nm}$  de cellules sont centrifugés. Les culots sont repris dans du milieu de resuspension (M63, PIPES, glucose, glycérol, de l'hydrolysate de caséine équilibré à différents pH (de 5 à 7,5)). La fluorescence est mesurée grâce à un lecteur de plaque avec des longueurs d'ondes d'excitation de 505nm et d'émission de 550 nm. 200  $\mu l$  d'échantillon sont déposés dans une plaque noire 96 puits à fond transparent. **A.** Gamme étalon permettant de corréliser l'intensité de fluorescence aux valeurs de pH. **B.** Mesure de l'intensité de fluorescence au cours du temps, de cultures stabilisées à pH 7,5 pendant 5 min, puis ajout d' $H_2O$ , de HCl 10 mM ou d'ions  $Ni^{2+}$  à 50  $\mu M$  et à 2,5 mM à  $t=0$ . **C. et D.** Mesure de la fluorescence des cultures équilibrées à des valeurs de pH comprises entre 5 et 7,5. Après 5 minutes d'incubation, de l' $H_2O$  ou des ions  $Ni^{2+}$  à 2,5 mM sont ajoutés.

production est stoppée par l'ajout de rifampicine, cet antibiotique ayant pour cible l'ARN polymérase permettant d'épuiser la GFP dans le cytoplasme. Afin de vérifier la bonne exportation de la GFP dans le périplasma, les cellules sont visualisées au microscope à épifluorescence [Figure 46]. Sans la rifampicine, la GFP se situe à la fois dans le cytoplasme pour sa synthèse et dans le périplasma après son exportation. En présence de l'antibiotique, la GFP est détectée sur les contours de la cellule, reflétant l'accumulation de la GFP dans le périplasma. Le pH mesuré avec cette technique correspondra bien au pH de l'espace périplasmique.

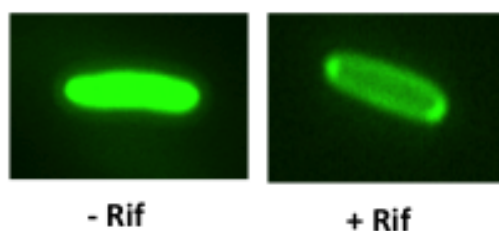


Figure 46 – Effet de la rifampicine sur les cellules exprimant la GFP exportée dans le périplasma.

Des cultures d'*E. coli* transformées avec un plasmide contenant la RR-GFP sont réalisées dans du milieu minimum M63, PIPES<sup>9</sup> 20 mM, pH 7,5 supplémenté par du glycérol 0,8 %, de l'hydrolysate de caséine 1,5 % et de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>). Les cellules sont cultivées jusqu'à D.O<sub>600nm</sub> 0,8 à 37°C. Le glucose est remplacé par l'arabinose pour permettre la synthèse de la GFP dans le périplasma. La production est stoppée par l'ajout (+Rif) ou non (-Rif) de rifampicine à une concentration finale de 150 µg/ml permettant ainsi la visualisation de la GFP uniquement dans le périplasma. Observations au microscope à épifluorescence à l'objectif X 100.

La mesure de la fluorescence est réalisée comme décrit dans le paragraphe ci-dessus. De la même façon que précédemment, une gamme étalon est réalisée. Une corrélation entre l'intensité de fluorescence et les valeurs de pH est également observée [Figure 47A.]. Le pH périplasmique des cellules en fonction des différents pH du milieu est mesuré au cours du temps et aucune variation de pH en présence d'H<sub>2</sub>O n'est détectée [Figure 47B.]. Au contraire, en présence d'ions  $Ni^{2+}$  ou de HCl, une diminution du pH est observée [Figure 47C. et D.].

Cette technique permet donc bien de mesurer les variations de pH dans le périplasma.

Cette technique basée sur les protéines fluorescentes sensibles au pH fonctionne bien dans notre cas. En effet, nous avons mis en évidence que les ions  $Ni^{2+}$  induisent une diminution du pH dans le cytoplasme ainsi que dans le périplasma. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus avec l'analyse du transcriptome qui montre que lors d'un stress aux ions  $Ni^{2+}$ , l'expression des gènes en réponse au stress acide est activé. Cependant l'effet des ions  $Ni^{2+}$  sur le pH du périplasma est moindre, contrairement à l'effet sur le pH cytoplasmique. En effet, le nickel entraîne une diminution de pH d'environ 0,25 unité de pH alors que dans le cytoplasme, les ions  $Ni^{2+}$  entraînent une diminution jusqu'à 0,5 unité de pH. Les ions  $Co^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  sont également capables de diminuer le pH périplasmique<sup>11</sup>.

Nous avons voulu savoir ensuite si les ions  $Ni^{2+}$  pouvaient être néfastes dans la résistance au stress acide. C'est pourquoi, nous avons décidé d'étudier l'impact des ions  $Ni^{2+}$  sur la survie

11. données non montrées

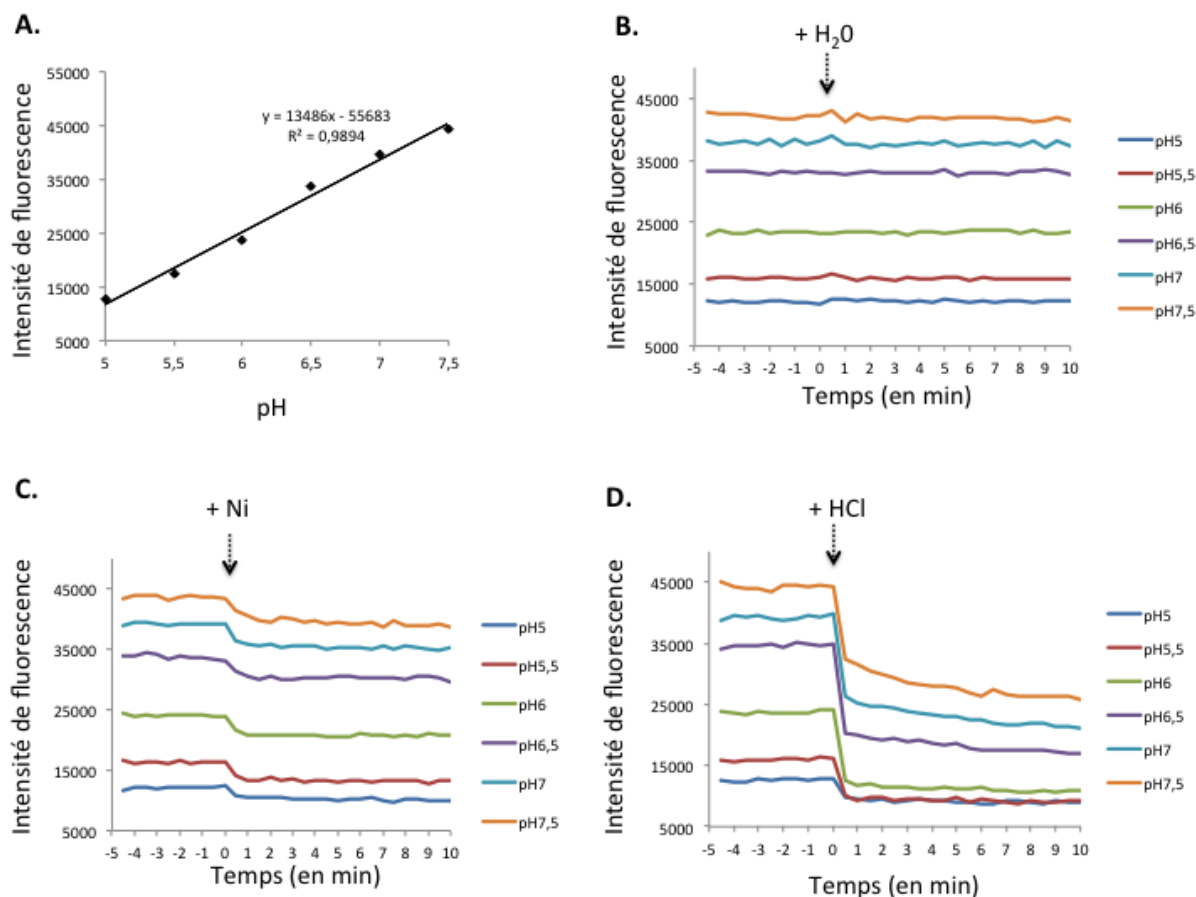


Figure 47 – Mesure du pH intracellulaire périplasmique et impact des ions  $Ni^{2+}$  sur le pH

Des cultures de cellules d'*E. coli* transformées avec un plasmide contenant la RRGFP sont réalisées dans du milieu minimum M63, PIPES<sup>10</sup> 20mM, pH 7,5 supplémenté par du glycérol 0,8%, de l'hydrolysate de caséine 1,5% et de glucose ( $2\text{ g.l}^{-1}$ ). Les cellules sont cultivées jusqu'à  $D.O_{600nm}$  0,8 à 37°C. Le glucose est remplacé par l'arabinose pour permettre la synthèse de la GFP dans le périplasm. La production est stoppée par l'ajout de rifampicine à une concentration finale de  $150\ \mu\text{g/ml}$  permettant ainsi de visualiser uniquement de la fluorescence dans le périplasm. 0,4 de  $D.O_{600nm}$  de cellules sont centrifugés et les culots sont repris dans du milieu de resuspension (M63, PIPES, glucose, glycérol, et de l'hydrolysate de caséine équilibré à différents pH (de 5 à 7,5)). La fluorescence est mesurée grâce à un lecteur de plaque avec des longueurs d'ondes d'excitation de 505nm et d'émission de 550 nm. 200  $\mu\text{l}$  d'échantillon sont déposés dans une plaque noire 96 puits à fond transparent. **A.** Gamme étalon permettant de corréliser l'intensité de fluorescence aux valeurs de pH. **B., C. et D.** Mesure de la fluorescence au cours du temps, de cultures équilibrées à des valeurs de pH comprises entre 5 et 7,5. Après 5 minutes d'incubation, de l' $H_2O$ , des ions  $Ni^{2+}$  à 2,5 mM ou de HCl à 10 mM sont ajoutés

des mutants des gènes impliqués dans la résistance à l'acidité.

### 6.1.3 Etude de l'adaptation des mutants pour les gènes impliqués dans le système de résistance à l'acidité glutamate-dépendante à un stress provoqué par le nickel

Les ions  $Ni^{2+}$  entraînent une variation dans l'expression des gènes impliqués dans la résistance à l'acidité. Nous venons de montrer que les ions Ni entraînent des variations de pH cytoplasmique et périplasmique. C'est pourquoi, nous nous sommes demandé si ces gènes jouaient un rôle dans l'adaptation à un stress métallique. Le système AR2, glutamate dépendant, est l'un des systèmes majeurs dans la résistance à l'acidité. Ainsi, des profils de résistance aux ions  $Ni^{2+}$  pour les mutants des gènes impliqués dans cette voie ont été testés.

Tout d'abord, l'analyse des mutants pour le système à deux composants, senseur-régulateur, EvgS et EvgA a été effectuée. La protéine régulatrice, une fois phosphorylée, induit la transcription des gènes de résistance à l'acidité de la voie dépendante du glutamate [Figure 42]. Les mutants  $\Delta evgS$  et  $\Delta evgA$  ne présentent aucune différence de sensibilité aux ions  $Ni^{2+}$  comparés à la souche sauvage [Figure 48A.].

Des mutants pour les régulateurs centraux YdeO et GadE ont été testés pour leurs sensibilités aux ions  $Ni^{2+}$ . YdeO est décrit comme étant un activateur du gène *gadE* durant la phase exponentielle de croissance en milieu minimum glucose (Ma et al., 2004). D'ailleurs, EvgA et YdeO ont un effet additionnel sur la transcription du gène *gadE*, et EvgA est capable d'induire indirectement le gène *gadE* en phosphorylant au préalable YdeO. GadE quant à lui, est l'activateur des gènes *gadAB* et *gadC*, codant respectivement les glutamates décarboxylases et le transporteur de l'acide glutamique :4-aminobutyrate (Ma et al., 2004). Aucun des deux mutants  $\Delta ydeO$  et  $\Delta gadE$  n'est sensible aux ions  $Ni^{2+}$  [Figure 48B.].

Nous avons ensuite testé les véritables effecteurs de la lutte contre l'acidité. Il s'agit des glutamate décarboxylases A et B ainsi que le transporteur de l'acide glutamique :4-aminobutyrate, GadC. Cependant, les séquences géniques de *gadA* et *gadB* sont identiques à 98%. Il est donc impossible de réaliser des mutants pour ces deux gènes. Le mutant  $\Delta gadE$  a été testé pour sa sensibilité aux ions. Comme pour les régulateurs, le mutant de ce transporteur ne présente pas sensibilité aux ions  $Ni^{2+}$ .

Enfin, les gènes codants les protéines MdtE et MdtF sont régulés par YdeO et le système à deux composants EvgAS (Itou et al., 2009). Les protéines MdtE et MdtF effluent plus de 20 composés toxiques comme le cristal violet, le deoxycholate ou le SDS<sup>12</sup> (Nishino and Yamaguchi, 2002). Les gènes *mdtE* et *mdtF* sont légèrement induits lors d'un stress nickel. L'hypothèse selon laquelle, l'efflux de cations par ces transporteurs, peut être émise. Pour démontrer cela, des déterminations de CMI ont été effectuées sur les mutants  $\Delta mdtE$  et  $\Delta mdtF$  [Figure 48C.]. Les ions  $Ni^{2+}$  ne semblent pas toxiques chez ces mutants.

Pour conclure sur ces expériences, l'excès de nickel induit les systèmes de résistance au stress acide. Cependant, les mutants pour les gènes impliqués dans cette voie ne sont pas essentiels dans la lutte contre le stress métallique.

12. Sodium Dodecyl Sulfate

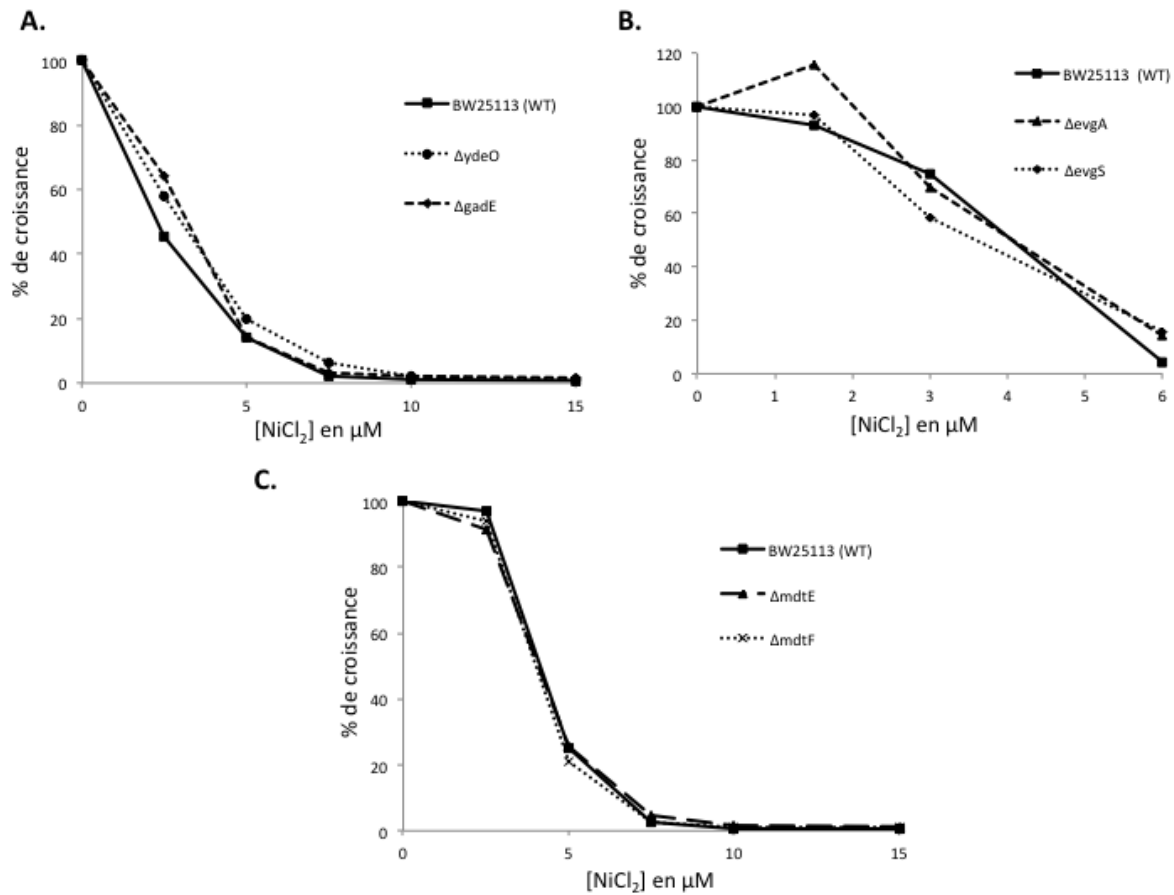


Figure 48 – Phénotype de résistance aux ions  $Ni^{2+}$  des mutants pour les gènes impliqués dans la résistance au stress acide.

Les cultures bactériennes des différents mutants et de la souche sauvage sont réalisées dans du milieu minimum liquide, supplémenté de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) en aérobiose à  $37^\circ \text{C}$  avec des concentrations croissantes de  $NiCl_2$  pendant 16h. Les  $D.O_{600nm}$  sont ensuite mesurées. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métaux. Une expérience représentative est présentée. Test des mutants **A.**  $\Delta evgA$  et  $\Delta evgS$  **B.**  $\Delta ydeO$  et  $\Delta gadE$  **C.**  $\Delta mdtE$  et  $\Delta mdtF$ .

**Conclusion :** L'analyse transcriptomique a révélé que le stress nickel induisait une augmentation de la réponse au stress acide. En effet, les gènes impliqués dans la résistance à l'acidité sont induits. L'utilisation de protéines fluorescentes sensibles au pH montre que le nickel acidifie le milieu intracellulaire des bactéries à la fois dans le périplasme et dans le cytoplasme. Nous avons montré que les mutants pour les gènes impliqués dans la résistance à l'acidité ne sont pas plus sensibles aux ions  $Ni^{2+}$ , suggérant que ces gènes ne sont pas essentiels dans l'adaptation à un stress métallique.





# Chapitre 7

## Impact des ions $\text{Ni}^{2+}$ sur la motilité cellulaire

La vie planctonique des bactéries est caractérisée par la croissance et la dispersion des cellules dans un milieu liquide. Plusieurs mécanismes de motilité bactérienne sont décrits dans la littérature [Figure 49] (Kearns, 2010). Le déplacement de type "swarming" est un mouvement rapide multicellulaire des bactéries sur une surface et est alimenté par la rotation des flagelles. Les flagelles sont des machines moléculaires complexes composées de plus de 40 protéines.

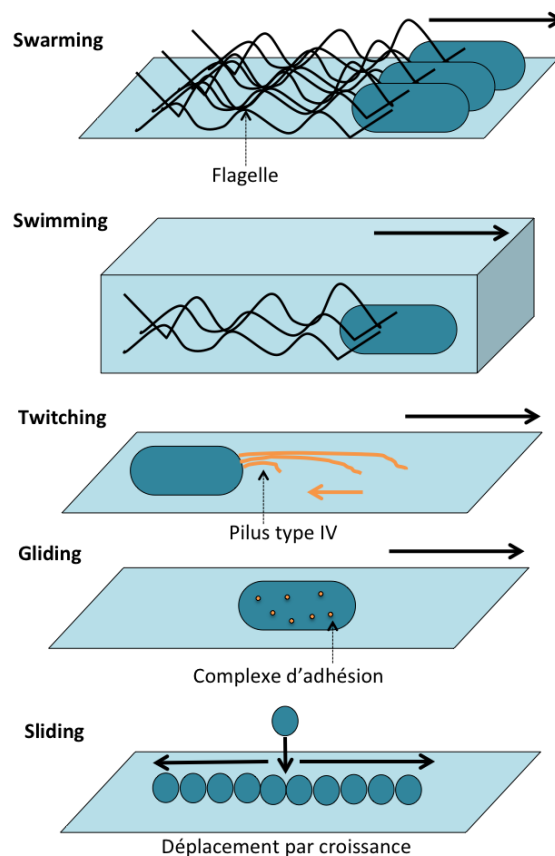


Figure 49 – La motilité chez les bactéries

La motilité de type "swarming" est définie comme le déplacement multicellulaire sur une surface par la force flagellaire. De la même façon, le "swimming" nécessite la présence de flagelles mais ce mouvement est défini pour une bactérie unique se déplaçant dans un milieu liquide. Le "twitching" nécessite la présence de pili de type IV et est caractérisé par une contraction et rétraction de ces pili. Le "gliding" fonctionne uniquement avec des complexes d'adhésion. Le "sliding" est un déplacement passif par croissance. Figure adaptée d'après (Kearns, 2010)

Le déplacement de type "swimming" est aussi médié par la rotation des flagelles mais contrairement au "swarming", il s'agit du mouvement d'une bactérie unique dans un milieu liquide. Le déplacement de type "twitching" est caractérisé par des contractions et des rétractions des pili de type IV. Ce mouvement est lent et saccadé. La motilité de type "gliding" se produit le long d'un axe et ne nécessite pas la présence de flagelles ni de pili mais de complexes d'adhésion qui se lient à un substrat présent à la surface. Enfin, la motilité de type "sliding" est une forme passive de déplacement. Elle est facilitée par des agents tensioactifs qui réduisent la tension superficielle et les bactéries sont poussées par pression vers l'extérieur.

Pour lutter contre les stress de l'environnement comme par exemple l'acidité ou la présence d'antibiotiques, les bactéries ont la capacité de former un biofilm microbien (Skandamis et al., 2009). Les biofilms sont définis comme un ensemble de cellules adhérentes, formé par une seule ou plusieurs espèces microbiennes. La cohésion des bactéries en biofilm est assurée par des protéines adhésives et par une matrice de substances polymères (Prigent-Combaret et al., 2000). Des études précédentes au laboratoire ont montrées que le stress nickel induisait une augmentation de l'épaisseur et de la densité d'un biofilm (Perrin et al., 2009). Cet effet n'est pas corrélé à des modifications physico-chimiques de la surface cellulaire par le nickel mais à une induction de la production de curli. Les curli sont des polymères protéiques qui forment un réseau de fibres à la surface des bactéries (Chapman et al., 2002). Dans le second chapitre, l'analyse générale d'un stress aux ions  $Ni^{2+}$  a révélé une répression des gènes de synthèse des flagelles, ce qui laisse penser que le stress métallique induit l'arrêt d'un mode de vie planctonique pour passer à un mode de vie de type biofilm.

Ce chapitre discutera des résultats obtenus par l'analyse transcriptomique et de l'impact que peut avoir un excès d'ions  $Ni^{2+}$  sur la motilité cellulaire et sur le mode de vie de la bactérie.

## 7.1 Les ions $Ni^{2+}$ induisent la répression des gènes de synthèse des flagelles

Les travaux d'Hengge (Mika and Hengge, 2013) sur la motilité ont montré qu'il existait un passage entre la vie planctonique et le mode de vie en biofilm. Cette interversion serait orchestrée par le facteur  $\sigma^S$  de l'ARN polymérase [Figure 50] (Pesavento et al., 2008) (Pesavento and Hengge, 2012). Nos données de RNA-Seq sont totalement cohérentes avec le fait qu'un stress Ni entraîne un changement de mode vie de type planctonique pour un mode de vie de type biofilm. En effet, le gène *rpoS* est 5,7 fois plus transcrit lors d'un stress aux ions  $Ni^{2+}$ . Cela entraîne la répression des gènes de synthèse des flagelles et l'activation des gènes permettant la production des curli. Si le taux de variation est fixé à 4,5 ( $p < 0,05$ ), 6% de gènes réprimés sont impliqués dans la motilité cellulaire (cf tables 1 et 2 dans les annexes).

Parmi ces gènes différentiellement exprimés, les régulateurs FlhD et FlhC sont très fortement réprimés avec respectivement des taux d'expression de -14,88 et -14,67. Ces gènes sont dits de classe I [Figure 51].

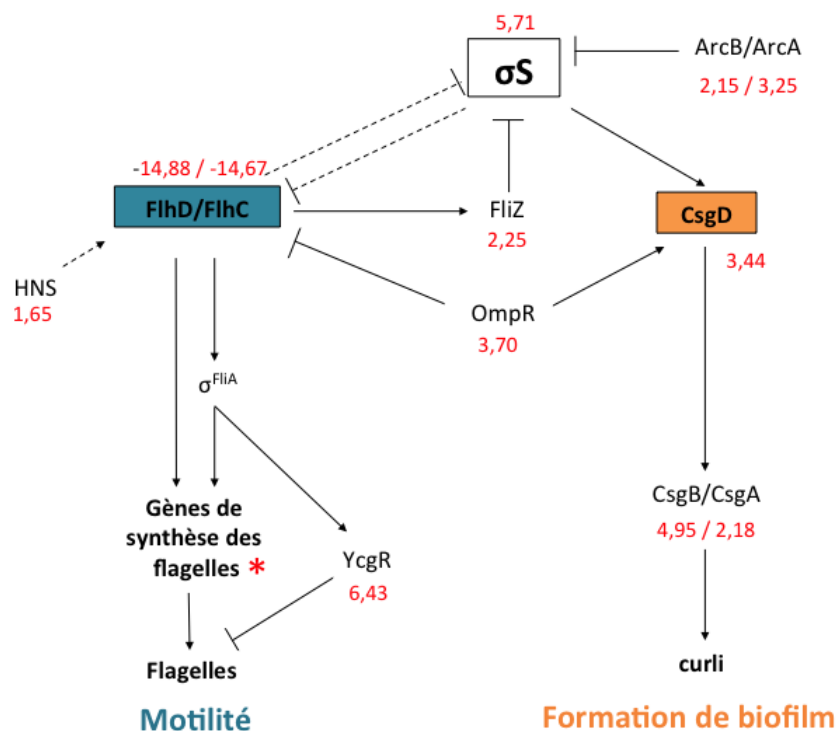


Figure 50 – Le passage de la motilité cellulaire au mode de vie biofilm est médié par le facteur  $\sigma S$

Réseau de régulation contrôlant la mobilité et la formation de biofilm. Les taux de variations obtenus par le RNA-Seq sont indiqués en rouge. Les traits pleins représentent les régulations directes et les traits en pointillés les régulations indirectes. Les fonctions des protéines présentées sur ce schéma sont listées dans le tableau 10. (\*) : La liste des gènes impliqués dans la synthèse des flagelles qui sont différentiellement exprimés lors d'un excès d'ions Ni<sup>2+</sup> est présenté dans le tableau 11. Figure adaptée d'après (Mika and Hengge, 2013)

Tableau 10 – Fonctions des protéines impliquées dans la motilité et la formation de biofilm

Motilité		Biofilm	
Protéines	Fonctions	Protéines	Fonctions
RpoS	facteur $\sigma S$ ARN polymérase	RpoS	facteur $\sigma S$ ARN polymérase
OmpR	régulateur transcriptionnel	OmpR	régulateur transcriptionnel
FlhD	régulateur transcriptionnel	ArcA	régulateur de réponse
FlhC	régulateur transcriptionnel	ArcB	senseur histidine kinase
H-NS	protéine associée au nucléoïde	CsgD	activateur transcriptionnel
FliZ	répresseur transcriptionnel	CsgB	sous-unité mineure de curli
YcgR	régulateur	CsgA	sous-unité majeure de curli
FliA	facteur $\sigma F$ ARN polymérase		

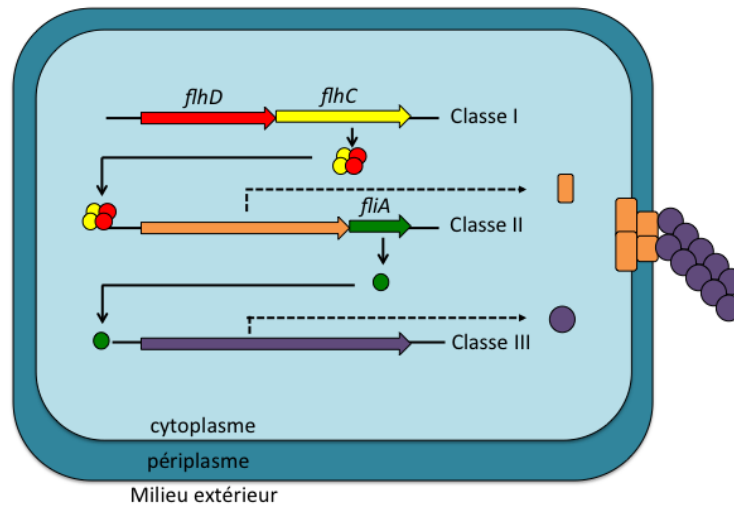


Figure 51 – Régulation de la synthèse des flagelles

Les gènes de classe I *flhD* et *flhC* codent pour des régulateurs centraux. Les protéines forment un complexe qui va activer la synthèse des gènes de classe II. Ces gènes de classe II contiennent les gènes codant les protéines formant le corps basal du flagelle et *fliA* codant la sous-unité  $\sigma F$  de l'ARN polymérase. Ce facteur  $\sigma F$  va activer la transcription des gènes de classe III codant les protéines de flagelles.

Les protéines FlhD et FlhC forment un système régulateur activant les gènes de classe II (Chevance and Hughes, 2008). Ces gènes de classe II comprennent les gènes codant les protéines formant le corps basal du flagelle. Celui-ci répertorie 38 gènes dont les expressions de 18 sont réprimés lors d'un excès d'ions  $Ni^{2+}$  [Tableau 11]. Le gène *fliA* appartient également à la classe II. Ce gène code pour la sous-unité  $\sigma F$  de l'ARN polymérase. Ce facteur  $\sigma F$  va à son tour réguler les gènes de classe III, constituée de 29 gènes. Ces gènes codent les protéines de filament comme par exemple le gène *fliC*. Seulement 2 gènes appartenant à la classe III sont réprimés lors d'un stress Ni [Tableau 11]

Les informations obtenues par l'analyse RNA-Seq combinées aux données de la littérature suggèrent que la synthèse des flagelles est affectée lors d'un stress métallique. Cette régulation impacte le style de vie des bactéries. Nous avons donc vérifié expérimentalement l'impact d'un stress métallique sur la motilité et notamment sur la synthèse des flagelles.

Tableau 11 – Gènes impliqués dans la synthèse des flagelles dont l'expression est réprimée lors d'un excès d'ions  $Ni^{2+}$ 

Gènes	FC	Fonction de la protéine	Classe
<i>flhC</i>	-14,68	Régulateur transcriptionnel avec FlhD	I
<i>flhD</i>	-14,89	Régulateur transcriptionnel avec FlhC	I
<i>flgF</i>	-2,05	Composant flagellaire du corps basal	II
<i>flgG</i>	-2,63	Composant flagellaire du corps basal	II
<i>flgH</i>	-3,62	Protéine flagellaire du corps basal	II
<i>flgI</i>	-5,28	Prédit pour une protéine du corps basal du flagelle	II
<i>flgJ</i>	-6,81	Muramidase	II
<i>flhE</i>	-2,80	Protéine de flagelle	II
<i>fliE</i>	-12,41	Composant flagellaire du corps basal	II
<i>fliG</i>	-3,47	Composant du moteur flagellaire	II
<i>fliH</i>	-4,14	Protéine de synthèse de flagelle	II
<i>fliI</i>	-4,75	ATP synthase spécifique de flagelle	II
<i>fliJ</i>	-5,58	Protéine de flagelle	II
<i>fliK</i>	-7,41	Protéine de contrôle de la taille du coude	II
<i>fliM</i>	-3,39	Composant du moteur flagellaire	II
<i>fliN</i>	-3,94	Composant du moteur flagellaire	II
<i>fliO</i>	-6,11	Protéine de synthèse de flagelle	II
<i>fliP</i>	-10,61	Protéine de synthèse de flagelle	II
<i>fliQ</i>	-13,88	Protéine de synthèse de flagelle	II
<i>fliR</i>	-20,56	Protéine de synthèse de flagelle	II
<i>cheB</i>	-2,80	Protéine régulatrice	III
<i>cheY</i>	-3,19	Protéine régulatrice	III

Sont indiqués dans ce tableau, les gènes impliqués dans la synthèse des flagelles qui sont réprimés lors d'un stress Ni avec un  $FC \geq 2$ .

## 7.2 Mesure de la nage bactérienne en présence d'un excès d'ions $Ni^{2+}$

Pour tester l'impact des ions  $Ni^{2+}$  sur la synthèse des flagelles, nous avons réalisé un test de "swimming". Il s'agit de déposer des bactéries sur une gélose molle en présence ou non de métaux et de visualiser 48 h après, un halo de cellules correspondant à la nage bactérienne [Figure 52 A].

Il est observé une diminution du halo qui correspond à une diminution de la motilité cellulaire lorsque les concentrations en métaux augmentent. Toutefois, nous avons réalisé en parallèle des profils de sensibilité aux ions  $Ni^{2+}$  sur un milieu solide [Figure 52 B] ainsi que dans un milieu liquide [Figure 52 C]. Il n'y a pas de sensibilité aux ions  $Ni^{2+}$  lorsque les bactéries sont cultivées en milieu solide. Cependant, une létalité des cellules cultivées en milieu liquide dès  $10 \mu M$  d'ions  $Ni^{2+}$  est observée. Les différences de profils de résistance aux métaux en fonction du milieu de culture suggèrent que les ions  $Ni^{2+}$  ne sont pas disponibles de la même façon.

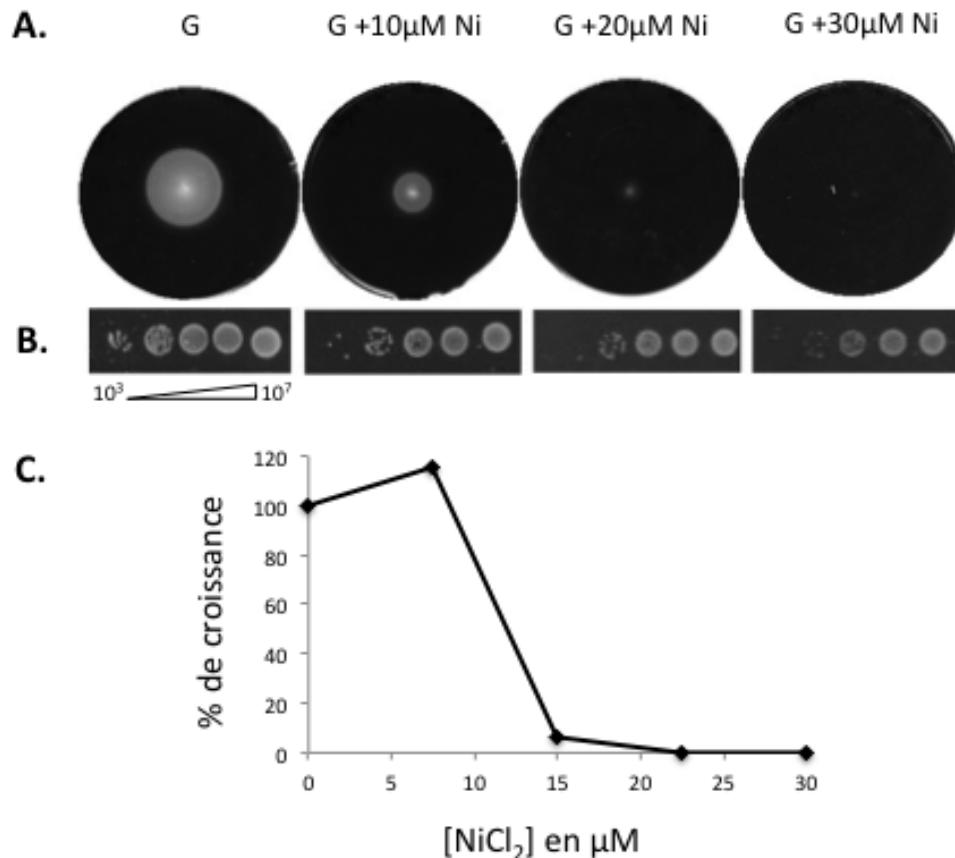


Figure 52 – Effet des ions  $Ni^{2+}$  sur la motilité et la croissance cellulaire.

Une culture bactérienne d' *E. coli* W3110 est réalisée dans du milieu minimum, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobie à 37 °C jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $D.O_{600nm} = 0,6$ ). **A.** Test de "swimming" : Dépôt de 5  $\mu$ l de bactéries à  $D.O_{600nm} = 0,6$  sur des géloses molles (agar 0,2 %) de milieu minimum additionné de glucose et supplémenté ou non d'une concentration croissante en  $NiCl_2$ . Les boîtes sont ensuite incubées 48 h à 30°C en aérobie. **B.** CMI sur boîtes : Les cultures à  $D.O_{600nm} = 0,6$  sont diluées en cascades de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup> dans du milieu M63. 5  $\mu$ l des dilutions contenant de 10<sup>3</sup> à 10<sup>7</sup> bactéries/mL sont déposées sur boîte de milieu minimum supplémenté ou non par une concentration croissante de  $NiCl_2$ . Les boîtes sont ensuite placées à 37°C en aérobie pendant 24 h. **C.** Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum liquide, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobie à 37 °C avec des concentrations croissantes de  $NiCl_2$  pendant 16 h. Les  $D.O_{600nm}$  sont ensuite mesurées. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métaux. Des expériences représentatives sont présentées.

Or la gélose molle reflète sûrement plus un état liquide qu'un état solide. La diminution du halo dans le test de nage pourrait correspondre à la fois à une diminution de la motilité ou à une diminution de la croissance bactérienne. Ces tests de nage se sont avérés mal adaptés pour visualiser l'impact des métaux sur la motilité cellulaire.

### 7.3 Observation des flagelles

Nous avons donc envisagé une autre approche pour déterminer si oui ou non les ions  $Ni^{2+}$  impactaient la motilité cellulaire. Nous avons commencé à mettre au point une technique nous permettant de visualiser au microscope les flagelles des cellules bactériennes. Le but ultime étant de comparer des cellules stressées aux ions  $Ni^{2+}$  avec des cellules non stressées.

Pour cela nous avons marqué les flagelles avec un composé appelé Alexa Fluor® 488 C5 Maleimide<sup>1</sup>. Ce dernier fluoresce en vert lorsqu'il est excité à une longueur d'onde de 488 nm et a la particularité de réagir avec des groupements thiol. Pour cela nous avons utilisé une souche dérivée d'*E. coli* AW405 portant une substitution d'une sérine en cystéine dans le gène *fliC* codant pour les filaments de flagelles (Turner et al., 2000). Cet acide aminé possède un groupement thiol permettant la réaction avec l'Alexa Fluor® 488 et entraîne ainsi la fluorescence des flagelles. Lorsque les cellules traitées sont observées au microscope à épifluorescence, les flagelles sont visualisés très nettement [Figure 53 B].

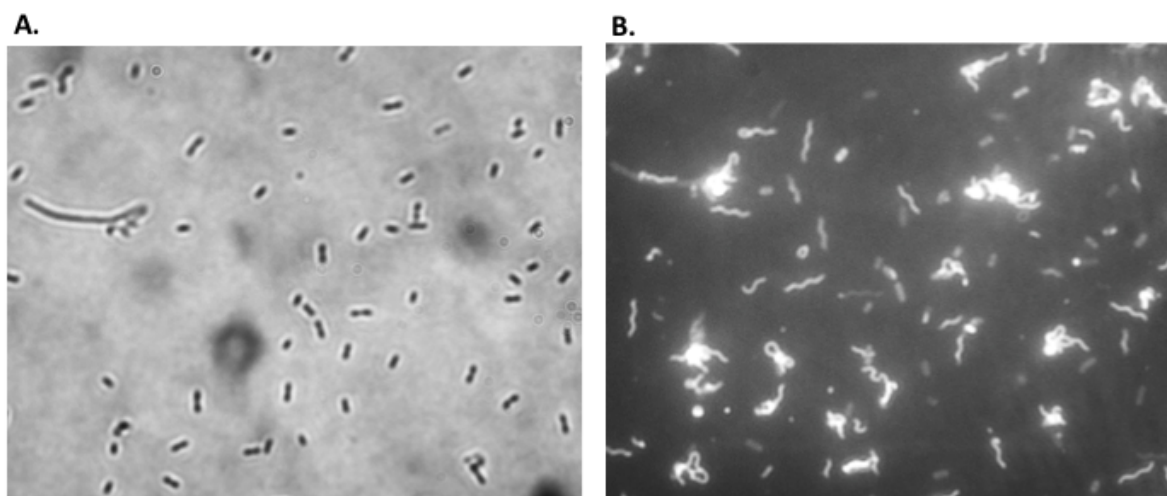


Figure 53 – Observation de flagelles marqués à l'Alexa Fluor® 488 au microscope à épifluorescence

Une culture bactérienne d'*E. coli* HCB1737 est réalisée dans du milieu minimum, supplémenté de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) en condition aérobie à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'à  $D.O_{600nm} = 1$ . Les cellules sont centrifugées à faible vitesse puis resuspendues dans un tampon de motilité. Après trois lavages, les flagelles sont marqués à l'Alexa Fluor et les cellules sont agitées délicatement pendant 1 heure à l'obscurité. 3 lavages sont réalisés avec du tampon de motilité et  $10 \mu\text{l}$  de cellules sont déposées dans une fine couche d'agarose à 0,3% entre lame et lamelle. L'observation est réalisée avec un microscope à épifluorescence à l'objectif 100. **A.** Observation des cellules en lumière blanche **B.** Observation des flagelles à une longueur d'onde de 488 nm.

1. Life technologies



Pour chaque flagelle correspond une cellule observée en lumière blanche [Figure 53 A]. Nous n'avons pas encore testé l'exposition aux ions  $Ni^{2+}$ , mais le but serait d'obtenir pour le même nombre de cellules observables en lumière blanche [Figure 53 A] soit moins de flagelles, soit des flagelles plus petits ou difformes.

**Conclusion :** Les données du RNA-Seq suggèrent que les ions  $Ni^{2+}$  induisent l'arrêt de la synthèse des flagelles ainsi qu'une induction de la production des curli pour la formation d'un biofilm. Ces deux modes de vie sont contrôlés essentiellement par le facteur  $\sigma S$  de l'ARN polymérase. La transcription du gène codant  $\sigma S$  est activée en présence d'ions  $Ni^{2+}$ . Les tests de "swimming" ne nous ont pas permis de visualiser la perte de motilité des cellules lors d'un stress métallique. L'objectif final de ses travaux étant de valider expérimentalement l'impact des ions  $Ni^{2+}$  sur la synthèse des flagelles, la prochaine étape est donc de pouvoir visualiser au microscope les appareils locomoteurs suite à un stress métallique.

# Chapitre 8

## La toxicité du Ni est liée à une modification de l'homéostasie du Cu et du Fe induisant un stress oxydant et générant un relâchement de l'ADN

Le chapitre 4 de ce manuscrit a été dédié à l'étude de l'homéostasie du nickel et en particulier à l'étude de l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ . Notre étude nous a amené à aborder l'homéostasie du cuivre car la protéine RcnB modulant l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  s'est avérée appartenir à la famille des cuproprotéines (Blériot et al., 2014). L'analyse transcriptomique initiée dans ces travaux confirme un peu plus l'idée que les homéostasies métalliques sont proches et interconnectées. En effet, l'excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  dans la cellule entraîne une augmentation de la transcription des gènes *cusCFBA*, codant une pompe d'efflux à cuivre (cf table 2 dans les annexes) mais également le système senseur régulateur CusRS (Taux de variation respectifs (FC de 4,42 et 1,75) et le régulateur CueR (FC de 2,31). Des profils de résistance aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  ont été réalisés chez les mutants  $\Delta\text{cusCFBA}^1$ . Aucune sensibilité n'a été détectée, ce qui suggère que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  ne sont pas efflués par ce système et qu'il existe probablement un autre lien entre ces deux métaux. De plus, les résultats de transcriptomique montrent que les gènes d'import du fer sont fortement réprimés. Si le taux de variation est fixé à 4,5 ( $p < 0,05$ ), 10% de gènes réprimés sont impliqués dans le métabolisme du fer (cf table 2 dans les annexes).

Ces deux exemples suggèrent fortement que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  induisent un remaniement des homéostasies des autres métaux. Nous avons donc voulu évaluer les teneurs en métaux lors d'un stress aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ .

### 8.1 L'excès d'ions $\text{Ni}^{2+}$ influence les homéostasies du Cu et du Fe

#### 8.1.1 Détermination des teneurs en métaux lors d'un stress métallique

Il existe plusieurs techniques pour quantifier les métaux. Le nickel peut être dosé par gravimétrie. Cette méthode d'analyse quantitative a pour but d'obtenir une séparation quantitative d'un cation  $\text{Ni}^{2+}$  (en solution aqueuse) par précipitation sélective d'un sel insoluble, le

---

1. données non montrées

diméthylglyoxime  $C_4H_8N_2O_2$  (ou  $H_2DMG$ ). Le  $H_2DMG$  forme avec le  $Ni^{2+}$  un complexe rouge insoluble dans l'eau. Cependant cette technique ne permet pas de doser précisément les concentrations de Ni intracellulaire car le  $H_2DMG$  est peu sensible. Ensuite, pour doser le fer libre, il est utilisé par exemple la streptonigrine qui est un antibiotique activé par le fer qui génère des anions superoxydes en fonction de la concentration en fer. Son effet est d'autant plus important que la concentration en fer intracellulaire libre augmente. Une étude a utilisé ce principe pour quantifier indirectement le fer libre en mesurant l'activité bactéricide de l'antibiotique (Frawley et al., 2013). Cette seconde technique est également très imprécise sur les quantités exactes de métaux dans la cellule car elle est également peu sensible. Nous avons donc décidé de réaliser des dosages par ICP<sup>2</sup> couplés à la spectrométrie de masse pour plusieurs raisons. Cette technique nous permet de doser plusieurs métaux sur un même échantillon et la spectrométrie de masse est plus précise que le couplage avec la technique OES<sup>3</sup>. Par contre, il est important de noter que cette technique dose la totalité des métaux, comprenant à la fois les métaux libres, les métaux associés aux protéines mais également les métaux se trouvant dans la matrice extracellulaire.

Nous avons envisagé deux types d'approches. La première a consisté à réaliser les cultures, suivies d'un lavage avec du tampon phosphate uniquement, nous permettant ainsi de mesurer les éventuels métaux accrochés à la matrice extracellulaire [Figure 54]. La seconde approche a consisté à réaliser les cultures suivi d'un lavage un peu plus stringent avec du tampon phosphate EDTA, entraînant l'élimination des métaux se trouvant dans la matrice extracellulaire [Figure 55]. Dans les deux cas, le Fe (**A.**), le Co (**B.**), le Ni (**C.**) et le Cu (**D.**) sont dosés par ICP-MS.

Dans la première expérience [Figure 54], les cultures suivies d'un lavage avec du tampon phosphate, ont été au préalable réalisées en présence d'un témoin  $H_2O$  (**1**), d'un stress Cu  $15 \mu M$  (**2**), d'un stress Ni  $10 \mu M$  (**3**) ou d'un stress Cu  $15 \mu M$  + Ni  $10 \mu M$  (**4**). Il est mesuré deux fois plus de Fe lors d'un stress Ni (**54.A.3**) et presque quatre fois plus lors d'un stress Ni + Cu (**54.A.4**). Les quantités de Co ne varient pas selon le stress métallique réalisé comparé à la condition témoin (**54.B.**). Il est important de noter que les quantités intracellulaires en Co sont très faibles comparées aux autres métaux. De manière attendue, la présence de Ni dans la cellule augmente par 4 les quantités de Ni dosées (**54.C.3**) et il est mesuré 8 fois plus de Ni lors d'un stress Ni + Cu (**54.C.4**). Ceci est surprenant, d'autant que le stress Cu seul n'augmente pas la quantité de Ni (**54.C.2**). Par contre lorsque les cellules sont stressées avec du Ni (**54.D.3**), la quantité de Cu est multipliée par deux et est équivalente à la quantité de Cu mesurée lors d'un stress Cu (**54.D.2**). Comme observé pour les dosages de Ni, la condition Ni + Cu augmente par 20 la quantité de Cu par rapport à la condition sans métaux (**54.D.4**) et par 7 par rapport à la condition Ni ou Cu seul.

---

2. Inductively Coupled Plasma

3. Optical Emmission Spectroscopy

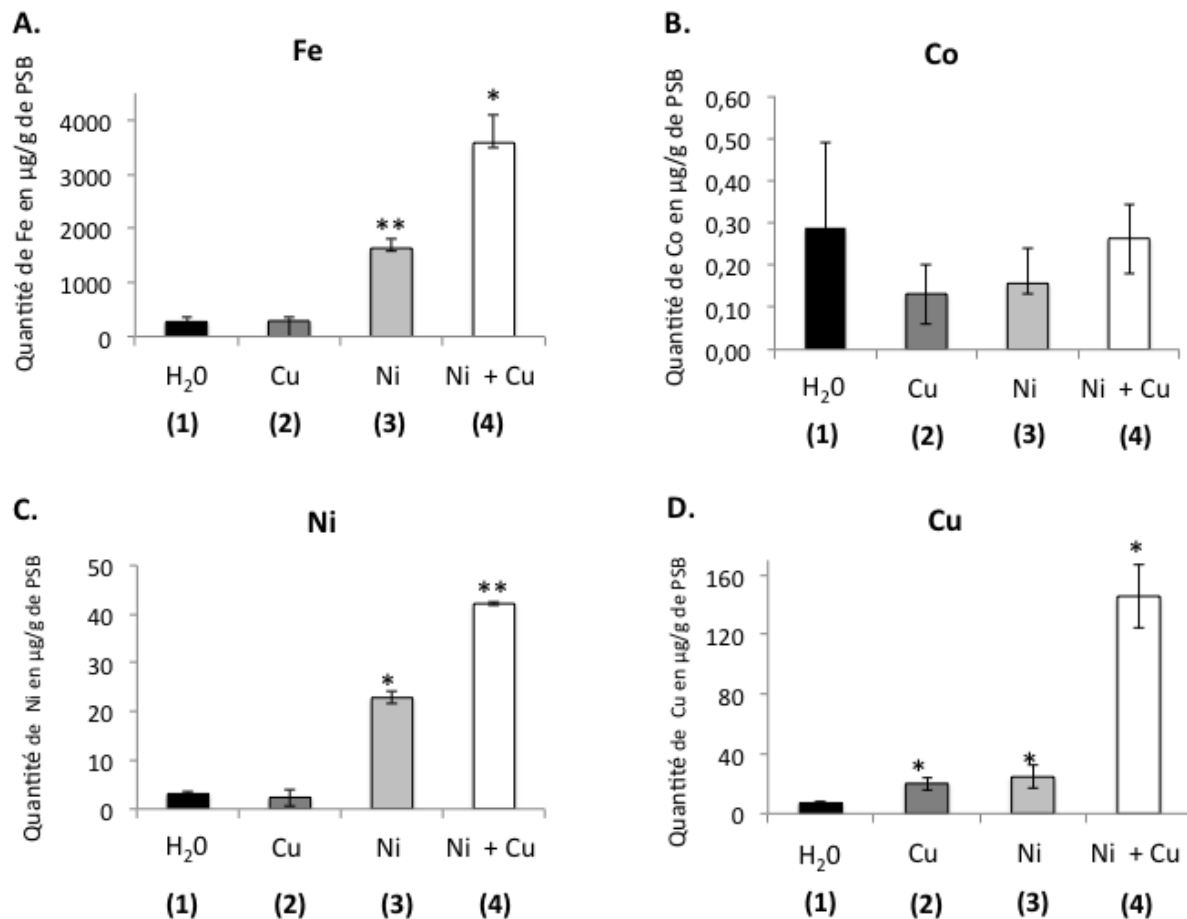


Figure 54 – Détermination par ICP-MS de l'accumulation des ions  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  dans des cellules lavées avec du tampon phosphate.

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ), d' $\text{H}_2\text{O}$  (1), de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2$  (2), de  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$  (3) et de  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$  +  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2$  (4) en condition aérobie à  $37^\circ\text{C}$ . Les bactéries sont récoltées puis lavées avec du tampon phosphate. Le Fe **A.**, le Co **B.**, le Ni **C.** et le Cu **D.** sont dosés par ICP-MS. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  métal. $\text{g}^{-1}$  PSB. La moyenne ainsi que l'écart-type de 3 cultures indépendantes sont présentés. (Test de Student, \*\* = valeur de  $p < 0,01$ ; \* = valeur de  $p < 0,05$ .)

Dans la deuxième expérience [Figure 55], les cellules ont été lavées avec du tampon phosphate supplémenté avec de l'EDTA. Nous avons réalisé un témoin  $\text{H}_2\text{O}$  (1), un stress Ni  $10 \mu\text{M}$  (2) et un stress Cu  $10 \mu\text{M}$  + Ni  $10 \mu\text{M}$  (3). Les résultats montrent que le stress Ni + Cu augmente par 4 la quantité de Fe dans la cellule (55.A.3). Il est vrai que ce résultat n'est pas significatif selon le test statistique réalisé. Ceci peut être expliqué car l'expérience a été réalisée uniquement sur deux échantillons. Cependant la moyenne de la condition témoin est faible comparée à la moyenne de la condition Ni + Cu. Comme l'expérience précédente, les concentrations en Co ne varient pas selon les différents stress métalliques réalisés (55.B.). La condition Ni + Cu augmente par 20 la quantité de Ni (55.C.3) par rapport à la condition témoin (55.C.1) et par 3 par rapport à la condition Ni (55.C.2). Le double stress Ni + Cu augmente également la quantité de Cu par 20 (55.D.3) par rapport à la condition témoin (55.D.1) et par 10 par rapport à l'ajout de Ni uniquement (55.D.2).

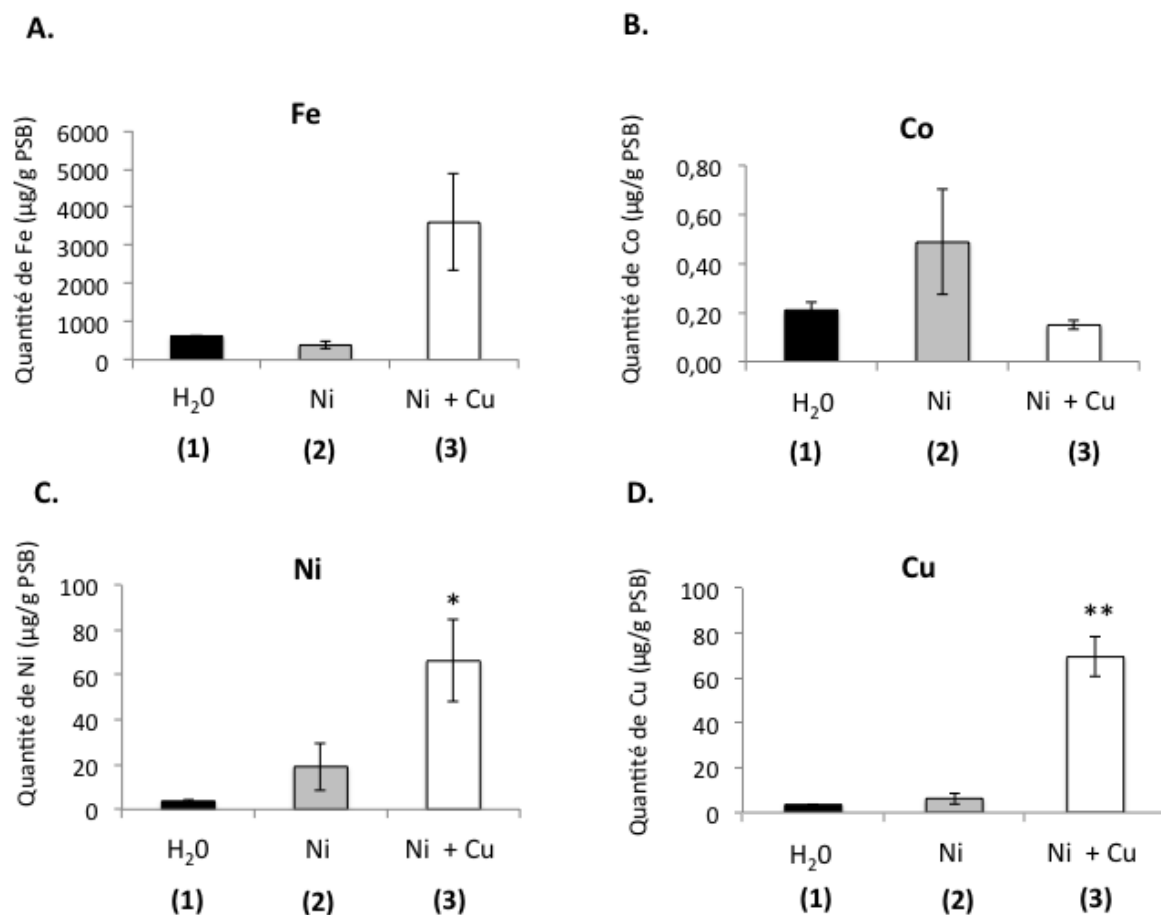


Figure 55 – Détermination par ICP-MS de l'accumulation des ions Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup> dans des cellules lavées avec du tampon phosphate supplémenté avec de l'EDTA

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>), d'H<sub>2</sub>O (1), de 10 µM de NiCl<sub>2</sub> (2) et de 10 µM de NiCl<sub>2</sub> + 10 µM de CuCl<sub>2</sub> (3) en condition aérobie à 37 °C. Les bactéries sont récoltées puis lavées avec du tampon phosphate + EDTA. Le Fe **A.**, le Co **B.**, le Ni **C.** et le Cu **D.** sont dosés par ICP-MS. Les résultats sont exprimés en µg de métal.g<sup>-1</sup> PSB. La moyenne ainsi que l'écart-type de 2 cultures indépendantes sont présentés. (Test de Student, \*\* = valeur de p < 0,01 ; \* = valeur de p < 0,05.)

La quantité de Fe dosée est plus importante lorsque les cellules sont stressées aux ions Ni puis lavées avec tampon phosphate par rapport aux cellules lavées avec le tampon phosphate supplémenté avec de l'EDTA (54.A.3/55.A.2). Cela suppose que la condition avec le lavage sans EDTA permet de doser à la fois les métaux de la matrice extracellulaire en plus des métaux libres et ceux liés aux protéines et que le lavage stringent s'affranchit des métaux de la matrice extracellulaire. Le dosage en présence d'EDTA implique, après centrifugation des cellules, un premier lavage dans du tampon phosphate + EDTA, puis un deuxième lavage avec du tampon phosphate. Ces deux lavages en plus de chélater les métaux en solution, provoquent un effet de dialyse dans les cellules. Comme le milieu est non chargé en métaux, les ions intracellulaires sont relargués. Cela expliquerait la différence d'effet du Ni sur l'homéostasie du fer. En clair, il n'y a pas de condition idéale et la comparaison des deux méthodes reflète un état moyen du pool métallique. Cependant, dans l'expérience avec le simple lavage, il est important de noter que l'augmentation du Fe est spécifique du Ni par rapport à la condition témoin ou lors de

l'ajout de Cu (**54.A.1/54.A.2/54.A.3**).

De manière surprenante, l'ajout à la fois d'ions Ni<sup>2+</sup> et d'ions Cu<sup>2+</sup> augmente significativement les quantités de Fe, de Ni et de Cu dans les deux expériences contrairement à l'ajout de Ni ou de Cu indépendamment. La présence de ces deux métaux entraîne un effet synergique sur l'augmentation des pools de métaux dans la cellule. Les résultats des dosages ICP couplés aux résultats obtenus avec le RNA-Seq nous apportent quelques précisions sur les effets qu'induisent l'excès de nickel dans la cellule. Lors d'un stress Ni, la quantité de Cu augmente et l'effet est encore plus important en présence d'excès de Ni et de Cu. Ceci entraîne donc une production plus importante des systèmes d'efflux du Cu. De la même façon, le stress Ni impacte l'homéostasie du Fe et cette homéostasie est d'autant plus perturbée car le Ni augmente également la quantité de Cu, qui ensemble ont un effet synergique sur l'augmentation de la quantité intracellulaire du Fe. La cellule, en réponse, va limiter l'import du Fe. Mais quels sont les mécanismes exacts qui relie entre-elles ces homéostasies ? Les ions Ni ont-ils un effet sur le système d'efflux du cuivre CusCFBA ? Le Ni peut-il agir directement sur les systèmes de transcription en mimant l'effet du Fe ou s'agit-il d'autres mécanismes indirects ?

### 8.1.2 Le système d'efflux du cuivre CusCFBA participe-t-il à l'homéostasie du Ni ?

Un excès de nickel chez *E. coli* induit l'expression du système d'efflux du cuivre de type RND, CusCFBA [Tableau 12] avec une forte activation de l'expression du gène *cusB*. Afin de vérifier ces résultats de RNA-Seq, une validation par qRT-PCR a été réalisée sur le gène *cusC* avec des cellules traitées aux ions Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup>. L'expression du gène *cusC* est de même ordre entre les deux techniques d'analyse. Comme précédemment décrit (Munson et al., 2000), les ions Cu<sup>2+</sup> induisent très fortement le gène *cusC* et par conséquent l'opéron *cusCFBA*. Les ions Co<sup>2+</sup> quant à eux, induisent plus faiblement le gène *cusC*, contrairement aux ions Zn<sup>2+</sup> qui stimulent 37 fois plus l'expression du gène *cusC* par rapport à la condition sans métaux.

Tableau 12 – Expression des gènes codant le système d'efflux du cuivre CusCFBA

Métaux	<i>cusC</i>	<i>cusF</i>	<i>cusB</i>	<i>cusA</i>
RNA-Seq : Ni 50 μM	45,37	15,47	12,01	5,07
qRT-PCR : Ni 50 μM	58,54	n.d	n.d	n.d
qRT-PCR : Co 50 μM	3,71	n.d	n.d	n.d
qRT-PCR : Cu 50 μM	309	n.d	n.d	n.d
qRT-PCR : Zn 250 μM	37	n.d	n.d	n.d

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobie à 37 °C jusqu'à D.O<sub>600nm</sub> = 0,3 et 50 μM d'ions Ni<sup>2+</sup>, de 50 μM Co<sup>2+</sup>, de 50 μM Cu<sup>2+</sup> ou 250 μM de Zn<sup>2+</sup> sont ajoutés pendant 10 min. Les ARNs sont extraits puis rétrotranscrits en ADN complémentaires. Les expressions des gènes *cusA*, *cusB*, *cusC* et *cusF* obtenues lors de l'analyse par RNA-Seq sont présentées ainsi que celles obtenues en qPCR. Les oligonucléotides utilisés sont répertoriés dans la table 3 des annexes. Les résultats représentent les ratios d'expression comparés à la condition sans métaux. Les moyennes des ratios de trois réplicats biologiques sont présentées. (n.d= non déterminé).

Nous venons de montrer que le système CusCFBA est induit par les ions Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>,

Ni<sup>2+</sup> et légèrement par les ions Co<sup>2+</sup>. Nous nous sommes demandés ensuite, si le système CusCFBA pouvait intervenir dans l'adaptation des cellules subissant un stress provoqué par les ions Ni<sup>2+</sup>. C'est pourquoi nous avons réalisé des profils de résistance aux ions Ni<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup> pour le quadruple mutant  $\Delta cusCFBA$  et le simple mutant  $\Delta cusA$  [Figure 56]. Les gènes *cusCFBA* n'étant pas induits en aérobiose, les mutants  $\Delta cusCFBA$  et  $\Delta cusA$  ne présentent pas de sensibilité aux ions Ni<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup> dans ces conditions. Au contraire, en anaérobiose le système Cus est induit et la présence de cuivre est toxique pour les mutants  $\Delta cusCFBA$  et  $\Delta cusA$ . Cependant, ces mutants ne sont pas plus sensibles aux ions Ni<sup>2+</sup>.

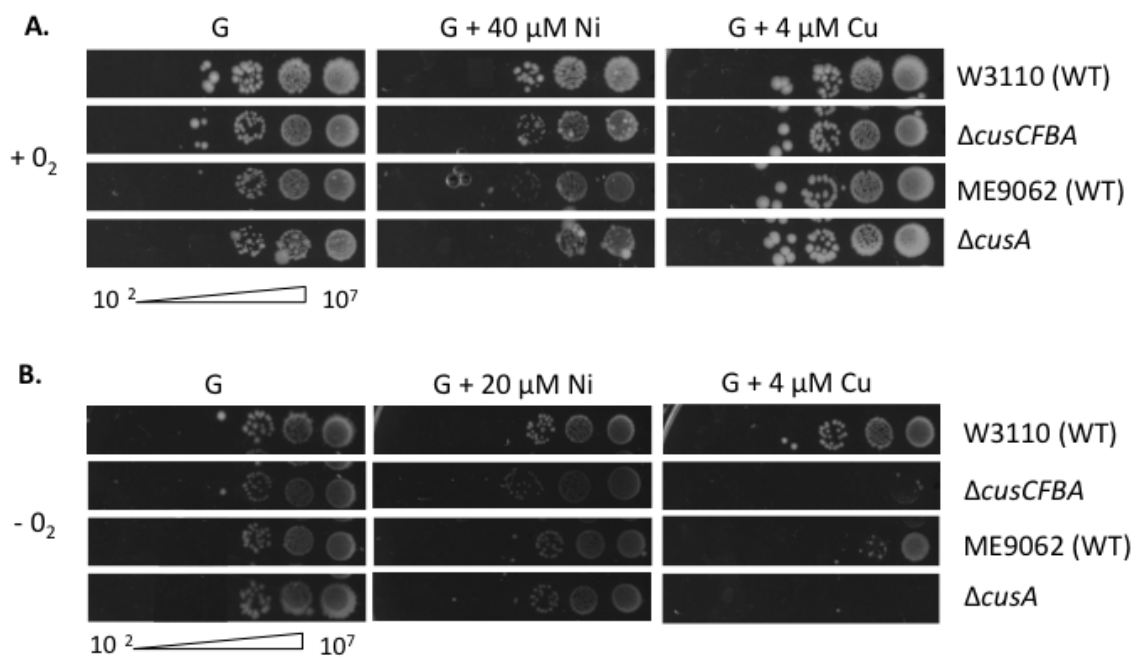


Figure 56 – Les mutants pour le système d'efflux du cuivre CusCFBA ne sont pas sensibles aux ions Ni contrairement aux ions Cu.

**A.** Des cultures bactériennes de la souche d' *E. coli* W3110 sauvage, du mutant  $\Delta cusCFBA$ , de la souche sauvage ME9062 et du mutant  $\Delta cusA$  sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobique à 37 °C jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $D_{O_{600nm}} = 0,6$ ). Les cultures sont ensuite diluées en cascades de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup> dans du milieu M63. 5 μl des dilutions contenant de 10<sup>2</sup> à 10<sup>7</sup> bactéries/mL sont déposées sur boîte de milieu minimum supplémenté ou non par 40 μM de NiCl<sub>2</sub> ou de 4 μM de CuSO<sub>4</sub>. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C 24h en aérobiose. **B.** La même expérience est réalisée mais la concentration de NiCl<sub>2</sub> est de 20 μM. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C de 48 à 72 h en anaérobiose.

Malgré une activation des gènes *cusCFBA* par les ions Ni<sup>2+</sup>, ce système n'est pas dédié à l'adaptation des bactéries subissant un stress provoqué par les ions Ni<sup>2+</sup>. L'hypothèse selon laquelle les ions Ni induiraient indirectement les gènes *cusCFBA* peut être émise. En effet, l'excès de nickel dans la cellule provoque une augmentation des ions Cu et cela pourrait expliquer l'activation du système Cus dans ces conditions [Figure 54].

### 8.1.3 Les ions Ni miment-ils les ions Fe dans la régulation des gènes codant les systèmes d'import du fer ?

Pour répondre à ces questions, nous avons décidé d'étudier un gène étant sous le contrôle du régulateur FUR (cf section 2.3.3). Ce gène d'intérêt est le gène *fhuF* qui code une protéine impliquée dans la réduction du fer ferrique. Pour étudier la transcription de ce gène nous avons utilisé une fusion *lacZ* et dosé l'activité  $\beta$ -galactosidase chez une souche sauvage et chez un mutant  $\Delta fur$ , en présence ou non de métaux [Figure 57].

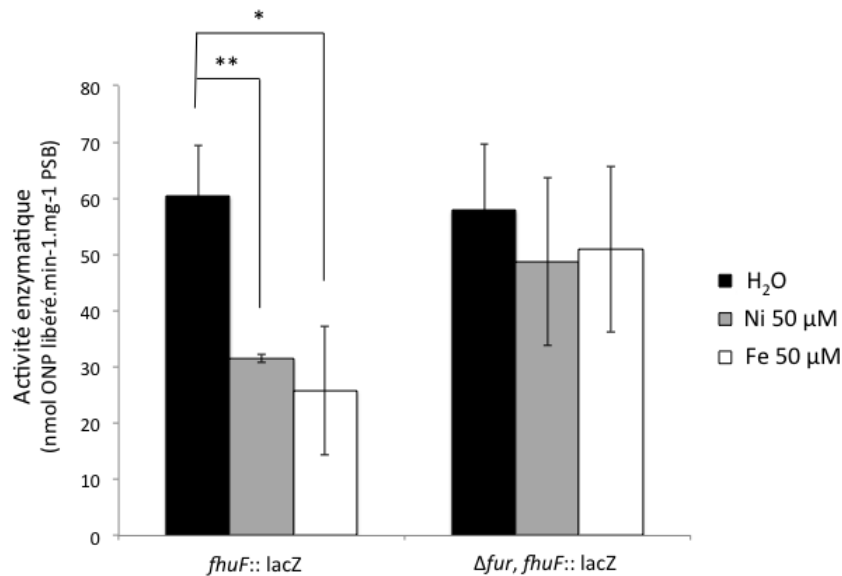


Figure 57 – Les ions Ni<sup>2+</sup> ont un effet similaire au Fe sur la régulation des gènes qui sont sous le contrôle du régulateur FUR

Des cultures de W3110 et du mutant  $\Delta fur$  sont effectuées dans du milieu LB supplémenté par de l'H<sub>2</sub>O (barres noires), 50  $\mu$ M de Ni (barres grises) ou par 50  $\mu$ M de Fe (barres blanches) en conditions aérobie à 37°C. Les activités enzymatiques sont dosées après 16 h de croissance. Les résultats sont exprimés en nmol ONP libéré.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> PSB. La moyenne ainsi que l'écart-type d'au moins 3 manipulations distinctes sont représentées. (Test de Student, \*\* = valeur de p < 0,01 ; \* = valeur de p < 0,05.)

Les résultats des dosages chez la souche sauvage montrent de manière attendue que la présence de Fe diminue de moitié l'expression du gène *fhuF*. Les ions Ni<sup>2+</sup> ont le même impact sur l'expression de ce gène. L'activité enzymatique chez le mutant  $\Delta fur$  en présence de Fe est identique à l'activité mesurée en absence de métal. Le Fe ici n'a plus d'effet sans la présence du répresseur. Les ions Ni<sup>2+</sup> n'induisent pas non plus la répression du gène *fhuF* chez le mutant  $\Delta fur$ . Les résultats montrent que les ions Ni<sup>2+</sup> répriment l'expression du gène *fhuF*, et ce de manière FUR-dépendante. Cela suggère soit que les ions Ni<sup>2+</sup> se fixent sur le régulateur FUR, soit que les ions Ni<sup>2+</sup> induisent une augmentation de la concentration en Fe intracellulaire qui eux vont induire la régulation par FUR. Pour répondre à la première hypothèse impliquant



la fixation des ions  $\text{Ni}^{2+}$  sur le régulateur FUR, une étude a montré que les cations divalents  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  étaient capables d'activer la protéine FUR *in vitro* et de provoquer sa fixation sur l'ADN (Bagg and Neilands, 1987). En revanche, *in vivo*, seul l'addition de  $\text{Fe}^{2+}$ , de  $\text{Co}^{2+}$  et de  $\text{Mn}^{2+}$  additionnés dans un milieu de culture semble avoir un effet sur la répression des gènes régulés par la protéine FUR. La première hypothèse que nous avons émise relatant le fait que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  pourraient se fixer directement sur le régulateur FUR n'a pas été validé expérimentalement *in vivo*. Etant donné que ces informations ne sont pas vérifiables, cette hypothèse ne peut être validée. Cependant, avec les expériences de dosage des métaux par ICP-MS nous avons répondu à la deuxième hypothèse qui suggère que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  induisent bien une augmentation de la concentration en fer intracellulaire (54.A.3). Les ions Fe se fixent au répresseur FUR et ainsi répriment la synthèse des gènes codant pour les systèmes d'import du fer.

Nous venons de mettre en évidence que le stress Ni induisait des variations des teneurs en Fe et en Cu et que cet excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  pourrait induire une activation des systèmes de défense contre l'excès de métaux. En effet, ceci est observé dans l'analyse RNA-Seq. Lorsque la cellule ressent le stress Ni, elle réprime les gènes codant les systèmes d'import du fer et active les gènes codant les systèmes d'efflux du Cu. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la toxicité du nickel est basée sur les interactions avec les homéostasies du fer et du cuivre, métaux reconnu pour entraîner la production de ROS<sup>4</sup>, produits toxiques pour la cellule. Dans la suite de ces travaux, nous essaierons de répondre à cette hypothèse.

## 8.2 Aucun effet mutagène n'est observé lors d'un stress provoqué par les ions $\text{Ni}^{2+}$

Les ions  $\text{Fe}^{2+}$  via la réaction de Fenton sont capables d'induire des mutations et des modifications au niveau des bases de l'ADN (McBride et al., 1991). Pour examiner l'effet mutagène du fer sur *E. coli*, nous avons réalisé deux tests [Figure 58]. Les fréquences de mutations spontanées suite à la suppression, l'insertion ou des substitutions de bases permettent de rendre la cellule résistante à certains antibiotiques. Nous avons calculé les fréquences de mutation correspondant aux cellules devenues résistantes à l'antibiotique par rapport au nombre de cellules totales, sur des souches d'*E. coli* traitées aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  durant 10 ou 30 minutes. Après des lavages, les cellules sont étalées sur des boîtes de milieu minimum contenant de l'acide nalidixique ou de la rifampicine [Figure 58]. Les clones résistants sont dénombrés après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose. Lorsque les cellules sont étalées sur des boîtes contenant de l'acide nalidixique aucune différence n'est remarquée entre le nombre de mutants devenus résistants en présence ou non d'un stress  $\text{Ni}^{2+}$  de 10 et 30 minutes. Les tests sur les boîtes contenant de la rifampicine se sont avérés difficiles à réaliser car les cellules formaient sur la boîte un tapis bactérien empêchant tout dénombrement. Les concentrations de cet antibiotique ont été augmentées mais aucun résultat significatif n'est observé sur le seul test réalisé. En résumé, les fréquences de mutation

---

4. Reactive oxygen species

ne varient pas entre la présence ou l'absence de stress métallique.

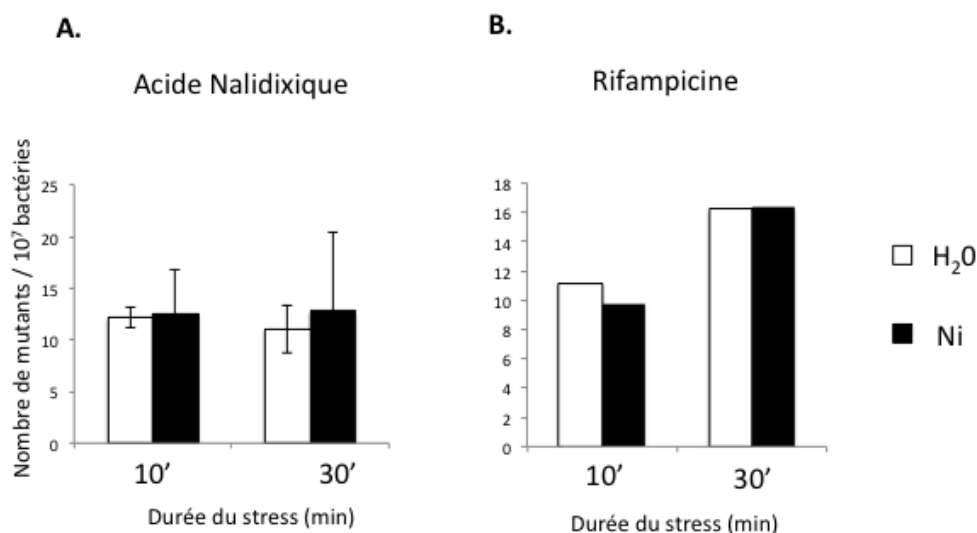


Figure 58 – Test de l'effet mutagène des ions Ni<sup>2+</sup>

Test de l'effet mutagène du nickel chez *E. coli* W3110 cultivée dans du milieu minimum M63 glucose après 10 et 30 min de stress nickel à 50  $\mu$ M. Les cultures sont étalées sur des boîtes de milieu minimum contenant **A.** 15  $\mu$ g/ml d'acide nalidixique (n=3)**B.** 150  $\mu$ g/ml de rifampicine (n=1). Les clones résistants sont dénombrés après 24 h d'incubation à 37°C en aérobiose.

Si la toxicité du nickel est en partie liée à la modification des homéostasies du fer et du cuivre, cette toxicité pourrait être due à la production de ROS par ces deux métaux. L'ADN étant une cible des ROS, nous avons voulu évaluer si l'ADN présentait des cassures suite à un stress provoqué par les ions Ni<sup>2+</sup>. Nous avons donc extraits l'ADN chromosomique de cellules traitées ou non aux ions Ni<sup>2+</sup>. Ces ADN ont été déposés sur des gels d'agarose et une migration lente à 4°C a été réalisée pour visualiser les cassures. L'ADN ne présente pas plus de cassures simples et doubles brins en présence de nickel par rapport à la condition témoin<sup>5</sup>.

Ces expériences se sont avérées inadéquates pour visualiser l'impact des ions Ni<sup>2+</sup> sur l'état de l'ADN pouvant être dégradé par les ROS. Nous avons donc envisagé une approche basée sur l'observation du repliement de l'ADN.

### 8.3 L'excès d'ions Ni<sup>2+</sup> provoque un relâchement de l'ADN via l'induction indirecte d'un stress oxydant

A forte concentration, les métaux essentiels deviennent toxiques pour la cellule en provoquant des liaisons aspécifiques. En effet, les métaux peuvent se substituer aux autres métaux associés aux protéines entraînant une inhibition de l'activité enzymatique. De plus, en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction, les métaux peuvent générer un stress oxydant (cf section 1.4.2).

5. résultats non montrés

Une étude *in vitro* chez *Salmonella typhimurium* a montré que l'ADN présentait des cassures causées par les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ , en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en produisant une grande quantité de radicaux hydroxyle et que d'autres métaux comme le Ni et le Cd en produisaient peu (Keyhani et al., 2006). Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  peuvent-ils indirectement endommager l'ADN en induisant une augmentation des métaux impliqués dans la production de radicaux libres ?

Pour répondre à cela, nous avons mis en place une expérience basée sur l'observation du repliement de l'ADN. En effet, le matériel génétique chez les procaryotes est complexe et est appelé nucléoïde. Chez les bactéries, l'ADN circulaire double brin peut adopter une forme surenroulée positive [Figure 59]. Cette configuration est défavorable aux processus de transcription (Dorman, 2008). Chez la plupart des bactéries, le surenroulement est négatif et permet plus favorablement les processus de transcription. En effet, le surenroulement négatif de l'ADN facilite le désappariement local des brins de la double hélice en raison de l'augmentation du nombre de paires de bases par tour d'hélice. Ainsi les supertours négatifs facilitent l'ouverture de la double hélice ce qui permet une meilleure disposition pour la transcription réalisée par l'ARN polymérase (Dorman, 2008).

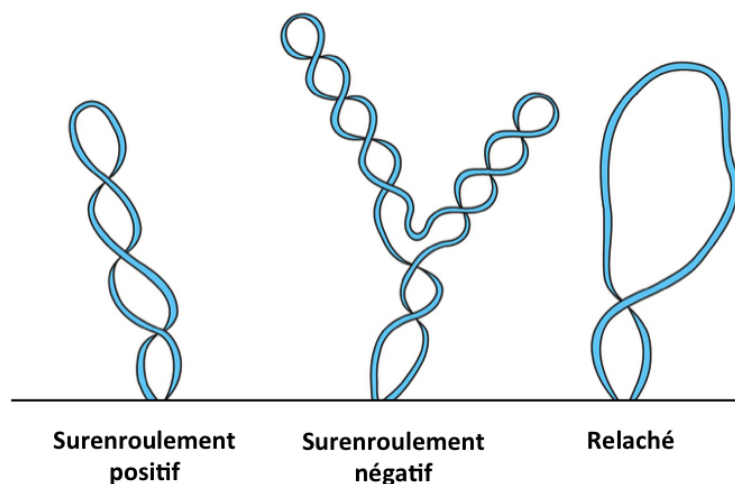


Figure 59 – Topologie de l'ADN bactérien

L'ADN bactérien est un ADN circulaire double brin, soit surenroulé positif, soit surenroulé négatif, soit relâché. Ces topologies varient suivant les conditions environnementales que perçoivent les bactéries.

Lorsque des dégâts surviennent au niveau de cette double hélice, comme des cassures par exemple, l'ADN devient plus relâché. Nous voulons donc savoir si les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , par l'augmentation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ , entraînent un relâchement de l'ADN provoqué par des cassures ? Les résultats de RNAseq (cf chapitre 5), indiquant que l'excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  module l'expression d'un grand nombre de gènes, soulèvent l'idée que le relâchement de l'ADN pourrait également être la cause de cette reprogrammation génétique.

Une technique simple permet de visualiser l'état de relâchement de l'ADN (Shure et al.,

1977). Pour cela nous avons extrait les plasmides pUC18 de la souche d'*E. coli* W3110 traitée ou non à la novobiocine. Cet antibiotique inhibe l'ADN gyrase et relâche l'ADN. Les échantillons sont déposés sur un gel de chloroquine. La chloroquine est un agent intercalant qui se fixe préférentiellement sur l'ADN relâché et provoque son étirement. Cet étirement de la molécule d'ADN va ralentir sa vitesse de migration. Les résultats montrent que les topoisomères migrent moins rapidement dans le gel en raison de leur encombrement stérique plus élevé en présence de la novobiocine. Comme attendu, l'antibiotique relâche plus fortement l'ADN [Figure 60 A.]. Ces mêmes résultats sont présentés d'une autre façon. En effet, le gel est analysé par le logiciel ImageJ. Ce logiciel permet de comparer l'intensité des bandes entre les différentes conditions de traitement. Il est obtenu un graphique qui représente en ordonnée les niveaux de gris correspondant aux bandes du gel de chloroquine et en abscisse la distance en pixels du gel [Figure 60 B.]. Chaque pic représente une bande et ceux se situant les plus à gauche correspondent aux bandes les plus hautes. En d'autres termes, plus l'intensité des pics est importante à gauche et plus l'ADN est relâché, et inversement si les pics ont une intensité plus forte à droite, l'ADN est surenroulé. Cette première expérience avec la novobiocine est un bon témoin pour valider la technique d'analyse.

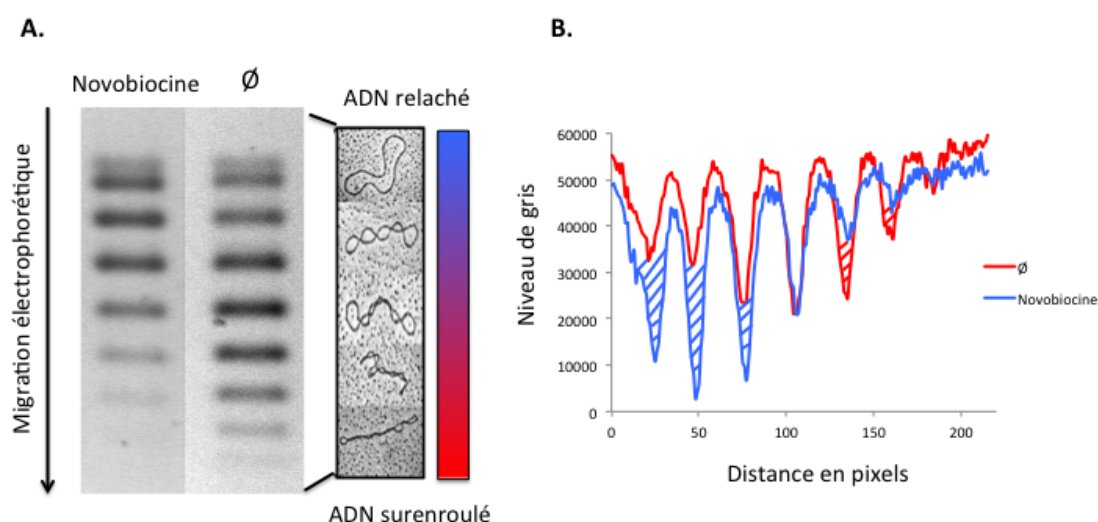


Figure 60 – Effet du traitement à la novobiocine sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d'*E. coli* W3110.

**A.** Analyse de 200 ng d'ADN plasmidique d'une culture d'*E. coli* W3110 traitée ou non avec de la novobiocine (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant 15 min) par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de chloroquine puis coloré au BET. Les molécules les plus relâchées migrent moins vite que les molécules surenroulées. **B.** Analyse du gel avec le logiciel ImageJ. Les niveaux de gris du gel en fonction de la distance en pixels sont comparés entre les différents traitements.

Nous avons ensuite testé les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . De la même façon que précédemment, nous avons extrait les plasmides pUC18 de la souche d'*E. coli* W3110 traitée ou non aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Les analyses du gel de chloroquine et du graphique montrent que les topoisomères d'ADN migrent moins vite avec le traitement aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  [Figure 61 A. et B.]. En conclusion, l'ADN est plus relâché dans les cellules cultivées avec un excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ .

Comme le peroxyde d'hydrogène provoque un stress oxydant en produisant des ROS, nous avons cultivé les cellules avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour évaluer l'état de surenroulement de l'ADN suite à ce stress. En parallèle nous avons traité les cellules, en plus du peroxyde d'hydrogène, avec du tiron<sup>6</sup>. Le tiron est un "quencher" des anions superoxydes (O<sub>2</sub> ·<sup>-</sup>) appartenant à la famille des espèces réactives oxygénées (ROS) (Tree et al., 2005). L'effet est moins net que celui obtenu lorsque les cellules sont cultivées avec les ions Ni<sup>2+</sup> mais le graphique obtenu avec le logiciel Image J confirme que l'ADN est plus relâché en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul que dans la condition avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le tiron [Figure 61 C. et D.]. Cette expérience montre que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endommage l'ADN, et que cet effet est dû à la production de ROS car lorsque les cellules sont traitées avec du tiron, l'ADN est protégé de l'action néfaste du peroxyde d'hydrogène.

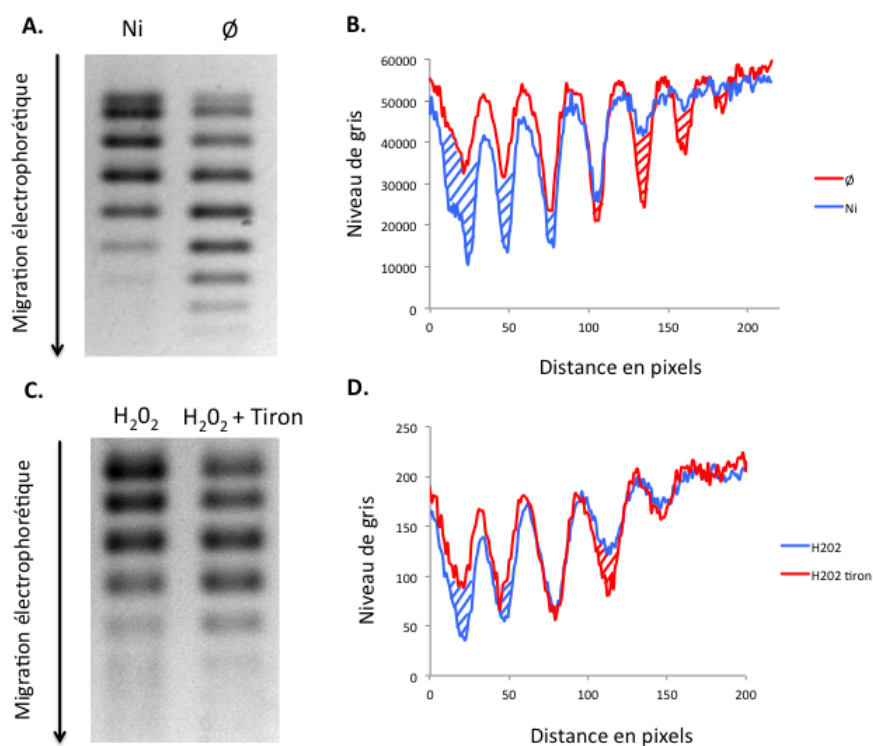


Figure 61 – Effet d'un stress aux ions Ni<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'un traitement au tiron sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d'*E. coli* W3110

**A.** Analyse de 200 ng d'ADN plasmidique d'une culture d'*E. coli* W3110 stressée aux ions Ni<sup>2+</sup> (50 μM) pendant 15 min par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 2,5 μg/mL de chloroquine puis coloré au BET. **B.** Analyse du gel avec le logiciel ImageJ. **C.** Analyse de 200 ng d'ADN plasmidique d'une culture d'*E. coli* W3110 stressée avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) ou avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) + tiron (50 mM) pendant 15 min par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 2,5 μg/mL de chloroquine puis coloré au BET. **D.** Analyse du gel avec le logiciel ImageJ.

Nous avons donc voulu savoir si l'effet observé sur les dommages de l'ADN par les ions Ni<sup>2+</sup> sont dûs à la présence de ROS dans la cellule. Pour cela, nous avons cultivé les cellules en présence d'un excès d'ions Ni<sup>2+</sup> et de tiron. Lorsque les cellules stressées aux ions Ni<sup>2+</sup> sont traitées avec du tiron, l'ADN est moins relâché qu'en absence de tiron [Figure 62 A. et B.]. L'ADN est donc moins endommagé confirmant ainsi que l'effet observé lors d'un stress aux ions Ni<sup>2+</sup> est bien dû à la production de ROS dans la cellule. La suite a consisté à tester l'effet du Fe,

6. 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonic acid

qui lui est le métal de transition décrit pour entraîner la production des ROS. Très clairement, l'ADN est fortement relâché [Figure 62 C. et D.] en présence de Fe. L'ajout de tiron, en protégeant l'ADN des anions superoxydes, présente des topoïsomères un peu plus surenroulés. Le relâchement de l'ADN qui est observé est donc bien dû à la production de radicaux libres.

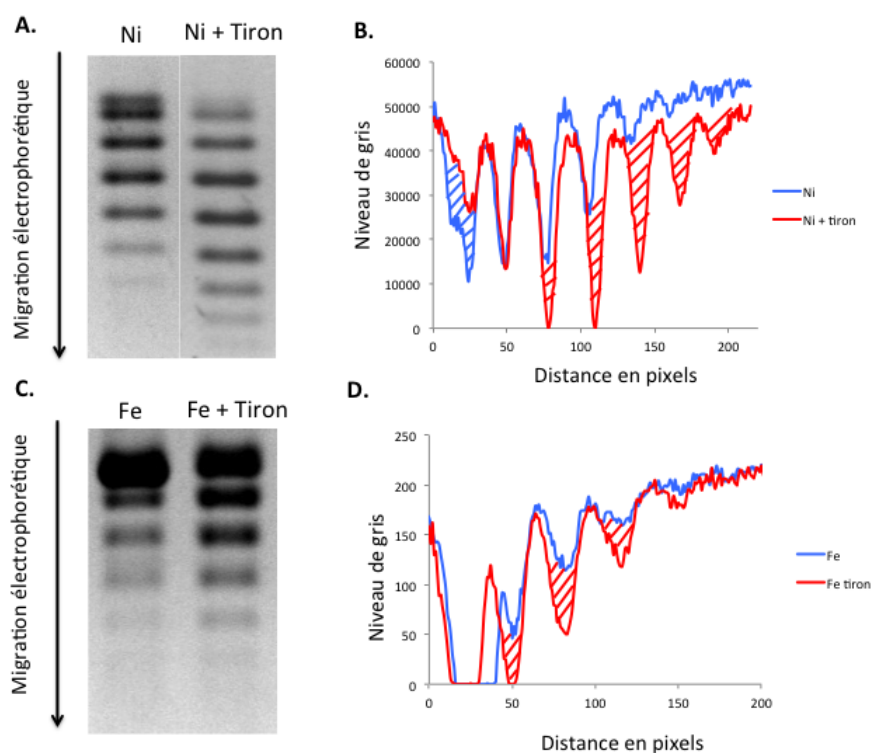


Figure 62 – Effet d'un stress aux ions Ni<sup>2+</sup>, aux ions Fe<sup>2+</sup> et d'un traitement au tiron sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d'*E. coli* W3110

**A.** Analyse de 200 ng d'ADN plasmidique d'une culture d'*E. coli* W3110 stressée aux ions Ni<sup>2+</sup> (50 μM) ou aux ions Ni<sup>2+</sup> (50 μM) + tiron (50 mM) pendant 15 min par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 2,5 μg/mL de chloroquine puis coloré au BET. **B.** Analyse du gel avec le logiciel ImageJ. **C.** Analyse de 200 ng d'ADN plasmidique d'une culture de W3110 stressée aux ions Fe (800 μM) ou aux ions Fe (800 μM) + tiron (50 mM) pendant 15 min par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 2,5 μg/mL de chloroquine puis coloré au BET. **D.** Analyse du gel avec le logiciel ImageJ.

La réaction de Fenton peut également être réalisée en présence d'ions Cu<sup>2+</sup>. C'est pourquoi nous avons testé l'impact des ions Cu<sup>2+</sup> sur le niveau d'enroulement de l'ADN. Les ions Cu<sup>2+</sup> entraînent également un léger relâchement de l'ADN [Figure 63 A. et B.]. Les ions Co<sup>2+</sup> ne sont pas impliqués dans la production de radicaux libres. L'expérience ici montre qu'en effet, ces ions n'ont aucun impact sur la topologie de l'ADN [Figure 63 C. et D.].

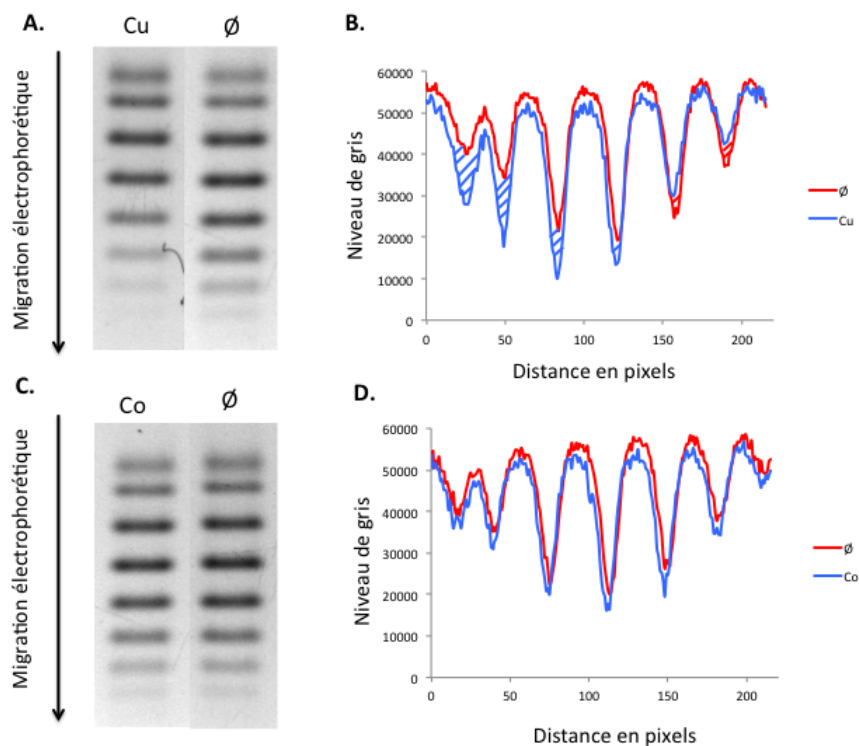


Figure 63 – Effet d'un stress aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d'*E. coli* W3110.

**A.** Analyse de 200 ng d'ADN plasmidique d'une culture d'*E. coli* W3110 stressée avec des ions  $\text{Cu}^{2+}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) pendant 15 min par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant  $2,5 \mu\text{g/mL}$  de chloroquine puis coloré au BET. **B.** Analyse du gel avec le logiciel ImageJ. **C.** Analyse de 200 ng d'ADN plasmidique d'une culture d'*E. coli* W3110 stressée avec des ions  $\text{Co}^{2+}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) pendant 15 min par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant  $2,5 \mu\text{g/mL}$  de chloroquine puis coloré au BET. **D.** Analyse du gel avec le logiciel ImageJ.

Comme expliqué auparavant, les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , ainsi que les ions  $\text{Co}^{2+}$ , ne participent pas à la production de radicaux libres via la réaction de Fenton (cf section 1.4.2). Cependant il est observé un relâchement de l'ADN en présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  contrairement aux ions  $\text{Co}^{2+}$ . Cela suggère que le relâchement de l'ADN est dû à la production de ROS induite indirectement par le  $\text{Ni}^{2+}$  et est confirmé par l'utilisation du tiron qui protège l'ADN contre les dommages du stress oxydant. En effet, l'excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  influence les teneurs en Fe et Cu qui ont eux, ont la capacité de produire les ROS entraînant les cassures de l'ADN.

Afin de démontrer que la toxicité du nickel est réellement due à une production de ROS provoquée par l'augmentation de la teneur intracellulaire en fer, des tests de surenroulement de l'ADN ont été réalisées avec de l'ADN traité avec du 2,2'-dipyridyl (DPD). Le DPD est donné comme étant un chélateur du fer. Les premiers tests ne présentent pas de résultats satisfaisants et requièrent plus de mises au point<sup>7</sup>. En effet, le traitement des cellules avec le DPD présente un relâchement de l'ADN suggérant que celui-ci endommage l'ADN. A forte dose de DPD est toxique. D'autres expériences sont donc nécessaires. Cependant, des travaux ont montré que le DPD est aussi un chélateur du nickel, du cobalt et du cuivre (Palmer and Piper, 1966). Donc en plus de chélater les ions Fe nous chélaterons également d'autres métaux de transition.

L'ensemble de ces expériences décrit un nouveau mécanisme de la toxicité des ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Les

7. données non montrées

nombreux travaux sur la toxicité du nickel relate que la toxicité de ces ions est essentiellement due à une l'altération des protéines et des membranes (cf 1.4.2). Ici, nous montrons qu'il s'agit d'un mécanisme plus complexe faisant intervenir l'homéostasie des ions Fe et Cu, entraînant la production de radicaux libres.

## 8.4 L'excès d'ions $Ni^{2+}$ induit une reprogrammation génétique

Comme expliqué dans le paragraphe 8.3, le changement de conformation de la topologie de l'ADN impacte l'expression génique car l'ARN polymérase sera plus ou moins capable d'accéder à la double hélice. Si des changements au niveau du surenroulement surviennent, la transcription des gènes en sera donc affectée. Ces changements de topologie ont lieu lors des changements de phase de croissance ou d'un stress environnemental par exemple [Figure 64] (Dillon and Dorman, 2010). Le nucléoïde est formé majoritairement d'acides nucléiques mais également de protéines. Ces protéines appelées NAPs<sup>8</sup>, sont impliquées dans l'organisation structurale du génome et peuvent être considérées comme de véritables régulateurs (Dillon and Dorman, 2010).

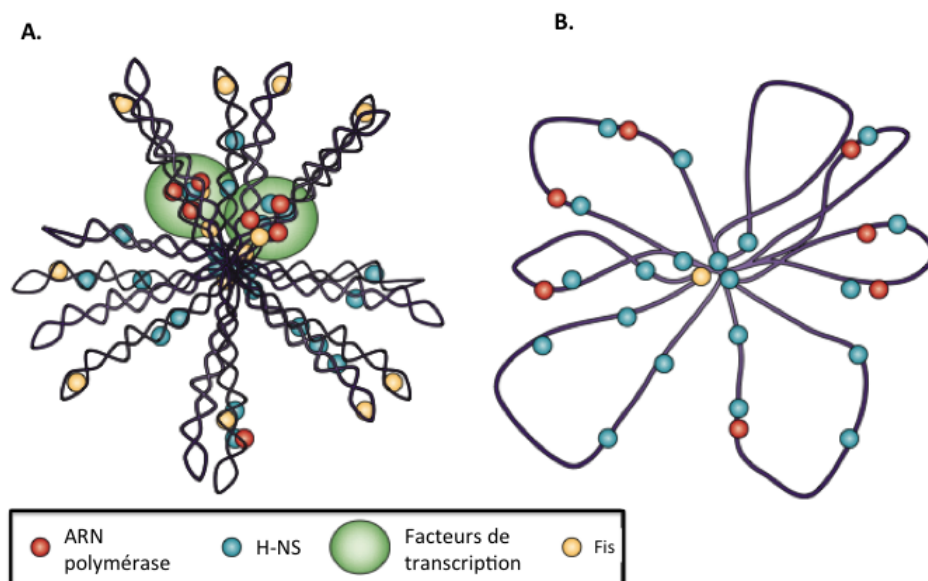


Figure 64 – Influence des NAPs sur la structure du chromosome bactérien

Représentation schématique de la structure du chromosome bactérien avec les protéines associées au nucléoïde, par exemple H-NS (bleu) et Fis (jaune). Les ARN polymérases sont représentées en rouge et les facteurs de transcription en vert. **A.** Structure de l'ADN en phase exponentielle de croissance ou **B.** en phase stationnaire de croissance. Figure adaptée d'après (Dillon and Dorman, 2010)

Les NAPs sont capables de moduler la topologie de l'ADN en induisant des pontages entre les brins d'ADN et elles induisent de fortes ou de faibles courbures et peuvent même former



des structures rigides. L'analyse par RNA-Seq d'un stress Ni chez *E. coli* révèle que les gènes codant ces NAPs sont différentiellement exprimés. Les taux de variation ainsi que les fonctions des principales des NAPs sont présentés dans le tableau 13.

Aucune étude sur la toxicité des ions Ni<sup>2+</sup> n'a été réalisée sur les NAPs. Cependant, chez les cellules eucaryotes, l'équivalent des NAPs sont des protéines appelées histones. Il a été montré que les ions Ni<sup>2+</sup> altèrent l'acétylation des histones à la fois dans chez la levure et chez les cellules de mammifères (Broday et al., 2000). Ces métaux sont considérés ici comme des inhibiteurs.

Tableau 13 – Fonctions des protéines NAPs impliquées dans la topologie de l'ADN

FC	Protéine	Fonction
1,65	H-NS	Oligomérisation des dimères créant un "pontage" de deux brins d'ADN
-5,12	Fis	Fixation créant de fortes courbures de l'ADN (jusqu'à 90°)
11,46	Dps	Protection de l'ADN et fixation des ions Fe <sup>2+</sup>
4,17	IhfA	Fixation induisant de très fortes courbures de l'ADN (jusqu'à 180°)
4,55	IhfB	Fixation induisant de très fortes courbures de l'ADN (jusqu'à 180°)

Les gènes codant pour les NAPs sont différentiellement exprimés lors d'un stress Ni. De manière cohérente, la protéine Fis a été décrite comme favorisant le surenroulement de l'ADN (Travers and Muskhelishvili, 2001). Or l'analyse transcriptomique révèle que le gène codant la protéine Fis est réprimé en présence d'ions Ni<sup>2+</sup>. Nous venons de démontrer qu'un excès d'ions Ni<sup>2+</sup> provoquait le relâchement de l'ADN. En plus de la suggestion qu'un excès de nickel, par l'intermédiaire d'une augmentation de fer, provoquait un stress oxydant, nous montrons que ce phénomène peut être cumulé par la répression du gène *fis*. La topologie de l'ADN est donc impactée, ce qui va induire davantage de variation dans l'expression des gènes, en plus de la toxicité des ions provoquant un stress oxydant via l'augmentation des teneurs en fer et en cuivre. L'ensemble de ces facteurs peut expliquer que lors d'un stress nickel, une reprogrammation massive de l'expression génique est générée.

**Conclusion :** L'approche transcriptomique par RNA-Seq réalisée dans cette étude a montré qu'en présence de Ni l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du Fe est réprimée et que les gènes impliqués dans l'efflux du Cu sont activés. Nous avons démontré que le Ni a un impact sur l'homéostasie du Fe et du Cu. Nous avons également montré que l'ajout à la fois du Ni et du Cu avait un effet synergique sur la teneur intracellulaire en métaux. D'autres travaux sont nécessaires pour étudier les mécanismes exacts du lien entre les homéostasies du Ni, du Cu et du Fe. Cependant, l'augmentation des teneurs en Fe et en Cu génère des ROS qui endommagent l'ADN et modifie sa topologie. Les ions Ni<sup>2+</sup>, via l'augmentation des ions Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup>, déclenchent des changements dans le surenroulement de l'ADN qui induisent de grandes modifications du transcriptome. En réponse à un stress

métallique, l'expression du génome est ainsi modifiée par un réseau de régulation global impliquant la topologie de l'ADN et l'ARN polymérase associée aux facteurs de transcription. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les mécanismes de toxicité du Ni conduisent à un changement massif de l'expression des gènes et par conséquent à une reprogrammation génétique.



## Chapitre 9

# YddAB, nouveau système d'import des ions Ni<sup>2+</sup> chez *E. coli*

L'un des premiers objectifs de l'analyse transcriptomique était de mettre en évidence de nouveaux systèmes de transport des ions Ni<sup>2+</sup> et notamment des transporteurs spécifiques de la membrane externe inconnus à ce jour. Pour cela nous avons listé, dans l'ensemble des gènes différentiellement exprimés, les gènes prédits pour coder des systèmes d'import comme des porines, des protéines TonB-dépendentes, des ABC<sup>1</sup> transporteurs ou des OMR<sup>2</sup>. Dans les systèmes d'efflux, nous avons recherché des transporteurs de type MFS<sup>3</sup>, CDF<sup>4</sup>, les ATPases de type P, RND<sup>5</sup> ainsi que des MFP<sup>6</sup>. Dans le tableau 14, sont répertoriés les mutants pour des protéines de membrane pour lesquels les profils de résistance aux ions Ni<sup>2+</sup> ont été testés par des déterminations de CMI<sup>7</sup>.

Dans l'ensemble de ces résultats, plusieurs mutants ont présenté des phénotypes intéressants, par exemple les gènes *znuABC* codant un système de transport de type ABC. En effet, les résultats du RNA-Seq montrent que ces gènes sont activés lors d'un stress Ni. De plus, chacun des mutants des trois partenaires protéiques sont sensibles aux ions Ni<sup>2+</sup>. Ces résultats suggèrent que ce système participerait à l'efflux des ions Ni<sup>2+</sup>. Or le système Znu a été décrit comme étant un système d'import des ions Zn (Patzner and Hantke, 1998). Il serait intéressant de quantifier le transport du Ni, du Zn et des deux métaux à la fois chez ces mutants afin de définir la fonction exacte de ce transporteur. Les résultats obtenus dans le chapitre précédent montrent qu'un excès de nickel perturbe l'homéostasie d'autres métaux. Nous pouvons supposer que l'excès d'ions Ni<sup>2+</sup> interfère avec l'entrée du zinc dans la cellule, créant une carence en ions Zn<sup>2+</sup>. La carence de ces ions, essentiels à la vie cellulaire, entraînerait le phénotype sensible que l'on observe en présence d'ions Ni<sup>2+</sup>.

L'expression du gène *yojI* est réprimée 5,64 fois en présence de Ni. Cela suggère que ce transporteur est un système d'import des ions Ni<sup>2+</sup>. Toutefois, lors des réalisations des profils

- 
1. ATP Binding Cassette
  2. Outer Membrane Receptor
  3. Major Facilitator Superfamily
  4. Cation Diffusion Facilitator
  5. Resistance Nodulation cell Divison
  6. Membrane Fusion Protein
  7. Concentration Minimale Inhibitrice

Tableau 14 – Liste des mutants testés pour leur résistance aux ions Ni<sup>2+</sup>

FC	Gènes	Fonctions de la protéine	Profil de résistance
2,74	<i>ompC</i>	Porine	/
2,75	<i>ompA</i>	Porine	/
-1,55	<i>mdtD</i>	Transporteur de type MFS	/
1,50	<i>mdtE</i>	Transporteur d'efflux multidrogues	/
2,39	<i>yibH</i>	Système d'efflux de type RND putatif	/
1,70	<i>ybhS</i>	Pompe d'efflux ATP dépendante putative	+
3,05	<i>ybhF</i>	Pompe d'efflux ATP dépendante putative	+
5,09	<i>ybhG</i>	MFP putative	+
-3,56	<i>yncD</i>	OMR putative	+
-2,81	<i>yddB</i>	Transporteur TonB dépendant putatif	+
-8,26	<i>yddA</i>	Transporteurs de type ABC putatif	+
-5,64	<i>yojI</i>	Transporteur de type ABC	-
6,38	<i>znuA</i>	Transporteur du zinc de type ABC	-
1,90	<i>znuB</i>	Transporteur du zinc de type ABC	-
4,43	<i>znuC</i>	Transporteur du zinc de type ABC	-

FC= Taux de variation obtenus en RNA-Seq. Les mutants sont testés pour leur résistance aux ions Ni<sup>2+</sup> par rapport à la souche sauvage : (/) pas de différence, (+) plus résistant, (-) moins résistant. Les gènes transcrits en opéron sont indiqués en rouge.

de résistance, le mutant du gène *yojI* est nettement plus sensibles aux ions Ni<sup>2+</sup> par rapport à la souche sauvage. Ces résultats sont contradictoires par rapport à ceux obtenus en RNA-Seq. C'est pourquoi nous n'avons pas approfondi l'analyse de ce candidat.

Ensuite le gène, *yncD* s'est avéré intéressant puisqu'il est réprimé en présence de Ni et le mutant de ce gène est résistant aux ions Ni<sup>2+</sup>. Ce gène est prédit pour coder une protéine de membrane externe et plus précisément une OMR<sup>8</sup>. Mais cette protéine a déjà été décrite comme étant impliquée dans le transport du Fe. Ainsi nous n'avons pas retenu ce candidat pour étudier le transport du Ni connaissant déjà les résultats obtenu dans le chapitre 8. L'induction de ce gène pourrait être due à l'augmentation de la concentration en fer dans la cellule suite au stress nickel.

Enfin, deux autres gènes nous ont particulièrement intéressés. Il s'agit des gènes *yddA* et *yddB*. En effet, ces deux gènes sont réprimés en présence d'ions Ni<sup>2+</sup> et les mutants présentent un phénotype de résistance. YddB est prédite pour être un transporteur TonB-dépendant. Cela suggère que cette protéine est impliquée dans le transport du Ni au niveau de la membrane externe. YddA est quant à elle prédite comme étant un transporteur de type ABC. Cela fait de ces deux éléments de bons candidats pour importer les ions Ni<sup>2+</sup> du milieu extérieur vers le cytoplasme.

C'est pourquoi la suite de ce chapitre sera dédiée à l'étude de ces deux protéines.

8. Outer Membrane Receptor

## 9.1 Caractérisation du système d'import des ions Ni<sup>2+</sup> YddAB

### 9.1.1 Profils de résistance des mutants $\Delta yddA$ et $\Delta yddB$

Comme évoqué dans le paragraphe ci-dessus, la figure 65 présente les profils de résistance des mutants  $\Delta yddA$  et  $\Delta yddB$  pour les ions Ni<sup>2+</sup>. Il n'y a pas de différence significative de phénotype lorsque la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est réalisée en milieu minimum liquide [Figure 65A.].

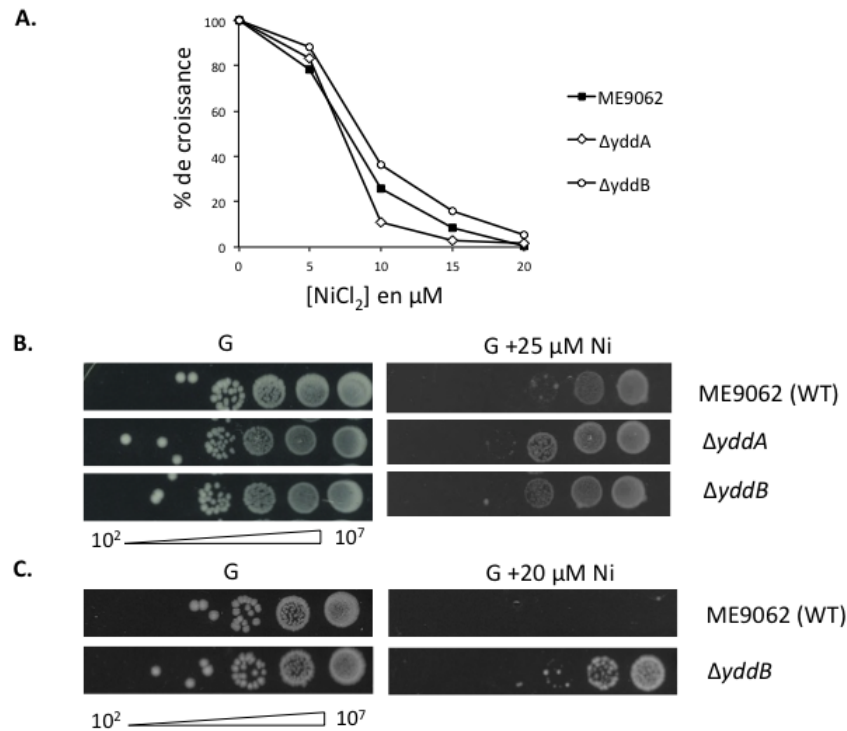


Figure 65 – Influence des mutations *yddA* et *yddB* sur la résistance des bactéries aux ions Ni<sup>2+</sup>

**A.** Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum liquide M63, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobie à 37 °C avec des concentrations croissantes de NiCl<sub>2</sub> pendant 16 h. Les D.O<sub>600nm</sub> sont ensuite mesurées. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métaux. Une expérience représentative est présentée. **B.** Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobie à 37 °C jusqu'en phase exponentielle de croissance (D.O<sub>600nm</sub> = 0,6). Les cultures sont ensuite diluées en cascades de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup> dans du milieu M63. 5 µl des dilutions contenant de 10<sup>2</sup> à 10<sup>7</sup> bactéries/mL sont déposés sur boîte de milieu minimum supplémenté ou non par 25 µM de NiCl<sub>2</sub>. **C.** ou par 20 µM de NiCl<sub>2</sub>

Au contraire, lorsque les CMI sont réalisées sur boîtes de milieu minimum, il est observé une résistance accrue pour les mutants  $\Delta yddA$  et  $\Delta yddB$  par rapport à la souche sauvage [Figure 65B]. Ce phénotype est plus ou moins marqué en fonction des conditions expérimentales [Figure 65C] mais ce résultat reste très reproductible. Les phénotypes de résistance sont plus ou moins marqués en fonction des lots de milieu utilisés. Toutefois, chaque expérience a été répétée plus de trois fois et les résultats ont montré une résistance accrue des mutants  $\Delta yddA$  et  $\Delta yddB$  aux ions Ni<sup>2+</sup>.

Le système *ydd* a été peu étudié. Cependant, en 2001, une équipe japonaise a testé tous les transporteurs de type ABC et notamment la protéine YddA (Kobayashi et al., 2001). La

Tableau 15 – Analyse de l'expression des gènes *yddA* et *yddB* par qRT-PCR en fonction de différents métaux

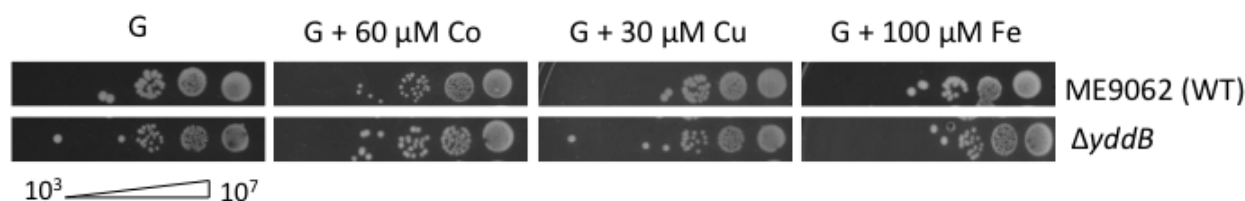
Métaux	<i>yddA</i>	<i>yddB</i>
Ni 50 $\mu$ M	-7,64	-6,62
Co 50 $\mu$ M	-22,78	-25,16
Cu 50 $\mu$ M	-1,61	-2,46
Zn 250 $\mu$ M	1,4	-1,04

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum M63, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobie à 37 °C jusqu'à D.O<sub>600nm</sub> = 0,3 et 50  $\mu$ M d'ions  $Ni^{2+}$ , de 50  $\mu$ M  $Co^{2+}$ , de 50  $\mu$ M  $Cu^{2+}$  ou 250  $\mu$ M de  $Zn^{2+}$  sont ajoutés pendant 10 min. Les ARNs sont extraits puis rétrotranscrits en ADN complémentaires. Les expressions des gènes *yddA* et *yddB* sont évaluées par qPCR. Les oligonucléotides utilisés sont répertoriés dans le tableau 3 des annexes. Les résultats représentent les ratios d'expression comparés à la condition sans métaux. Une seule expérience a été effectuée.

sensibilité à 22 drogues incluant le chloramphénicol, la tétracycline, la novobiocine ou bien le bromure d'éthidium a été testée chez le mutant  $\Delta yddA$ . Le mutant  $\Delta yddA$  s'est avéré n'être sensible à aucune de ces drogues. Ce système est donc dédié à transporter d'autres composés de nature encore inconnue et qui pourraient être des métaux.

Une évaluation de différents stress métalliques sur l'expression des gènes *yddA* et *yddB* a été réalisée par qRT-PCR [Tableau 15]. Les gènes *yddA* et *yddB* sont réprimés en présence d'ions  $Ni^{2+}$  comme les résultats du RNAseq l'ont révélé [Tableau 14]. La présence des ions  $Co^{2+}$  dans le milieu entraîne une forte répression de l'expression des gènes *yddA* et *yddB*, supérieure à celle exercée par le nickel, alors que les ions  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  ont peu d'impact sur l'expression des gènes d'intérêt. Cette expérience devra être reproduite pour vérifier ces résultats.

Des profils de résistances préliminaires ont été réalisés sur le mutant  $\Delta yddB$  pour les ions  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Fe^{2+}$  [Figure 66].

Figure 66 – Influence de la mutation de *yddB* sur l'accumulation des ions  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ 

Les cultures bactériennes sont réalisées dans du milieu minimum M63, supplémenté de glucose (2 g.l<sup>-1</sup>) en condition aérobie à 37 °C jusqu'en phase exponentielle de croissance (D.O<sub>600nm</sub> = 0,6). Les cultures sont ensuite diluées en cascade de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  dans du milieu M63. 5  $\mu$ l des dilutions contenant de  $10^3$  à  $10^7$  bactéries/mL sont déposés sur boîte de milieu minimum supplémenté ou non par 60  $\mu$ M de Co, 30  $\mu$ M de Cu, 100  $\mu$ M de Fe

Contrairement à leur comportement en présence des ions  $Ni^{2+}$ , les souches ne semblent pas être affectées par les ions  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ . Pour les ions  $Co^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ , les concentrations supérieures à celles testées ci-dessous sont létales pour le mutant et la souche sauvage. Pour les ions  $Fe^{2+}$ , la précipitation du métal dans le milieu à des concentrations supérieures à 100  $\mu$ M, ne

nous a pas permis d'évaluer le profil de résistance chez le mutant  $\Delta yddB$ . Malgré des résultats de qPCR suggérant que le cobalt serait capable de réprimer l'expression des gènes codant les protéines YddA et YddB, le transporteur YddB ne semble pas importer ce métal. Cependant ces résultats n'ont pas été reproduits et pour vérifier ces données, il est nécessaire de répéter ces expériences.

### 9.1.2 Profils de transport des ions $Ni^{2+}$ chez les mutants $\Delta yddA$ et $\Delta yddB$

La hausse de la résistance des mutants  $\Delta yddA$  et  $\Delta yddB$ , ainsi que la topologie prédite des produits des gènes suggère un rôle dans l'import des ions  $Ni^{2+}$ . Afin de tester cette hypothèse, des expériences de transport de nickel radioactif ont été réalisées [Figure 67].

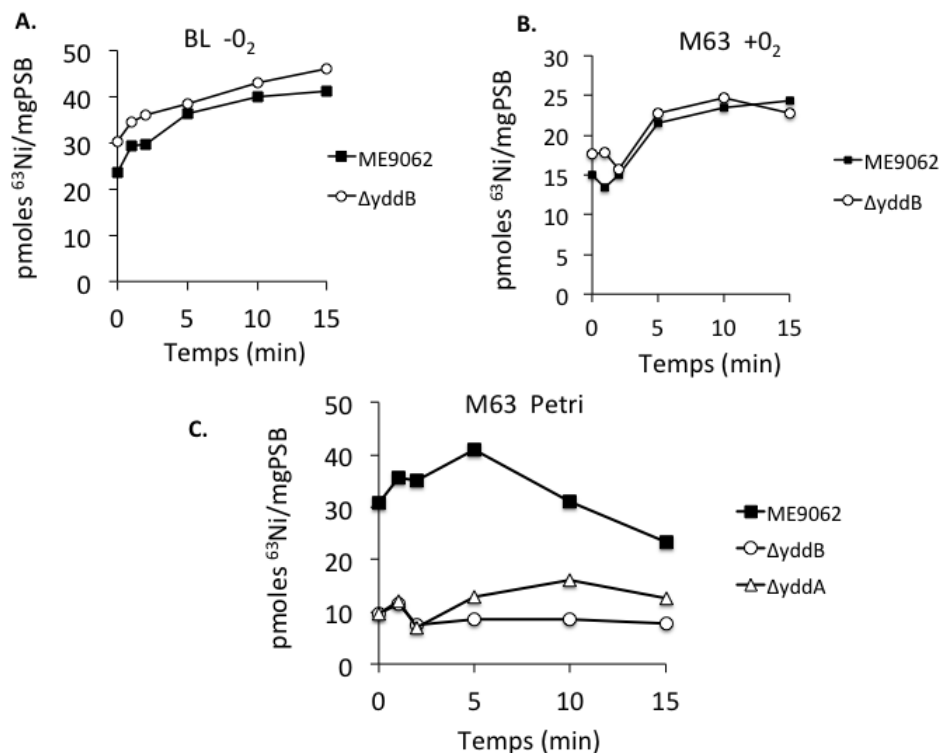


Figure 67 – Influence des mutations de *yddB* et de *yddA* sur l'accumulation des ions  $Ni^{2+}$

**A.** Les cultures sont réalisées en milieu liquide BL MoSe en anaérobiose jusqu'à  $D.O_{600nm} = 0,6$ . **B.** Les cultures sont réalisées en milieu minimum liquide supplémenté par du glucose en aérobiose jusqu'à  $D.O_{600nm} = 0,6$ . **C.** Des colonies sont prélevées à partir d'une gélose de milieu minimum supplémenté en glucose. Pour les trois expériences, les cellules sont concentrées à  $D.O_{600nm} = 7$  dans du tampon phosphate. Après un lavage, les cellules sont reprises dans du tampon phosphate supplémenté en glucose et en magnésium. 150 nM de  $^{63}Ni$  sont ajoutés et un aliquot de cellules est filtré ( $0,45 \mu m$ ) à intervalles de temps réguliers. Les résultats sont exprimés en pmol de  $^{63}Ni \cdot mg^{-1}$  PSB. Chaque expérience (**A.**, **B.**, **C.**) a été reproduite trois fois et une expérience représentative est présentée.

Dans un premier temps nous avons testé l'accumulation de nickel radioactif chez le mutant  $\Delta yddB$  et la souche sauvage [Figure 67A.]. Les cultures ont été réalisées en milieu riche BL MoSe en anaérobiose. Ce sont les conditions qui induisent le système Nik permettant le passage des ions  $Ni^{2+}$  à travers la membrane interne. Il n'y a pas de différence significative d'accumulation de  $^{63}Ni$  entre le mutant  $\Delta yddB$  et la souche sauvage. Le mutant  $\Delta yddB$  ainsi que la souche



sauvage ont ensuite été cultivés en milieu minimum supplémenté en glucose en aérobiose [Figure 67B.]. Comme précédemment, aucune différence d'accumulation de  $^{63}Ni$  n'est observée dans ces conditions. Ces résultats sont en contradiction partielle avec les mesures de CMI. En effet, les mesures de CMI en milieu gélosé ont mis en évidence une différence nette de phénotype entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta yddB$  [Figure ]. Cependant, aucune différence de CMI n'a été observée après la culture en milieu liquide. Cela suggère que le système YddB est requis en condition de croissance sur milieu solide et non en milieu liquide. L'expression du gène *yddB* semble être possible uniquement dans les conditions de croissance sur milieu gélosé. C'est pourquoi, nous avons décidé d'utiliser des cellules ayant été cultivées sur boîte de milieu minimum supplémenté en glucose [Figure 67C.]. Ces conditions sont identiques à celles utilisées pour déterminer les profils de résistance aux ions  $Ni^{2+}$  présentés dans la figure 9.1.2C. Dans ces conditions, une différence importante d'accumulation de  $^{63}Ni$  est observée entre la souche sauvage, qui accumule du  $^{63}Ni$  et le mutant  $\Delta yddB$ , qui n'accumule pas de  $^{63}Ni$ . Cela montre que YddB est indispensable à l'import du Ni dans ces conditions. Ces résultats confirment la fonction d'import de Ni par la protéine YddB. Dans cette même expérience nous avons également testé le mutant  $\Delta yddA$  pour son profil d'accumulation de Ni radioactif. Son profil est intermédiaire entre celui de la souche sauvage et le mutant  $\Delta yddB$  n'accumulant plus les ions radioactifs. Ces résultats laissent penser que la mutation du gène *yddA* altère également le passage des ions  $Ni^{2+}$  à travers la membrane interne.

Pour compléter ces résultats nous avons testé l'activités hydrogénase des mutants  $\Delta yddA$  et  $\Delta yddB$  comparativement à la souche sauvage car il s'agit de l'enzyme à nickel de référence chez *E. coli* K12. Ces dosages ont tout d'abord été réalisés à partir de cultures en milieu liquide. Aucune différence n'est observée entre les souches mutantes et la souche sauvage<sup>9</sup>. Les résultats de CMI étant plus concluants en milieu solide, des cultures sur boîtes de milieu gélosé en GL G BV<sup>10</sup>, (indicateur coloré réduit en présence d'une activité hydrogénase), en présence de concentrations croissantes en nickel ont donc été réalisées. Les boîtes ont été placées en anaérobiose pendant 24 h. Les résultats sont visualisés en plaçant les boîtes dans un environnement sous hydrogène. Les colonies se colorent en mauve lorsque l'activité hydrogénase est présente. Cependant, aucune différence entre les souches n'a été observée dans ces conditions<sup>11</sup>. L'import du nickel par le système *ydd* ne semble pas être nécessaire pour l'activité hydrogénase chez *E. coli*.

Pour obtenir les phénotypes pour les expériences de CMI et de transport de Ni radioactif, les cellules ont dû être cultivées en milieu minimum sur boîte. Cela suggère que les gènes *yddAB* sont exprimés dans des conditions de microaérobiose et en milieu minimum. Ces conditions ressemblent à des conditions de vie de type biofilm.

Pour confirmer ces résultats, des expériences de qRT-PCR pourraient être effectuées à partir de cultures d'*E. coli* stressées aux ions  $Ni^{2+}$  en anaérobiose, en aérobiose, en milieu riche et en milieu minimum. Les expressions des gènes *yddA* et *yddB* dans ces différentes conditions pourront être comparées. Ainsi, les conditions optimales de cultures pour la répression des

---

9. données non montrées

10. Benzyl Viologène

11. données non montrées

gènes *yddAB* seront déterminées.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour compléter le phénotypage des mutants  $\Delta yddA$  et  $\Delta yddB$ . Une analyse par ICP-MS des concentrations intracellulaires en métaux pourra être réalisée chez ces mutants afin d'approfondir cette analyse.

En parallèle de ces travaux expérimentaux, une analyse bioinformatique des séquences géniques et protéiques ont été réalisées pour approfondir l'étude des protéines YddA et YddB.

### 9.1.3 Analyse bioinformatique des séquences

#### 9.1.3.1 Les gènes *yddA* et *yddB* sont prédits pour être transcrits en opéron

Chez *E. coli* les gènes *yddA* et *yddB* sont prédits pour être transcrits en opéron, mais aucune expérience à l'heure actuelle ne le confirme. La figure 68 représente schématiquement la répartition des gènes *yddA* et *yddB* ainsi que les gènes adjacents. Le locus *ydd* est compris entre le gène *pqqL* qui semble coder pour une protéase à zinc (Turlin et al., 1996) et le gène *ydeM* prédit coder une enzyme de maturation des sulfatases (Berteau et al., 2006).



Figure 68 – Représentation schématique du locus *ydd* chez *E. coli*

Les gènes *yddA* et *yddB* sont prédits pour être transcrits en opéron mais aucune validation expérimentale n'a été réalisée. *pqqL* est prédit pour coder une protéase à zinc et *ydeM* est prédit pour coder une enzyme de maturation des sulfatases.

Les séquences intergéniques ne présentent aucune boîte NikR ou RcnR en amont des gènes *yddAB*. Ces gènes ne sont donc pas régulés par l'un de ces métallorégulateurs. Une étude plus approfondie devra être menée afin de déterminer plus précisément le système de régulation de ce locus.

#### 9.1.3.2 Les séquences protéiques de YddA et YddB sont compatibles pour le transport du nickel

Les séquences protéiques de YddA et de YddB ont été analysées avec la base de données Swiss Prot. Cette base de données révèle que la protéine YddA possède 561 acides aminés avec une masse totale de 64,985 kDa et que YddB se compose de 790 acides aminés pour une masse de 89,283 kDa.

Quatorze histidines sont répertoriées au sein de la séquence protéique de YddA et 18 dans la séquence de YddB [Figure 69]. Ces acides aminés peuvent jouer un rôle dans la fixation des ions  $Ni^{2+}$ . En effet, l'azote du cycle imidazole des histidines peut former des liaisons de coordination avec des ions métalliques comme le  $Zn^{2+}$ , le  $Co^{2+}$ , le  $Fe^{2+}$  ou le  $Ni^{2+}$ . C'est pourquoi la présence de ces résidus au sein des protéines YddA et YddB est compatible avec la fonction de transport d'ions  $Ni^{2+}$  que nous proposons.

**A.** >sp|P31826|YDDA\_ECOLI  
MITIPITLRMLIAKYLCLLKPFWLRKNNKTSVLLIIILAMILGVVQIYVWLNWNNDFNALSQ  
KETDKLWQLVLFWFPALLGIFVLISVNKTWLIKLLTIRWREWLTDYVLNRWFADKNYYFTQIY  
GEHKNTDNPQRIAEDILLISKTLSLSFGFIQSLMLITFTVILWESAGTLSFTVGGTEWNIQG  
YMVYTVVLLVIGGTLFTHKVGKRIRPLNVEKQRSEATFRTNLVQHKNQAEIALSNAESLQRQE  
LSDNFHTIKENWHRLMNRQRWLDYWQNIYSRSLVLPYFLLLPPQFISGQINLGGMLKSRQAF  
MLVSNLNSWFIYKYDELAELAVIDRLEYFHLTEQRPTNPKPKNCQHAVQVADASIRTPDNKI  
ILENLNFHVSPGKWLKLLKGYSGAGKTTLLKTLSHCWPFWFKGDISSPADSWYVSQTPLIKTGLL  
KEIICKALPLVDDKSLSEVLHQVGLGKLAARIHDHDRWGDILSSGKQRIALARLILRRPKWIF  
LDETTSHLEEQAIRLLRLVREKLPTSGVIMVTHQPGVWNLADDICDISAVL

**B.** >sp|P31827|YDDB\_ECOLI  
MKRVLIPGVILCGADVAQAVDDKNMYMHFFEEMTVYAPVVPVNGNTHYTSIESIERLPTGNG  
NISDLLRTNPAVRMDSTQSTSLNQGDIRPEKISHGASPYQAYLIDGISATNNLNPNANESDASS  
ATNISGMSQGYLLDVSLLDNVTLYDSFVPEFGRFNGGVIDAKIKRFNADDSKVKLYRTRSD  
WLTSHIDENNKSAFNQSSGSTYSPDFKKNFYTLFSNQELADNFGVTAGLSRRQSDITRADYV  
SNDGIVAGAQYKNVIDTALSFTWFASDRFTHDLTLKYTGSSRDYNTSTFPQSDREMGNKSY  
GLAWDMDTQLAWAKLRRTTVGWDHISDYTRHDHDIWYTELSCTYGDITGRCTRGGLGHISQA  
VDNYTFKRLDWQKFAVGNVSHQPYFGAEIYSDAWTERHNQSESYVINAAGKKTNHTIYHK  
GKGRGLIDNYTLYMADRISWRNVSLMPGVRYDYDNYLSNHNISPRFMTEWDIFANQTSMITA  
GYNRYGGNILDMLDRIRNSWTESVSGNKTTRYQDLKTPYNDELAMGLQKIGKNVIARA  
NYVYREAHQDISKSSRTDSATKTTITEYNNDGKTKTHSFSLSFELAEPLHIRQVDINPQIVFSYIK  
SKGNLSLNGYEESENTGDNQVVYNGNLVSYDSVPVADFNPLKISLNMDFTHQPSGLVWANT  
LAWQEARKARIILGKTNAQYISEYSDYKQYVDEKLDSSLTWDTRLSWTPQFLQQQLTISADIL  
NVLDSKTAVDTTNTGVATYASGRFTWLDVSMKF

Figure 69 – Séquences protéiques de YddA et de YddB d'*E. coli*

La séquence protéique de YddA **A.** contient 561 acides aminés et celle de YddB **B.** compte 790 acides aminés.

### 9.1.3.3 YddA, prédite pour être un transporteur de type ABC

Les transporteurs ABC sont capables de transporter à travers les membranes cellulaires des éléments très variables tels que des acides aminés, des peptides, des protéines, des ions organiques et inorganiques, certaines toxines, voir même des antibiotiques, en utilisant l'hydrolyse de l'ATP (Ferguson and Deisenhofer, 2002). Sur le plan structural, la présence de deux domaines pouvant lier l'ATP sont les domaines NBD (Nucleotide Binding Domains) (Hung et al., 1998). Bien que la structure des transporteurs ABC varie, on retrouve des éléments communs. Les transporteurs ABC sont donc caractérisés par les séquences Walker A et B, qui sont les sites de liaison de l'ATP (Walker et al., 1982) : la séquence Walker A (G/A-X4-G-K-T/S) est nécessaire à la liaison de l'ATP et la séquence de Walker B (R/K-X3-G-X3-L-h4-D séquence plus controversée) est essentielle à la liaison du magnésium. La lettre X désigne n'importe quel acide aminé, la lettre h désigne un acide aminé hydrophobe. Une signature spécifique appartenant aux membres de la famille des transporteurs ABC est située entre les deux séquences de Walker. Il s'agit de la séquence C (L-S-X-G-X-R).

Les transporteurs ABC sont fonctionnels sous forme de monomères, d'homodimères, d'hétérodimères ou de polymères. Le logiciel Interproscan prédit chez la protéine YddA d'*E. coli*, un premier domaine fonctionnel entre les résidus 35 et 337 comme étant le domaine transmembranaire [Figure 70]. Celui-ci est composé de 6 segments transmembranaires en hélice  $\alpha$  avec des boucles solubles. Le deuxième domaine fonctionnel prédit est le domaine NDB entre les résidus 367 et 561 qui contient le domaine de liaison à l'ATP. Ce domaine est situé dans le cytoplasme. Le domaine de Walker A est retrouvé entre les résidus 400 et 407 : GYSGAGKT [Figure 70]. Le motif de Walker B est plus difficile à mettre en évidence. Cependant la leucine 509 et l'acide

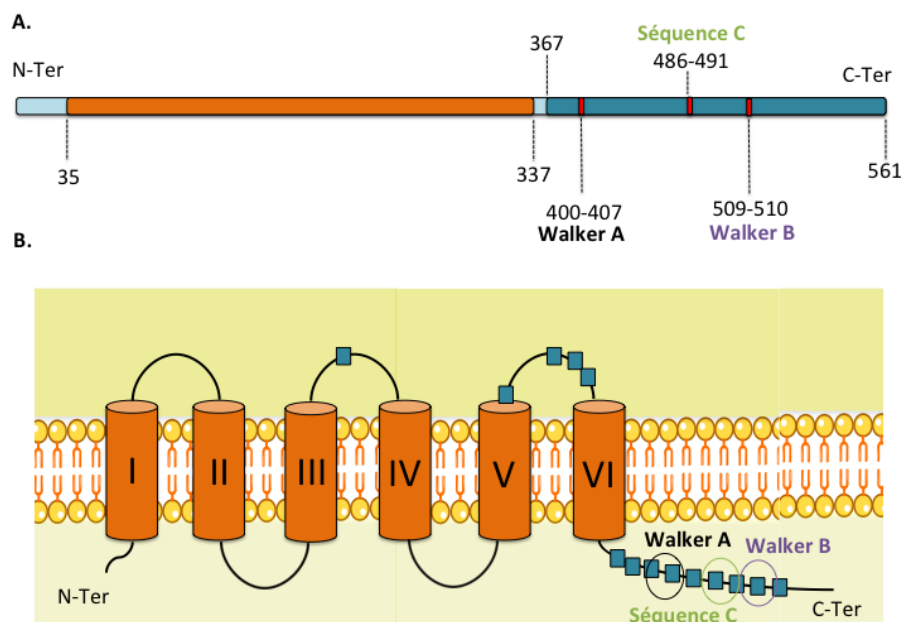


Figure 70 – Prédiction des domaines fonctionnels de YddA

**A.** Les domaines fonctionnels prédits sont obtenus en interrogeant la base de données Interproscan. Le domaine orange correspond à un domaine ABC transmembranaire, composé de 6 segments transmembranaires en hélice  $\alpha$  et le domaine bleu foncé correspond au domaine NDB. En rouge sont indiqués les différents motifs conservés des ABC transporteurs. Les chiffres correspondent aux acides aminés. **B.** Les différents segments transmembranaires sont représentés en orange. En bleu foncé sont représentés les résidus histidines principalement basés au niveau du domaine NDB. Les séquences de Walker A et B et la séquence C, motifs conservés chez les ABC transporteurs sont indiquées respectivement en noir, violet et vert.

aspartique 510 sont très conservés [Figure 70] et pourraient correspondre au motif de Walker B.

Pour appréhender la structure secondaire de YddA, nous avons utilisé les logiciels de prédiction Psipred et NPSA. La protéine YddA présente une grande quantité d'hélices  $\alpha$  caractéristiques des structures des segments transmembranaires des ABC transporteurs [Figure 71]. Plusieurs feuillets  $\beta$  sont prédits au niveau de l'extrémité COOH.

#### 9.1.3.4 YddB est un récepteur de la membrane externe proche des TBDT

Comme précédemment décrit dans l'introduction (cf section 2.3.1), les transporteurs TonB dépendant (TBDT) sont composés d'un tonneau  $\beta$ . Les 12 derniers acides aminés de la séquence du tonneau forment un brin  $\beta$  qui permet l'ancrage de la protéine dans la membrane externe, le dernier acide aminé est aromatique (tryptophane ou phénylalanine) (Struyve et al., 1991). Les TBDT possèdent un domaine "plug" ou bouchon à l'extrémité NH<sub>2</sub>. Au début de ce bouchon est présente une courte séquence appelée boîte TonB. Cette séquence est composée de 5 ou 6 acides aminés (TXXV(S/T)), où X est un acide aminé hydrophobe (Lundrigan and Kadner, 1986), qui permet l'interaction entre le TBDT et la protéine TonB, ancrée dans la membrane interne.

Sur la figure 72 sont présentés les différents domaines fonctionnels prédits par Interproscan. Une séquence caractéristique d'un domaine en tonneau  $\beta$  est présent entre les résidus 270 et 790. Dans notre cas, YddB possède comme dernier résidu, une phénylalanine. Cet acide aminé

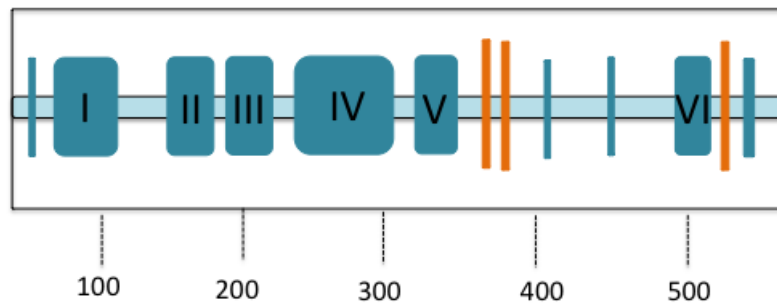


Figure 71 – Prédiction des structures secondaires de la protéine YddA

Les structures secondaires YddA sont prédites avec les logiciels Psipred et NPSA. Cette figure compile les deux prédictions bioinformatiques. Les hélices  $\alpha$  sont figurées en bleu et les feuillets  $\beta$  en orange.

aromatique est caractéristique des tonneaux  $\beta$  des TBDT. De plus, il est prédit entre les résidus 49 et 165 un domaine bouchon également caractéristique des TBDT. Ces prédictions suggèrent fortement que YddB peut être un transporteur TonB dépendant. Cependant, aucune boîte TonB n'est présente dans sa séquence ce qui laisse penser que le transport du nickel serait soit indépendant du système énergétique TonB/ExbB/ExbD, soit l'interaction de TonB avec le YddB est réalisée avec une séquence autre que la boîte TonB.



Figure 72 – Prédiction des domaines fonctionnels de YddB

Les domaines prédits sont obtenus en interrogeant la base de données Interproscan. Le domaine orange correspond à un domaine "plug" des TBDT (TonB Dependent Transporter) et le domaine bleu foncé correspond à un tonneau  $\beta$ . Les chiffres correspondent aux acides aminés.

Aucune base de données ne prédit de séquence signal pour YddB, or cette protéine est prédite comme étant une protéine de membrane externe. L'analyse approfondie de la partie N-terminale de la protéine, permet pourtant de distinguer les trois domaines caractéristiques d'une séquence signal, présentée ci dessous :

MKRVLIPGVILCGADV**AQAVDDK**

En effet l'extrémité "N" (en orange) est composée de deux acides aminés chargés positivement qui permettront par la suite l'insertion dans la membrane cellulaire, puis la région "H" (en bleu) qui est normalement formée d'une dizaine de résidus hydrophobe. Dans le cas de

YddB, des résidus hydrophobes sont présents mais également accompagnés de résidus non hydrophobes comme la proline, deux glycines et un acide aspartique. Enfin, un potentiel site de clivage (AQA) est présent. Il est attendu que l'extrémité "C" (en rouge) de la séquence signal soit composée essentiellement de résidus polaires. La séquence de YddB est composée de résidus chargés négativement. L'ensemble est compatible avec les caractéristiques d'une séquence signal. Les outils de prédiction ne reconnaissent pas de peptide signal pour YddB mais l'analyse approfondie de la partie N-terminale de la protéine suggère donc fortement la présence d'un peptide signal avec de légères variations dans la séquence.

De la même manière que pour YddA, nous avons utilisé les logiciels de prédiction Psipred et NPSA pour appréhender la structure secondaire de YddB. La protéine YddB présente de nombreux feuilletts  $\beta$  (environ 22) et quelques d'hélices  $\alpha$  dans la partie N-terminale. Ces résultats sont cohérents avec les caractéristiques des structures des transporteurs de type TBDT. [Figure 73].

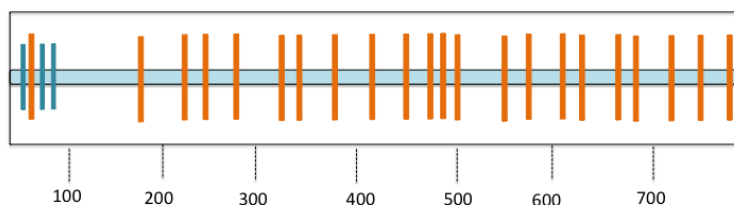


Figure 73 – Prédiction des structures secondaires de la protéine YddB

Les structures secondaires YddB sont prédites avec les logiciels Psipred et NPSA. Cette figure compile les deux prédictions bioinformatiques. Les hélices  $\alpha$  sont figurées en bleu et les feuilletts  $\beta$  en orange.

#### 9.1.3.5 Analyse phylogénique de YddA et YddB par alignements de séquences

Nous avons réalisé un BLAST<sup>12</sup> sur la séquence protéique de YddA en excluant l'ensemble des *E. coli*. La plupart des protéines homologues sont retrouvées chez les protéobactéries. *Shigella dysenteriae* et *Klebsiella pneumoniae*, pathogènes humains, possédant des homologues de YddA avec 99% d'identité. Ces deux entérobactéries sont responsables respectivement de shigelloses (dysenteries bacillaires) et d'infections respiratoires (pneumonies). L'entérobactérie *Dickeya dadantii* pathogène de plantes possède une protéine homologue de YddA avec 37 % d'identité. Enfin, avec 34 % d'identité, il est également retrouvé une protéine homologue de YddA dans la division des firmicutes chez la bactérie *Selenomonas sputigena*, isolée au niveau de la cavité buccale de l'Homme.

Ensuite, un alignement de ces 5 séquences protéiques homologues avec le logiciel ClustalW2 a été réalisé [Figure 74]. De nombreux résidus sont conservés sur toute la séquence. Sur la figure 74 est représentée en noir la séquence Walker A très conservée. Cette séquence permet la liaison de l'ATP. En violet est représentée une potentielle séquence Walker B avec les résidus leucine et acide aspartique liant le magnésium.

12. Basic Local Alignment Search Tool

sp Escherichia	1	-----MITIPITLRMLIAKYLCLLKPFWLRKNNKTSVLLIIIIILAMILGVVKIQVWLNDDWNNDF
sp Shigella	1	-----MITIPITLRMLIAKYLCLLKPFWLRKNNKTSVLLIIIIILAMILGVVKIQVWLNDDWNNDF
sp Klebsiella	1	-----MLIAKYLCLLKPFWLRKNNKTSVLLIIIIILAMILGVVKIQVWLNDDWNNDF
sp Dickeya	1	MASAKSGAVYHAATGEKIVKPFLLRAFALLCRPFWFNRRYWQSWLLAAIVAMGGSIIVLNVRINDWSKTF
sp Selenomonas	1	-----MEKKSVMRRCRAIVRGYWFSEEKWKARGLLAVVIALNFVAVGMLVINDWYNEF
consensus	1	. . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . *
sp Escherichia	60	FNALSQKETDKLWQLVLFWFPALLGIFVLISVNKTWLIKLLTIRWREWLTDDYLNRFADKNYFTQIYGE
sp Shigella	60	FNALSQKETDKLWQLVLFWFPALLGIFVLISVNKTWLIKLLTIRWREWLTDDYLNRFADKNYFTQIYGE
sp Klebsiella	51	FNALSQKETDKLWQLVLCFPALLGIFVLISVNKTWLIKLLTIRWREWLTDDYLNRFADKNYFTQIYGE
sp Dickeya	71	YDALGAFDSGLLYRLIKEYKLYLIYIGVFVYQEWLTKLLIIRWREQMTAAFIDSWLAKRAFVRLSLSGR
sp Selenomonas	55	YNALQAYEYELFWPLVGVKFAFLAVVHIAVAVYATYLRQMLQIKWRTWLTDRYLARWMENRAYKLETLAE
consensus	71	..**.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
sp Escherichia	130	HKNTDNDPQRIAEIDILLISKTLSSLSFGFIQSLSMITFTVILWESAGTLSFTVGGTEWNIQGYMVTYV
sp Shigella	130	HKNTDNDPQRIAEIDILLISKTLSSLSFGFIQSLSMITFTVILWESAGTLSFTVGGTEWNIQGYMVTYV
sp Klebsiella	121	HKNTDNDPQRIAEIDILLISRTLSLSFGFIQSVSMITFTVILWESAGTLSFTVGGTEWNIQGYMVTYV
sp Dickeya	141	---VDNPDQRIAQDVLDFVTQTVRLSVSFIITFAQLLSFLIILWDLGCVQQFTLWGHSVTVSGYLVWVAV
sp Selenomonas	125	G--TDNPDQRISEDIGQFVELTTLVSVGFLKQLTTLAAFAVVLWNLGVLTVPGSWEFHIYGYMLWFSL
consensus	141	....*****.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
sp Escherichia	200	LIVIGGTLFTHKVGKRIRPLNVEKQRSEATFRTNLVQHNNKQAEIALSNAESLQRQELSDNFHTIKENWH
sp Shigella	200	LIVIGGTLFTHKVGKRIRPLNVEKQRSEATFRTNLVQHNNKQAEIALSNAESLQRQELSDNFHTIKENWH
sp Klebsiella	191	LIVIGGTLFTHKVGKRIRPLNVEKQRSEATFRTNLVQHNNKQAEIALSNAESLQRQELRNNFHTIKENWH
sp Dickeya	208	LYTLGSLITQWIGKRLHGINYHKQAEADFRASLLRKHDSAEQIALYGGERQEKRLGGYFASIVSNWR
sp Selenomonas	193	IYSVLGTVGAHRVGRKLIQLNFQKRFQADFRFMMRVRENSESVAFYGGTQEVGRGFERFARVIGNFR
consensus	211	.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
sp Escherichia	270	RLMNRQRWLDYWQNIYSRSLSVLPYFLLLPQFISGQINLGGLMKSQAFLMVSNNLSWFIYKYDELAELA
sp Shigella	270	RLMNRQRWLDYWQNIYSRSLSVLPYFLLLPQFISGQINLGGLMKSQAFLMVSNNLSWFIYKYDELAELA
sp Klebsiella	261	RLMNRQRWLDYWQNIYSRSLSVLPYFLLLPQFISGQINLGGLMKSQAFLMVSNNLSWFIYKYDELAELA
sp Dickeya	278	SLMNAERNLGLFTVGYTRVSLIVPVFAALPAFLSKTVTLGGLMQIRSAFGQVHSALSWFIRVYSLVELS
sp Selenomonas	263	ELMRQTKILNFYINGYAQLAIVPLVMAAPRYFGGEMALGGLMQTISAFGKVDALSIFYVEAYGSIAYEA
consensus	281	**.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
sp Escherichia	340	AVIDRLYEFH---QLTEQRPTNKPKNCQHAVQVADASIRTPDNKIILENLNFHVS PGKWL L L K G Y S G A G
sp Shigella	340	AVIDRLYEFH---QLTEQHPTNKPKNCQHAVQVADASIRTPDNKIILENLNFHVS PGKWL L L K G Y S G A G
sp Klebsiella	331	AVIDRLYEFH---QLTEQRPTNKPKNCQHAVQVADASIRTPDNKIILENLNFHVS PGKWL L L K G Y S G A G
sp Dickeya	348	ASMTRLDQFRR---EIAAHQNTTPIVQGEHLQVERLSFSTPQQPLLRNVTFCAPGSWNRLSGRSGLG
sp Selenomonas	333	AVVRRLSGFTAHMEEVDAKESAVTLSTSSGGLDVEGLCVSLPDGTELLQGCFSLAPGEALLVTCASGAG
consensus	351	*...**.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
sp Escherichia	406	KTLLKTLTSHCWPWFKG-DISS-PADSWYVSQTPLIKTGLLKEICKALPLPVDKSLSEVLHQVGLGKL
sp Shigella	406	KTLLKTLTSHCWPWFKG-DISS-PADSWYVSQTPLIKTGLLKEICKALPLPVDKSLSEILHQVGLGKL
sp Klebsiella	397	KTLLKTLTSHCWPWFKG-DISS-PADSWYVSQTPLIKTGLLKEICKALPLPVDKSLSEVLHQVGLGKL
sp Dickeya	415	KSTLLRRTLGLWPYYNG-AWQAGRNSLLLPQSQSYLGQALAEVICYPRARLDBAALRQVLDQVGLGDW
sp Selenomonas	403	KSTLLRALAGLWPFARGRAFPANEKRLFLSQRFYLPPLGTLARAVAYPLTAQGPREEERALRLVGMFAF
consensus	421	*...**.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
sp Escherichia	474	AARIHDDRWDIILSSGEQRIALARLILRRPKWIFLDETTSHLEEQAIRLLRLVREKLPTSGVIMVTH
sp Shigella	474	AARIHDDRWDIILSSGEQRIALARLILRRPKWIFLDETTSHLEEQAIRLLRLVREKLPTSGVIMVTH
sp Klebsiella	465	AARIHDDRWDIILSSGEQRIALARLILRRPKWIFLDETTSHLEEQAIRLLRLVREKLPTSGVIMVTH
sp Dickeya	484	GDRLQQQMNWDRVFSGGERQLALARLVNRPDHLVLD EATSALDPQARHLLGVIRQALPDCVTIVAVTH
sp Selenomonas	473	LPRLDEAADWSHLILSLGQQRIAFARILLVVPVWFLDEATSALDEAREKELYEMLAHELPEMIVSVGH
consensus	491	..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
sp Escherichia	544	QPGVWNLADDICDISAVL-----
sp Shigella	544	QPGVWNLADDICDISAVL-----
sp Klebsiella	535	QPGVWNLADDICDISAVL-----
sp Dickeya	554	QQELADLFHYHIDLAAFR-----
sp Selenomonas	543	RSTLREQHEKELHLGGAGSFSTRVLTESA
consensus	561	.....

Figure 74 – Alignement des homologues de YddA

L'alignement des séquences protéiques homologues de YddA est réalisé avec l'outil ClustalW2. Les références des séquences alignées sont : GI :2828199 pour *E. coli* GI :585369035 pour *S. dysenteriae*, GI :571213768 pour *K. pneumoniae*, GI :503081716 pour *D. dadantii* et GI :493207095 pour *S. sputigena*. Sont représentés en noir, la séquence de Walker A, en violet, les résidus conservés de la séquence de Walker B et en vert, la séquence C, motif conservé chez les transporteurs ABC.

Comme pour YddA, nous avons réalisé un BLAST<sup>13</sup> sur la séquence protéique de YddB en excluant l'ensemble des *E. coli*. Des homologues de YddB sont retrouvés chez les protéobactéries proches d'*E. coli* comme *S. dysenteriae* et *K. pneumoniae* avec un pourcentage d'identité de 99%. Un homologue de YddB est également retrouvé chez une autre bactérie pathogène opportuniste, *Achromobacter xylosoxidans* avec un pourcentage d'identité de 33%. Cette bactérie appartient à l'ordre des Burkholderiales et est fréquemment retrouvée chez des patients atteints de mucoviscidose et altère leurs fonctions respiratoires. Des homologues de YddB ont également été identifiés chez des bactéries de l'environnement. *Microvirgula aerodenitrificans* (37 % d'identité) est isolée dans les stations d'épuration et intervient dans le traitement des eaux usées et *Shewanella algae* (30 % d'identité) est retrouvée dans les eaux marines.

Ensuite, nous avons réalisé un alignement avec l'outil ClustalW2 entre les 6 homologues de YddB obtenus après le BLAST [Figure 75]. L'extrémité COOH est relativement bien conservée chez l'ensemble des protéines alignées. Cependant l'extrémité NH2 l'est beaucoup moins. Par exemple l'homologue de YddB chez *S. dysenteriae* ne possède pas la partie "plug". Les 99 % d'identité obtenus suite à l'alignement concerne le domaine en tonneau  $\beta$  uniquement. Toutefois, il est possible de mettre en évidence quelques résidus conservés entre ces séquences protéiques essentiellement au niveau du domaine en tonneau  $\beta$ . Deux résidus sont très conservés, il s'agit de l'acide aspartique 583 et de l'asparagine 635. Une séquence est assez bien conservée entre les résidus 543 et 548. Cette séquence, TPYNDE, est absente chez *A. xylosoxidans*. Chez *A. xylosoxidans*, l'homologue de YddB possède une partie N-terminale supplémentaire. Ce domaine est une courte séquence pouvant être présente chez les récepteurs TonB-dépendant.

---

13. Basic local alignment search tool



sp|Microvirgula 1 -----MIGMTLGAALCVPAAPARADG--LPAETRYQIPAGSLEAAVNRLGREAGVMISFGSHIAAG  
sp|Achromobacter 1 MPFPLDGRRRSGVPAALCLMLLAIAPVGAQPPARTQTYDMPAQPLGNALLALGRQSGLE ISFPPAAV  
sp|Shigella 1 -----  
sp|Klebsiella 1 -----  
sp|Escherichia 1 -----  
sp|Shewanella 1 -----MK  
consensus 1

sp|Microvirgula 61 RQTAGLDGRYSLLDALKQLLVGSGIEVAGDARDGFVLRPDGRSSAGGNPDSLPAVVVIADRLRDEIRLPV  
sp|Achromobacter 69 AGKMAPALHGEYSALLALDRLLAGS-----GLALRADG-----PG RYIVFVDKANPFSTSR  
sp|Shigella 1 -----  
sp|Klebsiella 1 -----  
sp|Escherichia 1 -----MKRVLIPGVILCGADVAQAVDDKNMYMHFFEE  
sp|Shewanella 3 KHAAVVCG-----LALVPVAQAQVQVDADQQE  
consensus 71 . . .

sp|Microvirgula 131 VVISDRRPPPLAPGRALLSADDIRNTPAANGDLSELLATHPAVRQNS SAGGS LTRGSLAPEDLSFHGASPY  
sp|Achromobacter 121 EPVRVYGEQT----GERVFDKEE IATTPSSNHDLS TLVANH P AVRTNPGAAGSQNRGSLNVEDISFHG  
sp|Shigella 1 -----  
sp|Klebsiella 1 -----  
sp|Escherichia 33 MTVYAPVPVNVGNTHYTSSEIERLPTGNNGNISDLLRTNPAVRMDS TQSTSLNQGD IRPEKIS IHGASPY  
sp|Shewanella 30 IIVREQADNGLTQHETLTR EDIKKRPTGDGNLTDLLRNP AVQFSNSANS SLLNQGE IKPADIS IHGSNAY  
consensus 141 . . . . .

sp|Microvirgula 201 QNLFQIDGMDGSNNINPANKNSNLQVRNIPSN SQAYFLDTRLLGGEVRFVDSNI PVEYGRFNNGGVVDARLK  
sp|Achromobacter 185 ASPYQNLFIQIDGIDATNRVDPASKNLN LQVGNVP SNPQSYFIDTSLLESVRVYDS FVPVEYGRFTGGVV  
sp|Shigella 1 -----MLITPNPANESDASSATNISGMSQGYFLDVSLLDNVTLYDSFVPVEFGFRNNGVIDAKIK  
sp|Klebsiella 1 -----  
sp|Escherichia 103 QNAYLIDGISATNNLN PANESDASSATNISGMSQGYLDVSLLDNVTLYDSFVPVEFGFRNNGVIDAKIK  
sp|Shewanella 100 QNAFLDGM SINNDLPVDG SVVTNAR--LS SDEQGLYVDSRLIDSVTLYDANI PVEFGFTGGVVDATTR  
consensus 211 . . . . .

sp|Microvirgula 271 RASGQDS-VDVG YRMGSNLSEQRVSDGNQSNYDLGMSG--YTPDWRKRFYSLNVDRKLD DDFGVVLGL  
sp|Achromobacter 254 DARLRRFSGENH-LKFDYRWNTSKM TRQHVSEGEENSWAQQQPG--YSPDWKRFYSAVGDFAFNDKA  
sp|Shigella 62 RFNADDSKVKLGYRTRSDWL TSHIDENNKSAFNQGS SGSTYSPDFKKNFYTL S FNQELADNFVGTAGL  
sp|Klebsiella 1 -----  
sp|Escherichia 173 RFNADDSKVKLGYRTRSDWL TSHIDENNKSAFNQGS SGSTYSPDFKKNFYTL S FNQELADNFVGTAGL  
sp|Shewanella 169 SWQGETAASVYFRQTDAS WNKVHI DDKLQFDS ANNDLSQPARFQTDYSKRNYGLSFETGITDDLGFVASV  
consensus 281 . . . . .

sp|Microvirgula 337 SRRESDIRRASS-VSLDKSVVA-----GTSTEQDRVDNLLGKLSWVIDSDT VTDLTLKY SARREQ  
sp|Achromobacter 319 GVLAMSRRES DITRW NMGVDDDGQPQQ-----GQDYRDRVDN FLGKFSVRASADTTADLTLK  
sp|Shigella 132 SRRQSDITRADY--VSDNGIVA-----GRAQYKNVIDTALS KFTWFASDRFTHD LTLKYTGSSRD  
sp|Klebsiella 1 -----MSKFTWFASDRFTHD LTLKYTGSSRD  
sp|Escherichia 243 SRRQSDITRADY--VSDNGIVA-----GRAQYKNVIDTALS KFTWFASDRFTHD LTLKYTGSSRD  
sp|Shewanella 239 SRRESKIPMMNV PATAVGLDANGELVAFK TGGGLKHQRRTSDN LFSKFTWYASPRTTAHL SLAY SAYEAD  
consensus 351 . . . . .

sp|Microvirgula 396 RANS LFVDSRWDNEHDAAGVAVNL DQRLNGAKFNFQ LGWDRFDDSR---TSNSDDLVT HYFASTRTQFTT  
sp|Achromobacter 378 YSDRSET LSSYLFRDTRW DNNHAGYGLSGNLEHLFQGGRFALQAGWDHATS DR--QSVGDELVT-Y Q  
sp|Shigella 190 YNTSTFPQSDREMGNKSYGLAWMDTQLAWAKLR TT VGDWHISDYTRHDHIWY TELSCTYGDITGRCTR  
sp|Klebsiella 27 YNTSTFPQSDREMGNKSYGLAWMDTQLAWAKLR TT VGDWHISDYTRHDHIWY TELSCTYGDITGRCTR  
sp|Escherichia 301 YNTSTFPQSDREMGNKSYGLAWMDTQLAWAKLR TT VGDWHISDYTRHDHIWY TELSCTYGDITGRCTR  
sp|Shewanella 309 MFNGVANSDYRDEHKGYSSTLE IEHGFDASTL ELSLNYNRMTDKRAGEQTYWVQLMDWQSNRS--YSS  
consensus 421 . . . . .

sp|Microvirgula 463 GGLGKEQKTRDSWALKARLDLDP LLTGPVAHTLSVGVDSQWVEVDYQRFNDASSYRLTHQANGS-EKITTS  
sp|Achromobacter 442 PYRLPRYTAGGFGKEQTRQDTWTLKGRVDLDPVRTGIFTHSLYAGADLQQVEAGFKRFQ DSYSFRVYD  
sp|Shigella 260 GGLGHISQAVDNYTFKTRLDWQKF AVGNVSHQPYFGAEYIYSDAWTERH NQSESYVINAAG----KKTN  
sp|Klebsiella 97 GGLGHISQAVDNYTFKTRLDWQKF AVGNVSHQPYFGAEYIYSDAWTERH NQSESYVINAAG----KKTN  
sp|Escherichia 371 GGLGHISQAVDNYTFKTRLDWQKF AVGNVSHQPYFGAEYIYSDAWTERH NQSESYVINAAG----KKTN  
sp|Shewanella 376 GPGDL DSTQETS AKLKWWDPLK WAGMSHTFTLGGEASYTDAEFNRDKTY YRNNYDGSLEMMGWSQLR  
consensus 491 . . . . .

sp|Microvirgula 532 LTRYHAGQVGVSYNSQALWLAD EMRWGRVSLTPGLRFD RDSYLGNSNLS PRTRLDWDLFGSRQSVVTLGM  
sp|Achromobacter 511 NKAH-QDFSKVHYLP GKVNVTYS MASVYLS DRIEWQR LALDAGLRYDRE TFLGNTNVSPRTRLEWDVL  
sp|Shigella 325 HTIYHKGKGLGIDNYALY MADRISWRNVS LMPGVRYDYDNYLSNHNIS PRFMTEWDIFANQTSMITAGY  
sp|Klebsiella 162 HTIYHKGKRLGIDNYTLYMADRISWRNVS LMPGVRYDYDNYLSNHNIS PRFMTEWDIFANQTSMITAGY  
sp|Escherichia 436 HTIYHKGKRLGIDNYTLYMADRISWRNVS LMPGVRYDYDNYLSNHNIS PRFMTEWDIFANQTSMITAGY  
sp|Shewanella 446 LDAFLEGRYKSTHSQYALYVEDVINWGF SFRPGLRLDHDFVNRNNLAPRLSSWNLFNGNTLLTAGA  
consensus 561 . . . . .

sp Microvirgula	602	ARYYGDNVLDLALRERVSKLTESVLSNSAGLPVAS---SGSGEISRYRDLDPYNDERSLALTOQFAG-LE
sp Achromobacter	579	GSGDTLLSAGWSRYGSEVLETALEAERSRLRRQVLDKGR PVAD---GGKEYFVDYRGLRMPYDDEWA
sp Shigella	395	NRYGGNILDMLRDIRNSWTESVS-----GNKTLTRYQDLKTPYNDELAMGLQKIGKNVI
sp Klebsiella	232	NRYGGNILDMLRDIRNSWTESVS-----GNKTLTRYQDLKTPYNDELAMGLQKIGKNVI
sp Escherichia	506	NRYGGNILDMLRDIRNSWTESVS-----GNKTLTRYQDLKTPYNDELAMGLQKIGKNVI
sp Shewanella	516	NRYYGRSMLTYALYSGQNGGLVHCYFDCKPNSADNDWMPTRDYEEMELQTPYNDEFAGVQQIWN-SI
consensus	631	.....
sp Microvirgula	668	GVLSYVHREGRD---QINKRALRDSKNVLLGYEYVNDGESRTDSFGLSLANQRPWQALGADWQMLALS
sp Achromobacter	645	VSLRQRMAG-IEGLLSYVHRNGRD---QWTK- ----SGTDAAGYTYANDGFSTTDGVSLTLRLPEWRL
sp Shigella	452	ARANYVYREAHD---QISKSSRTDSATKTTITEYNNDGKTKTHSFSLSFELAEPLHIRQVDINPQIVFSY
sp Klebsiella	289	ARANYVYREAHD---QISKSSRTDSATKTTITEYNNDGKTKTHSFSLSFELAEPLHIRQVDINPQIVFSY
sp Escherichia	563	ARANYVYREAHD---QISKSSRTDSATKTTITEYNNDGKTKTHSFSLSFELAEPLHIRQVDINPQIVFSY
sp Shewanella	585	WKLNYVHRNGRDEVRSRYKYPGTDDEYQRAIRTFDNGSGSTSHDSVIFTLMNRETLPFGANHQAKFSVAW
consensus	701	.. ..*
sp Microvirgula	735	ERFRSNNSLVDGYDDTGVD---NEQIYYNGKLI DAADRPTANFNQPSRVTLDLNAGWNGIGLRWNNRFN
sp Achromobacter	705	GPTRWNMQASWSWQKRKTNGDLV TGYTAAARDP---DDRVIYNGSEIRAIDLPPSTFYQPQVASLTLIG
sp Shigella	519	IKSKGNLSLNNGYEESNTG---DNQVVYNGNLVSYDSVPVADFNNPLKISLNMDFTHQPSGLVWANTLA
sp Klebsiella	356	IKSKGNLSLNNGYEESNTG---DNQVVYNGNLVSYDSVPVADFNNPLKISLNMDFTHQPSGLVWANTLA
sp Escherichia	630	IKSKGNLSLNNGYEESNTG---DNQVVYNGNLVSYDSVPVADFNNPLKISLNMDFTHQPSGLVWANTLA
sp Shewanella	655	QETKSNTPKDEGYSYFESGLNVADKVVYDGVIAAADLPATDFNAPWKIDLELTHEFDYGLTWYNLLH
consensus	771	.....*
sp Microvirgula	801	WLSKRDDVFYVGVN-----KADQLDMYQEGTLPSYWTWDARLVWQPTFWR--QLELTVDILNVLNRQPV
sp Achromobacter	771	AYPRMGLTWSNKLN WRSKRDIYVGVGP-----RPQSLDRYESGELPSYWTWDTKLAWQPTFAR--NL
sp Shigella	585	WQEARKARIILGKTNAQYISEYSDYKQYVDEKLDSSLTWDTRLRSWTPQFLKQQNLTISADILNVLDSKTA
sp Klebsiella	422	WQEARKARIILGKTNAQYISEYSDYKQYVDEKLDSSLTWDTRLRSWTPQFLKQQNLTISADILNVLDSKTA
sp Escherichia	696	WQEARKARIILGKTNAQYISEYSDYKQYVDEKLDSSLTWDTRLRSWTPQFLKQQNLTISADILNVLDSKTA
sp Shewanella	725	WTSSREQASRDQNGYFRDPETGKDLVKYAKVDYASTFRWDTKLQWQPEFARG--ASVSVETIYNLLNRKNA
consensus	841	.....
sp Microvirgula	863	LVSTSPLIKRNNDQYGNGREIWLQANYRF
sp Achromobacter	833	EFTVE VLNLLNRMPAVTASNPNLKNRSTFQSGRELWLQVGYRF
sp Shigella	655	VDTTN----TGVATYASGRTFWLDVSMKF
sp Klebsiella	492	VDTTN----TGVATYASGRTFWLDVSMKF
sp Escherichia	766	VDTTN----TGVATYASGRTFWLDVSMKF
sp Shewanella	793	NDSFVY-QDQLYFNYPGRQFWLQLNVEY
consensus	911	.....

Figure 75 – Alignement des homologues de YddB

L'alignement des homologues de YddB est réalisé avec l'outil ClustalW2. Les références des séquences alignées sont : GI :655049132 pour *M. aerodenitrificans*, GI :651249561 pour *A. xylosoxidans*, GI :491176421 pour *S. dysenteriae*, GI :571213766 pour *K. pneumoniae*, GI :2506665 pour *E. coli* et GI :640581139 pour *S. algae*

#### 9.1.4 YddA et YddB, nouveau système d'import du nickel chez *E. coli* ?

L'ensemble de ces données nous amène à proposer plusieurs hypothèses sur le fonctionnement de ce système d'import. Si l'on considère que les bases de données prédisent YddB comme un récepteur TonB dépendant, l'import du Ni pourrait être réalisé de la même façon que le fer avec la participation d'un potentiel nickelophile apportant les ions Ni<sup>2+</sup> à la protéine YddB [Figure 76 A.]. Le transport des ions Ni<sup>2+</sup> via YddB fonctionnerait grâce à la transduction de la force proton motrice exploitée par le système TonB-ExbBD à partir de la membrane cytoplasmique. Puis les ions Ni<sup>2+</sup> seraient pris en charge par un second partenaire périplasmique qui apporterait les ions Ni<sup>2+</sup> au transporteur YddA pour le passage de la membrane interne. Cependant l'absence de la boîte TonB chez YddB suggère soit que TonB se lie à YddB via une autre séquence d'acides aminés, soit que le transport des ions Ni<sup>2+</sup> par YddB est indépendant du système TonB-ExbBD. Ceci nous conduit à émettre d'autres hypothèses. Le système de transport YddB pourrait fonctionner avec un autre système énergétique ou par diffusion facilitée [Figure 76 B.]. Les ions Ni<sup>2+</sup> seraient pris en charge par un partenaire périplasmique

encore inconnu. Les ions  $Ni^{2+}$  seraient dirigés vers YddA, possédant une activité ATPase, pour rejoindre le cytoplasme. Enfin, le système pourrait être encore plus simple, en ne faisant intervenir que deux partenaires, YddB pour le transport de la membrane externe et YddA pour le transport de la membrane interne [Figure 76 C.].

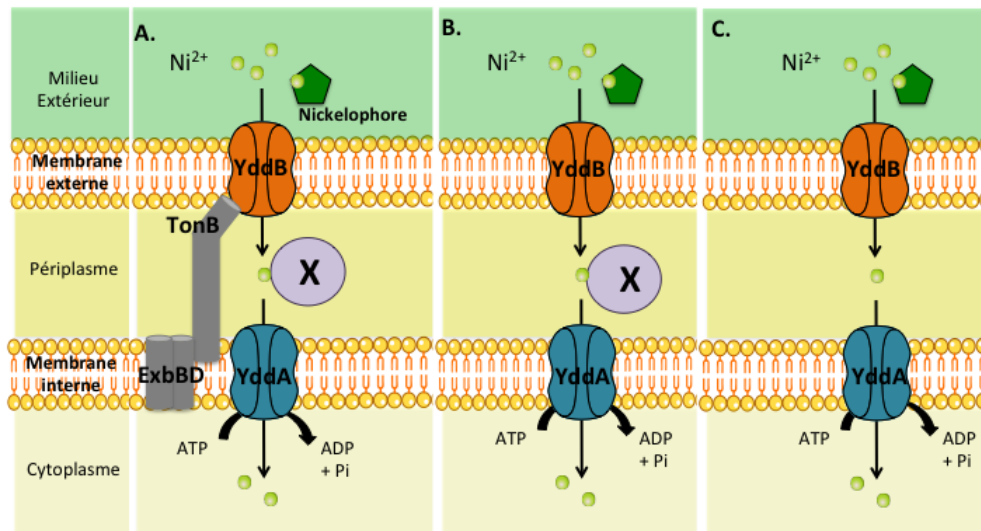


Figure 76 – Le système YddAB, hypothèse d'un système d'import actif des ions  $Ni^{2+}$  chez *E. coli*

**A.** Les ions  $Ni^{2+}$  seraient apportés par un nickelophore et traverseraient la membrane externe par le transporteur YddB à l'aide du système énergétique TonB-ExbBD. Cependant, la liaison entre TonB et YddB serait indépendante de la boîte TonB. Ensuite, les ions  $Ni^{2+}$  seraient pris en charge par un partenaire protéique inconnu et traverseraient la membrane interne via le système transporteur de type ABC, YddA. **B.** Les ions  $Ni^{2+}$  traverseraient la membrane externe par le transporteur YddB avec un système énergétique inconnu. Les ions pourraient être pris en charge par un second partenaire également inconnu qui apporterait les ions  $Ni^{2+}$  au transporteur YddA permettant ainsi le passage de la membrane interne. **C.** Les ions  $Ni^{2+}$  traverseraient la membrane externe par le transporteur YddB. Une fois dans le périplasma, les ions traverseraient la membrane cytoplasmique par le transporteur YddA.

**Conclusion :** L'analyse transcriptomique nous a permis d'identifier plusieurs gènes pouvant coder des protéines transportant potentiellement les ions  $Ni^{2+}$ . Ces résultats, couplés à ceux obtenus après la détermination des profils de résistance aux ions  $Ni^{2+}$ , nous ont dirigés vers l'étude des deux gènes *yddA* et *yddB*. Ces deux gènes codent respectivement un transporteur de type ABC situé au sein de la membrane interne et un transporteur prédit pour être un transporteur TonB-dépendant (TBDT) au niveau de la membrane externe. Les mutants de ces gènes sont résistants aux ions  $Ni^{2+}$  et les expériences de transport de Ni radioactif montrent que ces mutants entraînent une diminution accrue de l'entrée des ions  $Ni^{2+}$  dans la cellule. Ces deux protéines sont donc impliquées dans un système de transport du nickel. Cependant, le mécanisme exact de ce transport reste à

déterminer. En effet, les analyses bioinformatiques ont révélé des similitudes au niveau des domaines protéiques de YddB avec les TBDT qui classerait la protéine YddB dans cette famille. Mais l'absence d'une boîte TonB suggère éventuellement un mécanisme d'import des ions  $Ni^{2+}$  différents de ceux décrits pour l'entrée des ions  $Fe^{2+}$ . Ce système YddAB nécessite-t-il d'autres partenaires protéiques extra ou intracellulaires ? YddB est-il réellement un transporteur TonB-dépendant ? De plus amples investigations sont nécessaires pour répondre à ces questions.



# Quatrième partie

## Conclusion



# Chapitre 10

## Discussion et perspectives

Les métaux ont un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire puisqu'il est estimé qu'un quart à un tiers des protéines sont des métalloprotéines (Waldron and Robinson, 2009). La maturation de ces métalloprotéines nécessite un adressage correct des ions métalliques. Pour cela les métaux doivent tout d'abord traverser les membranes cellulaires, nécessitant un transport ou une solubilisation des ions. Dans les cellules eucaryotes, les métaux doivent accéder au bon compartiment cellulaire. Enfin, la fixation sélective du métal au sein de la protéine est essentielle à la maturation de ces métalloprotéines. Tous ces paramètres sont dépendants de la nature des métaux. En effet, les métaux de transition possèdent une sous-couche  $d$  incomplète, qui leur procure des états d'oxydation variés. Leur stabilité est basée sur leur capacité d'interaction avec les ligands suivant la série d'Irving-Williams (Irving and Williams, 1948). Ainsi les bactéries, pour contrôler la maturation des métalloprotéines, sont capables de maintenir un équilibre entre l'import et l'efflux par des systèmes de transport spécifiques de chaque métal [Figure 20].

### 10.1 Maintien de l'homéostasie du nickel par les transporteurs.

#### 10.1.1 Le système Rcn dans l'efflux du nickel

Le système Rcn est décrit comme permettant d'effluer l'excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ . RcnB, protéine accessoire périplasmique, est impliquée dans l'efflux de ces cations en coopération avec la pompe RcnA (Blériot et al., 2011). Les résultats présentés dans cette étude ont mis en évidence l'absence d'interaction directe entre RcnB et les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ <sup>1</sup>. De manière inattendue, RcnB est capable de fixer du cuivre *in vitro* avec une faible affinité ( $K_D$  de 1,8  $\mu\text{M}$ ) ([Figure 24]. L'affinité entre la protéine et le ligand justifie une fonction biologique bien que cette affinité soit faible comparée à d'autres protéines périplasmiques liant le cuivre. Par exemple, CopH, protéine périplasmique fixant du cuivre chez *Cupriavidus metallidurans* possède un site de fixation du  $\text{Cu}^{2+}$  de haute affinité ( $K_D$  de 36 nM) et un site de faible affinité ( $K_D$  de 2,5  $\mu\text{M}$ ) (Sendra et al., 2009). L'absence de RcnA ne modifie pas le profil de résistance au cuivre, ce qui laisse penser que cette protéine n'est pas impliquée dans l'homéostasie du cuivre (Rodrigue et al., 2005). Cependant la surexpression de RcnB sur un plasmide haut nombre de copies confère à la bactérie une résistance accrue au cuivre, démontrant la fixation du cuivre

---

1. Données non montrées



*in vivo* (Blériot et al., 2014). *E. coli* possède deux protéines périplasmiques à cuivre, CueO et CusF, impliquées dans la détoxification du cuivre (cf section 2.2). RcnB pourrait participer à la détoxification du cuivre. Le mutant  $\Delta rcnB$  a le même profil de résistance que la souche sauvage en présence de cuivre [Figure 26]. De plus, les doubles mutants  $\Delta rcnB\Delta cueO$  et  $\Delta rcnB\Delta cusF$  ne sont pas plus sensibles au cuivre que les simples mutants  $\Delta cueO$  et  $\Delta cusF$  [Figure 27]. La mutation du gène *rcnB* chez *E. coli* en présence d'un excès d'ions  $Cu^{2+}$  n'affecte pas la résistance au cuivre de la bactérie car les systèmes spécifiques de détoxification CueO et CusCFBA suffisent à maintenir l'homéostasie du cuivre. Contrairement aux gènes *cueO* et *cusF*, l'expression du gène *rcnB* n'est pas induite par le cuivre [Figure 27]. Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré que le gène *rcnB* est co-transcrit avec le gène *rcnA* et induit par les ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  grâce à un promoteur commun (Blériot et al., 2011). Cependant, il semblerait que le gène *rcnB* possède son propre promoteur situé dans la région intergénique *rcnA/rcnB*. L'analyse des séquences homologues du gène *rcnB* indique qu'il peut être retrouvé isolé dans le génome. Cela suggère que la protéine RcnB pourrait avoir une fonction autre que la résistance et l'efflux des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$ . L'analyse de la séquence protéique de RcnB ne prédit aucun site de liaison au cuivre. Cependant, chez les entérobactéries, les homologues de RcnB possèdent un motif putatif de liaison au cuivre conservé : H82W83XXM86. La protéine mutante RcnB-H82A s'est avérée instable et dégradée lors de sa surproduction contrairement à la protéine RcnB-M86A. Les différences de spectres d'absorption UV-visible montrent que le mutant RcnB-M86A perd la capacité à fixer le cuivre [Figure 28]. Cela signifie que le résidu M86 est impliqué dans la liaison entre RcnB et son ligand. D'un point de vue physiologique, le mutant *rcnB*-M86A ne permet plus l'efflux des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  [Figure 29]. Cette liaison du cuivre par RcnB semble essentielle pour sa fonction dans la résistance à ces cations. Plusieurs hypothèses peuvent être soumises quant au rôle du cuivre. Celui-ci pourrait avoir un rôle structural. Le cuivre pourrait être requis pour que RcnB fixe des ions  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  sous forme libre ou sous forme complexé. Il a été montré que NikA, la protéine de liaison périplasmique du système d'import d'ions  $Ni^{2+}$ , NikABCDE, est incapable de lier directement le nickel mais nécessite un agent chélatant organique comme un nickelophore (cf section 2.4). Dans le cas de RcnB, le cuivre pourrait favoriser les interactions ou la fixation des ions  $Ni^{2+}$  ou  $Co^{2+}$ .

Le cuivre pourrait être important pour l'interaction de RcnB avec d'autres partenaires. Le premier partenaire envisagé est la pompe d'efflux RcnA. Les expériences de double hybride membranaire chez la levure ont présenté des résultats encourageants quant à une possible interaction entre ces deux protéines [Figure 22]. Cependant lorsque des ions  $Ni^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  sont ajoutés, les interactions entre les deux partenaires ne sont pas modifiées [Figure 23]. Le modèle levure utilisé ne nous permet pas de conclure quant aux rôles des ions  $Ni^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  dans l'interaction entre RcnA et RcnB. D'autres techniques doivent être envisagées pour compléter ces résultats. L'une des difficultés majeures pour l'étude de cette interaction est la protéine membranaire RcnA. En effet, sa surproduction et sa purification sont compliquées en raison de sa nature hautement hydrophobe. C'est pourquoi nous avons initié une approche par BiFC<sup>2</sup>. Nous pourrions ainsi surproduire RcnA de manière acellulaire grâce au kit RTS 100 (Roche) évitant les problèmes de toxicité que présente cette protéine membranaire.

2. BiMolecular Fluorescence Complementation

La compréhension exacte de ce nouveau mécanisme d'efflux est primordiale pour appréhender le maintien de l'homéostasie du nickel. Lors de l'analyse d'un stress provoqué par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , le système Ydd s'est avéré être un autre système de transport du nickel, permettant le maintien de son homéostasie.

## 10.1.2 Le système Ydd dans l'import du nickel

### 10.1.2.1 Le passage des ions $\text{Ni}^{2+}$ à travers la membrane externe est assuré par le transporteur YddB

Chez *E. coli* aucun système d'import spécifique du nickel de la membrane externe n'a été décrit jusqu'alors. L'analyse globale par RNA-Seq d'un stress provoqué par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  nous a permis de sélectionner des protéines pouvant remplir cette fonction. La transcription du gène *yddB* s'est avérée être réprimée en présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  [Tableau 14]. Ces résultats ont été confirmés par qRT-PCR [Tableau 15]. Les profils de résistance et de transport d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  démontrent l'implication de la protéine YddB dans l'import du nickel [Figure 9.1.2 et Figure 67]. La protéine YddB est prédite pour être un transporteur TonB dépendant de type TBDT [Figure 72]. En effet, cette protéine possède de nombreuses similitudes avec les TBDT, notamment une structure en tonneau  $\beta$  ainsi que la présence d'un bouchon [Figure 77].

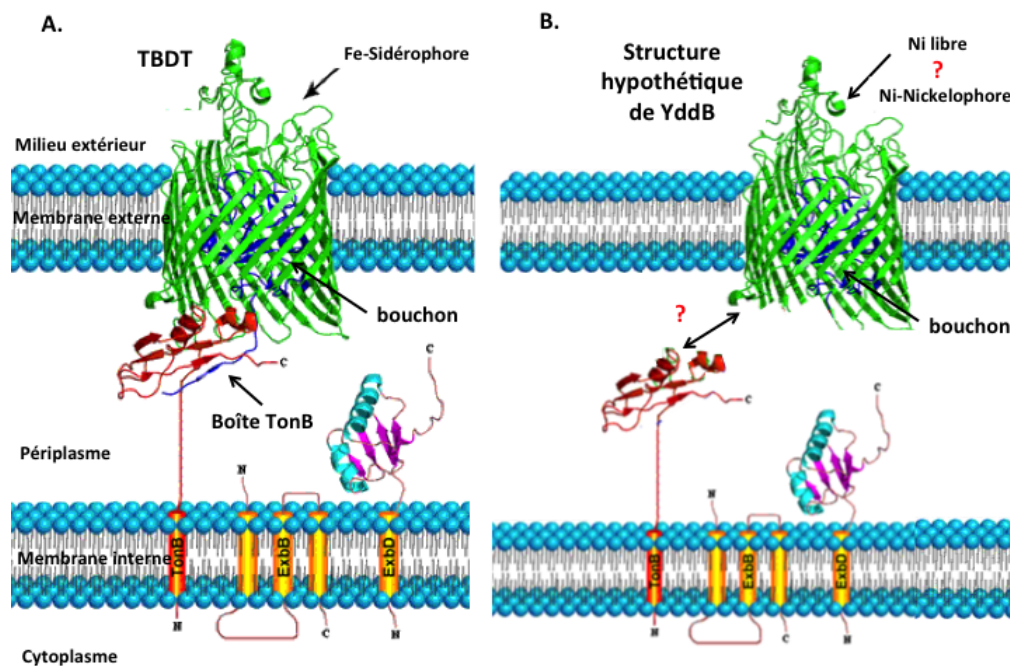


Figure 77 – Comparaison structurale entre un transporteur TonB dépendant et la protéine YddB

**A.** Structure d'un transporteur TonB dépendant pouvant transporter un complexe Fe-sidérophore, par exemple. Ce transporteur est composé d'un tonneau en feuillet  $\beta$ . Il possède une boîte TonB permettant la liaison avec la protéine TonB nécessaire au transfert d'énergie. Ce transfert d'énergie, grâce au système TonB/ExbB/ExbD, permet le passage du complexe Fe-sidérophore vers le périplasma. **B.** Structure hypothétique de la protéine YddB transportant les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Par analogie avec les systèmes TBDT, les ions  $\text{Ni}^{2+}$  peuvent être complexés avec un nickelophore pour leur transport à travers la protéine YddB. Contrairement au TBDT, YddB ne possède pas de boîte TonB.

Cependant YddB ainsi que les protéines homologues ne possèdent pas de boîte TonB typique. Cette boîte TonB est une séquence spécifique impliquée dans la liaison entre le TBDT et le système énergétique TonB/ExbB/ExbD. L'absence de similarité de séquences assez forte entre YddB et des protéines de type TBDT a empêché la modélisation de la structure tridimensionnelle de YddB.

Cependant, plusieurs hypothèses sont envisageables quant au fonctionnement de ce système d'import. La protéine YddB pourrait être associée au système énergétique TonB/ExbB/ExbD. Dans ce cas, la liaison entre TonB et YddB serait indépendante de la boîte TonB. Ces deux protéines pourraient interagir au niveau de différents domaines, alternatifs à la boîte TonB, qui pourraient être responsables du transfert d'énergie. YddB peut tout aussi bien être indépendante du système énergétique TonB/ExbB/ExbD et n'avoir en commun que la structure avec les TBDT. Le transport des ions  $\text{Ni}^{2+}$  serait réalisé par un transport passif ou par diffusion facilitée, similaire aux transporteurs de type porine qui possèdent également une structure en tonneau  $\beta$ . Pour valider l'une ou l'autre de ces hypothèses, le mutant  $\Delta tonB$  a été testé pour sa sensibilité aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Cependant, la mutation du gène codant cette protéine génère un important défaut de croissance dans cette souche<sup>3</sup>. En effet, cette protéine, de part sa fonction dans le transfert d'énergie, joue un rôle primordial dans l'import de nombreuses molécules nécessaires au métabolisme cellulaire. Les profils de sensibilité aux métaux du mutant  $\Delta tonB$  n'ont donc pas pu être testés de manière fiable.

Généralement les TBDT sont associés à des chélateurs de métaux permettant l'apport du métal jusqu'au transporteur. Les exemples du fer et des sidérophores sont très largement décrits chez *E. coli* et chez de nombreuses autres bactéries (Saha et al., 2013). Dans le sérum humain, les concentrations en nickel sont très faibles (de 3 nM à 10 nM) (Sunderman, 1993). Dans le corps humain, le nickel ne semble pas être sous la forme  $\text{Ni}^{2+}$  libre mais plutôt sous forme complexée avec l'albumine par exemple ou avec de petites molécules organiques comme des polypeptides L-Histidine (Soestbergen and Sunderman, 1972) (Oskarsson and Tjalve, 1979). Par analogie avec les sidérophores du fer, l'existence d'un métallopeptide de nickel nommé nickelophore est envisagée, d'autant qu'un sidérophore spécifique du nickel a été proposé récemment en analysant la structure cristalline de NikA (Lebrette et al., 2013) (cf section 2.4). Une étude chez *H. pylori* a identifié la protéine FrpB4, homologue aux transporteurs TonB dépendants, comme étant un récepteur de la membrane externe lié à l'absorption du nickel (Schauer et al., 2007). La présence d'un nickelophore est suggérée pour apporter les ions  $\text{Ni}^{2+}$  à ce système de transport. Cette assistance permettrait à la bactérie de chélater les faibles quantités de nickel dans l'estomac indispensable pour la colonisation et la virulence de la bactérie pathogène. Par analogie, YddB, nouveau système décrit pour importer des ions  $\text{Ni}^{2+}$ , pourrait également être assisté par un nickelophore.

---

3. données non montrées

### 10.1.2.2 Le passage des ions $\text{Ni}^{2+}$ à travers la membrane interne est assuré par le transporteur YddA

De la même manière, que l'analyse RNA-Seq a montré la répression de l'expression du gène *yddB* par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , l'expression du gène *yddA* semble également être réprimée par ces ions [Tableau 14]. Le gène *yddA* code un transporteur ABC. YddA possède les motifs de Walker A et B ainsi que la séquence C suggérant une activité ATPase [Figure 70]. YddA est une protéine membranaire et l'absence de son gène confère à la bactérie un profil de résistance aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  [Figure 9.1.2]. Les expériences de transport d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  radiomarqués ont montré que le mutant  $\Delta yddA$  présentait un profil d'accumulation intermédiaire entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta yddB$  qui n'accumule plus le nickel. YddA semble donc être impliquée dans l'import des ions  $\text{Ni}^{2+}$  mais de manière moindre que YddB, probablement car sa fonction d'import peut être relayée par d'autres systèmes comme le système NikABCDE par exemple (Navarro et al., 1993) (cf section 2.4).

Le passage des ions  $\text{Ni}^{2+}$  au niveau des deux membranes demande encore quelques investigations supplémentaires pour comprendre le maintien de l'homéostasie du nickel. Cependant, l'analyse de l'expression des gènes *yddA* et *yddB* permet de compléter ces résultats.

### 10.1.2.3 Les ions $\text{Ni}^{2+}$ induisent l'expression des gènes *yddA* et *yddB* dans des conditions proches d'un mode de vie de type biofilm

Le gène *yddB* est adjacent au gène *yddA* mais la régulation de ces gènes n'a pas encore été étudiée. Il serait intéressant de savoir si ces deux gènes sont co-transcrits. Des analyses par qPCR ont montré que l'expression de ces deux gènes était réprimée par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  [Tableau 15]. Les analyses bioinformatiques ne prédisent pas de boîte RcnR ou NikR dans les séquences intergéniques. Néanmoins, des fusions transcriptionnelles des gènes *yddA* et *yddB* pourront être construites afin de tester expérimentalement si les métallorégulateurs NikR et RcnR participent ou non à la régulation de ces gènes.

Un résultat intrigant de ces travaux a été l'obtention de phénotypes pour les mutants  $\Delta yddA$  et  $\Delta yddB$  seulement lorsque ces souches sont cultivées sur boîte de Petri en milieu minimum. Ces conditions peuvent être assimilées à de la micro-anaérobiose. Cependant, la teneur en oxygène seule ne peut pas expliquer la répression de l'expression des gènes *yddA* et *yddB* car les cultures en milieu liquide en conditions anaérobies ne permettent pas cette induction<sup>4</sup>. Ces conditions peuvent également être assimilées à des conditions de croissance de type biofilm. En effet, la physiologie d'une colonie ressemble fortement à la physiologie d'un biofilm. Il existe un gradient en oxygène et en nutriments au sein des biofilms (Stewart and Franklin, 2008). Le système d'import de nickel YddAB pourrait être nécessaire pour des conditions de vie où les cellules sont appauvries en oxygène et en nutriments. Le système YddAB pourrait, en plus d'importer des ions  $\text{Ni}^{2+}$ , importer d'autres ions ou d'autres molécules. C'est pourquoi, des profils de résistance à d'autres métaux comme les ions  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  ont été testés chez le mutant  $\Delta yddB$  [Figure 66]. Aucun de ces ions n'affecte la croissance du mutant malgré la forte répression de l'expression du gène *yddB* par les ions  $\text{Co}^{2+}$  lors de l'analyse par

4. données non présentées

qPCR [Figure 15]. Cependant, d'autres ions et d'autres molécules pourront être testés pour déterminer si YddB est un transporteur spécifique des ions  $\text{Ni}^{2+}$ .

Il serait intéressant de comprendre pourquoi l'import de nickel dans ces conditions est nécessaire. Est-ce que les bactéries d'une colonie ou d'un biofilm, en quelque sorte piégées dans une matrice, peuvent difficilement avoir accès aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ ? Elles seraient alors contraintes d'exprimer des systèmes d'import spécifiques des ions  $\text{Ni}^{2+}$  nécessaires à leur métabolisme comme par exemple, la synthèse des hydrogénases en anaérobiose.

L'analyse des systèmes de transport maintenant l'homéostasie du nickel a mis en évidence des résultats intéressants. En effet, la présence d'ions  $\text{Co}^{2+}$  active le gène *yddB* mais ces ions n'entraînent pas de défaut de croissance du mutant  $\Delta yddB$ . La protéine RcnB fixe des ions  $\text{Cu}^{2+}$  pour moduler l'efflux des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ . Des analyses par spectrométrie de masse ont montré que l'ajout simultané de  $\text{Cu}^{2+}$  et de  $\text{Ni}^{2+}$  dans le milieu de culture augmente la concentration intracellulaire en ions  $\text{Ni}^{2+}$ , mais que RcnB n'était pas impliquée dans cette hausse de la teneur en métaux. L'ensemble de ces résultats suggère alors une interconnexion des systèmes d'homéostasie des métaux. De plus, l'analyse par RNA-Seq d'un stress provoqué par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  chez *E. coli* a montré que l'expression des gènes d'import du fer étaient réprimés et que l'expression des gènes d'efflux du cuivre étaient fortement activés. Ces résultats suggèrent qu'un excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  perturbe l'homéostasie des autres métaux. Nous nous sommes alors demandé quels étaient les mécanismes exacts de la toxicité des ions  $\text{Ni}^{2+}$ .

## 10.2 Mécanismes de toxicité engendrés par les ions $\text{Ni}^{2+}$

### 10.2.1 La toxicité du nickel est liée à des variations des teneurs en fer et en cuivre

L'analyse transcriptomique réalisée chez *E. coli* lors d'un stress nickel révèle que cet excès de métaux entraîne une répression des gènes impliqués dans l'import du fer et une activation des gènes d'efflux du cuivre (cf chapitre 8). Dans ce manuscrit, la nature des métaux et leurs similitudes ont été abordées. C'est pourquoi les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , très proches des ions  $\text{Fe}^{2+}$  dans la série d'Irving-Williams (Irving and Williams, 1948), peuvent mimer ces ions dans la régulation des systèmes d'import du fer FUR dépendant. Nous avons donc vérifié si les ions  $\text{Ni}^{2+}$  pouvaient mimer les ions  $\text{Fe}^{2+}$  dans la répression de la transcription des gènes d'acquisition du fer via le régulateur FUR [Figure 57]. Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  ont un effet similaire aux ions  $\text{Fe}^{2+}$  sur la régulation des gènes d'acquisition du fer sous contrôle du régulateur FUR. Ces résultats *in vitro* n'ont pas été prouvés *in vivo*. Pour cela il faudrait entreprendre une analyse approfondie des potentiels sites de fixation des ions  $\text{Ni}^{2+}$  par FUR et déterminer quels sont les acides aminés spécifiques de la fixation des ions  $\text{Ni}^{2+}$ . La mutation de ces acides aminés permettrait d'abolir la fixation des ions  $\text{Ni}^{2+}$  par FUR tout en conservant la fixation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et d'évaluer l'expression des gènes FUR-dépendante en présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ .

Les résultats de RNA-Seq suggèrent fortement que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  induisent une perturbation des homéostasies des autres métaux. Cela a suscité notre intérêt et des vérifications par des

dosages ICP des quantités intracellulaires en métaux ont été entreprises. Les résultats montrent que la présence de nickel dans le milieu de culture induit une hausse de la teneur en nickel mais également en fer [Figure 54 et Figure 55]. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en RNA-Seq, puisque les ions  $\text{Fe}^{2+}$  libres se fixent sur le régulateur FUR, réprimant les gènes d'acquisition du fer (Hantke, 2001).

La présence de nickel dans le milieu de culture a également montré une hausse de la teneur en cuivre [Figure 54 et Figure 55]. Cette hausse explique également l'activation des systèmes d'efflux du cuivre. En effet, les ions  $\text{Cu}^{2+}$  se fixent sur les régulateurs CueR et CusS activant la transcription des systèmes d'efflux du cuivre (Rensing and Grass, 2003). Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  induisent très fortement le gène *cusC* lors de l'analyse générale du stress nickel par RNA-Seq mais également par qRT PCR [Tableau 12]. Nous nous sommes donc demandé si le système CusCFBA était impliqué dans la résistance aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ . La détermination des profils de résistance a montré que ce système ne permet pas la détoxification du cytoplasme en ions  $\text{Ni}^{2+}$ , et donc ce système n'est pas dédié à l'adaptation des bactéries au stress nickel. L'activation des systèmes d'efflux lors d'un excès de nickel est réellement due à l'augmentation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  qui, eux, induisent les systèmes de détoxification.

Les mécanismes exacts qui régissent la hausse des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  n'ont pas été démontrés. Néanmoins, il est certain que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  perturbent l'homéostasie des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ . Ces résultats sont spécifiques de ces ions, car un excès de nickel ou de cuivre dans le milieu de culture ne modifie pas la teneur en cobalt intracellulaire [Figure 54 et Figure 55].

Pour compléter cette analyse, nous avons testé l'ajout concomitant des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et des ions  $\text{Ni}^{2+}$  sur les teneurs intracellulaires en métaux. Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  seuls augmentent uniquement la teneur en ions  $\text{Cu}^{2+}$ , mais les ions  $\text{Cu}^{2+}$  additionnés aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  augmentent les teneurs en  $\text{Cu}^{2+}$ , en  $\text{Ni}^{2+}$  et en  $\text{Fe}^{2+}$ . Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  dans le milieu de culture ont donc un effet synergique sur les hausses des teneurs en métaux [Figure 54 et Figure 55].

Les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  induisent la production de radicaux libres par la réaction de Fenton (Valko et al., 2005). Une étude *in vitro* chez *Salmonella typhimurium* a montré que l'ADN présentait des cassures causées par les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en produisant une grande quantité de radicaux hydroxyle, et que d'autres métaux comme le  $\text{Ni}^{2+}$  et le  $\text{Cd}^{2+}$  en produisaient peu (Keyhani et al., 2006). Ces travaux ainsi que les nôtres suggèrent donc un nouvel aspect de la toxicité du nickel impliquant une augmentation des teneurs en fer et en cuivre, véritables inducteurs des ROS.

Afin de vérifier si l'ADN est altéré par les ROS lors d'un stress provoqué par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , nous avons étudié la topologie de l'ADN bactérien lors d'un excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ .

### 10.2.2 L'excès d'ions $\text{Ni}^{2+}$ provoque un relâchement de l'ADN

La topologie de l'ADN dépend de l'état d'enroulement de l'ADN qui résulte de l'action des ADN topoisomérases et de protéines associées au nucléoïde (NAPs). Chez la plupart des bactéries, l'ADN circulaire présente un surenroulement négatif facilitant le désappariement local des brins au niveau de la double hélice d'ADN. Ainsi, les supertours négatifs sont une source d'énergie mise à la disposition de l'ARN polymérase pour faciliter l'ouverture locale de

la double hélice et initier la transcription pendant la phase exponentielle de croissance (Dorman, 2008). L'une des premières enzymes modulant la topologie de l'ADN est l'ADN gyrase. Cette enzyme ATP-dépendante utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour introduire des supertours négatifs dans l'ADN circulaire double brin (Gellert et al., 1976). La seconde enzyme est la topoisomérase I qui, elle, favorise la relaxation de l'ADN en éliminant les supertours négatifs via un mécanisme indépendant de l'ATP (Wang, 1971). La topologie de l'ADN est modulée par l'action de protéines NAPs interagissant directement avec l'ADN, en complément de l'action des topoisomérases (Azam and Ishihama, 1999). Par exemple la protéine Fis favorise le surenroulement de l'ADN en phase exponentielle de croissance (Dillon and Dorman, 2010).

Cette topologie est fortement influencée par les conditions environnementales extérieures. Par exemple, l'osmolarité, la température, le pH, la teneur en oxygène sont des facteurs connus pour sensibiliser la topologie de l'ADN (Higgins et al., 1988) (Mojica et al., 1994) (Huo et al., 2008). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'impact des ions  $\text{Ni}^{2+}$  sur la topologie de l'ADN.

L'analyse par RNA-Seq d'un stress provoqué par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  montre que les expressions des gènes codant la topoisomérase I et l'ADN gyrase ne sont pas induites par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Par contre les expressions de certaines NAPs sont fortement impactées par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  [Tableau 13]. L'analyse de l'expression du gène *fis* par exemple, indique que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  répriment son expression. Comme Fis favorise le surenroulement de l'ADN et que son gène est réprimé par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , cela suggère qu'un excès de nickel entraîne un relâchement de l'ADN.

Nous avons montré que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  ne provoquaient pas de cassure de l'ADN et n'avaient pas d'effet mutagène (cf section 8.2). Afin de savoir si les ions  $\text{Ni}^{2+}$  provoquaient un relâchement de l'ADN nous avons réalisé des gels de chloroquine.

Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  entraînent bien un relâchement de l'ADN [Figure 61] ainsi que les ions  $\text{Fe}^{2+}$  [Figure 62] et  $\text{Cu}^{2+}$  [Figure 63]. Ce relâchement est spécifique de ces métaux puisque les ions  $\text{Co}^{2+}$  n'induisent pas de modification de la topologie de l'ADN [Figure 63]. Nous avons montré précédemment que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  induisaient une hausse des quantités de  $\text{Cu}^{2+}$  et de  $\text{Fe}^{2+}$ . L'addition de peroxyde d'hydrogène relâche également la topologie de l'ADN [Figure 61]. Cet effet est contré par l'addition de tiron, "quencher" des anions superoxydes, protégeant l'ADN contre les dommages oxydatifs (Tree et al., 2005). De la même manière, le tiron protège l'ADN de l'effet des ions  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  car l'ADN est plus surenroulé lorsque le tiron est ajouté en même temps que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  [Figure 62].

L'ensemble de ces résultats indique que le relâchement de l'ADN est dû à la production d'espèces réactives oxygénées. Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  ne sont pas capables de réaliser la réaction de Fenton, mais provoquent tout de même un relâchement de l'ADN. Nous proposons que la topologie de l'ADN est sensibilisée par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  via la modification des homéostasies des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  induisant un stress oxydant. Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont également capables de modifier l'expression des NAPs renforçant l'état de relâchement de l'ADN.

Les PGRP<sup>5</sup>, protéines conservées chez les mammifères, sont des protéines de l'immunité innée conférant un effet bactéricide. Une étude a montré chez *E. coli*, par une analyse transcriptomique, que les PGRP entraînaient l'induction d'un stress oxydant, une déplétion des

---

5. Peptidoglycan Recognition Protein

groupements thiols et une augmentation intracellulaire de zinc et de cuivre et plus généralement une augmentation des systèmes de résistance au stress métallique (Kashyap et al., 2014). En réponse à la présence de ces PGRP, la transcription des gènes *cueO*, codant l'oxydase à multi-cuivre, et *rcnA* codant la pompe d'efflux du nickel sont activées. Les systèmes d'import du fer *FUR* dépendants sont également réprimés en présence des PGRP. Les auteurs suggèrent que les PGRP en déstabilisant le potentiel de membrane, réduisent la production d'ATP et par conséquent la force proton motrice nécessaire à l'efflux des ions  $Zn^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ . Ils montrent également que les stress thiols ou métalliques ne sont pas suffisants pour l'effet bactéricide mais fonctionneraient plutôt de manière synergique. Ces travaux reflètent la proximité entre les différents stress, notamment entre le stress métallique et le stress oxydant.

Nos travaux décrivent un nouveau mécanisme de la toxicité du nickel, présenté schématiquement sur la figure 78. Ces travaux nous ont permis de montrer qu'un excès d'ions  $Ni^{2+}$  perturbe spécifiquement les homéostasies des ions  $Fe^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ . La hausse de ces métaux dans la cellule provoque une production de ROS induisant un stress oxydant. Ce stress oxydant provoque des dégâts sur l'ADN entraînant un relâchement du chromosome. L'expression des gènes étant en partie contrôlée par la topologie de l'ADN, un relâchement du chromosome bactérien induit indirectement par les ions  $Ni^{2+}$  va donc entraîner une reprogrammation génétique massive. Les gènes codant les régulateurs globaux, comme par exemple RpoS, vont être différenciellement exprimés lors d'un stress provoqué par les ions  $Ni^{2+}$ . Les réseaux de régulation sont donc fortement modifiés expliquant ainsi la grande quantité de gènes non spécifiques à la réponse au stress métallique différenciellement exprimés lors d'un excès d'ions  $Ni^{2+}$ . En plus de ces gènes non spécifiques, les gènes spécifiques de réponse au stress vont être différenciellement exprimés. On retrouve par exemple les gènes codant les systèmes de transport du nickel, RcnAB et YddAB, puisque ces systèmes sont primordiaux pour détoxifier la cellule.

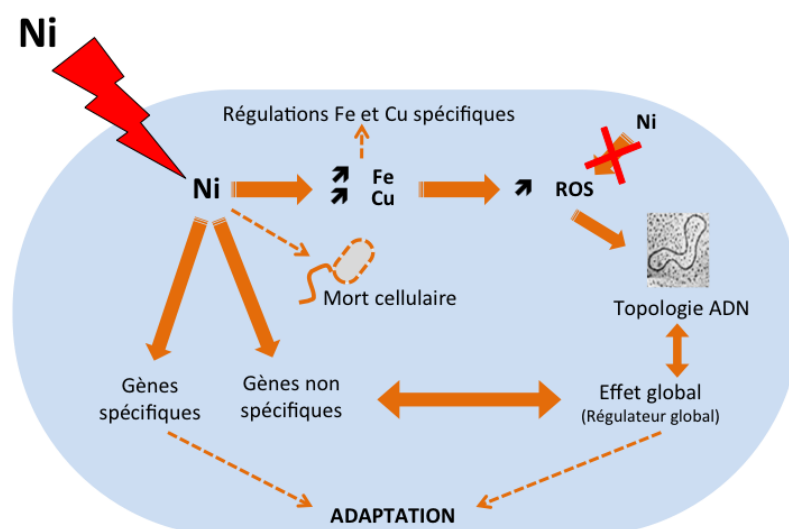


Figure 78 – Le stress Ni impacte l'homéostasie du Fe et du Cu entraînant une reprogrammation génétique massive



Il serait intéressant de reproduire le même type d'étude en réalisant une cinétique afin de mieux comprendre la chronologie des événements adaptatifs, de la même façon que la détermination d'une chronologie a été réalisée chez *H. pylori* en réponse à un excès d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  par l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la réponse à ce stress par qRT-PCR (Muller et al., 2011). Cette réponse dépend du régulateur pléiotropique NikR, qui lors d'un stress provoqué par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  va tout d'abord activer l'expression des gènes codant les uréases et les protéines de stockage des ions  $\text{Ni}^{2+}$ , puis ensuite réprimer l'expression des gènes codant les systèmes d'import des ions  $\text{Ni}^{2+}$  ou des hydrogénases. Dans notre cas, nous pourrions ainsi déterminer s'il existe un phénomène de cascade entre la réponse cellulaire à un stress métallique et la réponse induite par une perturbation massive de l'expression des gènes.

### 10.2.3 Les ions $\text{Ni}^{2+}$ entraînent une acidification du milieu intracellulaire

L'étude de l'homéostasie des métaux, et en particulier du nickel, nous a permis de montrer que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  étaient capables d'induire l'expression des gènes de résistance au pH acide [Tableau 8]. Le nickel, le cuivre et le cobalt provoquent une diminution du pH intracellulaire dans le périplasma ainsi que dans le cytoplasme (cf section 6.1). Nos travaux ont également montré que les mutants pour les gènes de résistance au stress acide n'étaient pas plus sensibles aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  (cf section 6.1.3). Ces gènes, bien que leur expression soit induite par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , ne sont donc pas nécessaires à l'adaptation au stress métallique et ce n'est pas la diminution du pH qui est responsable de la toxicité cellulaire.

Une analyse transcriptomique, réalisée chez *E. coli* K12 cultivée en anaérobiose à différents pH, a montré que le pH acide provoquait une induction de l'expression des gènes codant le système NikABCDE (Hayes et al., 2006). Ces résultats ont été vérifiés et validés au niveau de l'expression du gène *nikA* par fusion transcriptionnelle (résultats inédits, M.A Mandrand-Berthelot). Cette analyse transcriptomique a également montré que l'expression des gènes codant les hydrogénases est aussi activée à pH acide. Ces résultats corroborent une étude antérieure montrant que l'expression de fusions transcriptionnelles des gènes codant les hydrogénases est induite à pH acide (King and Przybyla, 1999). Ces travaux suggèrent que chez *E. coli*, il existe une expression coordonnée à pH acide entre le système de transport spécifique des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et la synthèse des hydrogénases, métalloenzymes à Ni. Durant la fermentation anaérobie résultant une acidification intracellulaire contraint la bactérie à ajuster son métabolisme cellulaire afin d'assimiler les ions  $\text{Ni}^{2+}$  essentiel à l'activité hydrogénase.

## 10.3 Physiologie de l'adaptation à un stress provoqué par les ions $\text{Ni}^{2+}$

### 10.3.1 Un excès d'ions $\text{Ni}^{2+}$ ralentit et arrête de la croissance

Malgré les systèmes que les bactéries possèdent pour contrôler la bonne fixation des métaux au sein des métalloprotéines, un excès de métal dans la cellule entraîne généralement une fixation anarchique de ces métaux sur les protéines, altérant leur fonction. L'impact immédiat de cet effet est la diminution ou l'arrêt de la croissance cellulaire. Les premières études relatant la

toxicité des métaux se sont basées sur cette observation (Babich and Stotsky, 1983). Cet arrêt de croissance a été observé lorsque nous avons réalisé les expériences préliminaires du RNA-Seq [Figure 32]. En effet, la souche d' *E. coli* traitée aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  présentait une forte diminution de la croissance cellulaire. Ces résultats phénotypiques concordent bien avec les résultats génotypiques obtenus par l'analyse du RNA-Seq. La répartition des gènes différentiellement exprimés en fonction de leur rôle biologique indique que les gènes impliqués dans le métabolisme des purines et des pyrimidines, bases azotées composantes de l'ADN, sont réprimés ainsi que les gènes codant les protéines ribosomales [Figure 40]. Cela suggère que les mécanismes de transcription et de traduction sont ralentis voire même stoppés.

### 10.3.2 Les ions $\text{Ni}^{2+}$ provoquent un changement de mode de vie semblable à la phase stationnaire

Les ralentissements des mécanismes de transcription et de traduction sont les premiers facteurs indiquant l'entrée des bactéries en phase stationnaire. Comme expliqué précédemment, les ions  $\text{Ni}^{2+}$  provoquent ce ralentissement de croissance. De plus, nos travaux effectués sur la compréhension de la toxicité des ions  $\text{Ni}^{2+}$  ont montré que ces cations divalents provoquent indirectement un relâchement de l'ADN via la génération d'un stress oxydant ou via la répression du gène codant la protéine Fis. En effet, les travaux de Dorman montrent qu'une faible quantité de protéine Fis provoque un relâchement de l'ADN, limitant la transcription des gènes durant la phase stationnaire de croissance comparée à la phase exponentielle (Dillon and Dorman, 2010). L'ensemble de ces résultats indique que les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , par différents mécanismes plus ou moins liés, provoquent un changement de mode vie semblable à une phase stationnaire de croissance.

### 10.3.3 Un excès d'ions $\text{Ni}^{2+}$ provoque le passage d'une mode de vie de type planctonique à un mode de vie de type biofilm

Précédemment au laboratoire, il avait été montré que la présence de concentrations subinhibitrices de nickel induisait une augmentation de la production de curli, éléments essentiels à la cohésion d'un biofilm chez *E. coli* (Perrin et al., 2009).

Le mode de vie biofilm est opposé au mode de vie planctonique où les cellules synthétisent pour se mouvoir des flagelles leur permettant ainsi d'accroître leur niche écologique. L'une des premières études sur la relation entre les métaux et la motilité cellulaire remonte aux années 1960, où Weinberg et Brooks ont observé que des concentrations subinhibitrices de fer, d'aluminium et de manganèse entraînaient une diminution du nombre de flagelles (Weinberg and Brooks, 1963). Une analyse transcriptomique chez *Bacillus cereus*, bactérie à Gram positif, traitée aux ions  $\text{Ag}^{2+}$ , indique qu'une surreprésentation de gènes impliqués dans la traduction et la motilité est réprimée (Babu et al., 2011).

Ici, l'analyse RNA-Seq réalisée révèle qu'un excès de nickel induit une répression des gènes de la synthèse des flagelles [Tableau 11]. L'analyse génotypique ne suffisant pas à prouver l'hypothèse selon laquelle le nickel induit un arrêt de la motilité, nous avons étudié la nage cellulaire sur boîtes de gélose molle en présence de nickel [Figure 52]. Cette technique s'est

avérée mal adaptée pour visualiser l'impact du nickel sur la motilité cellulaire car le phénotype observé résulte à la fois de la capacité des bactéries à se mouvoir et à se diviser. C'est pourquoi des observations microscopiques des flagelles chez *E. coli* traitée aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  ont été entreprises [Figure 53]. Les analyses de microscopie sont en cours de réalisation et seront importantes pour montrer l'effet des ions  $\text{Ni}^{2+}$  sur le nombre ou la taille des flagelles par une observation directe. En effet, quelques études existent sur les systèmes régulant la synthèse des flagelles mais aucune sur la biosynthèse de ces appareils locomoteurs.

Une hausse globale de la transcription des structures d'adhésion et une répression des systèmes de motilité ont été montrées, conduisant à une réponse rapide de la bactérie *E. coli* suite à un stress provoqué par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Cette réponse peut être généralisée pour les autres métaux. En effet, chez le mutant de l'oxydase à multi-cuivre  $\Delta\text{cueO}$ , une expression accrue des gènes codant les systèmes d'adhérence à la surface cellulaire Ag43 et de curli est mesurée et une augmentation de l'agrégation cellulaire est observée ainsi qu'une réduction de 40% de la motilité cellulaire (Tree et al., 2007).

Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  induisent très certainement l'arrêt de la synthèse des flagelles ainsi qu'une induction des curli pour la formation de biofilm. Ce passage de la motilité à la formation d'un biofilm est médié par le régulateur central RpoS dont l'expression du gène est activé par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  [Figure 79].

Il serait intéressant de poursuivre ces travaux en essayant de comprendre si le passage de la vie planctonique au mode de vie de type biofilm induit par les métaux est réellement dépendant ou non du régulateur RpoS ou si d'autres facteurs ou mécanismes sont impliqués. Ces travaux devront prendre en compte les différents mécanismes régissant la régulation de ce régulateur global, avec entre autres la protéine associée au nucléoïde, Hfq, ou encore le système de dégradation des protéines avec la protéase ATP dépendante, ClpXP (Battesti et al., 2011).

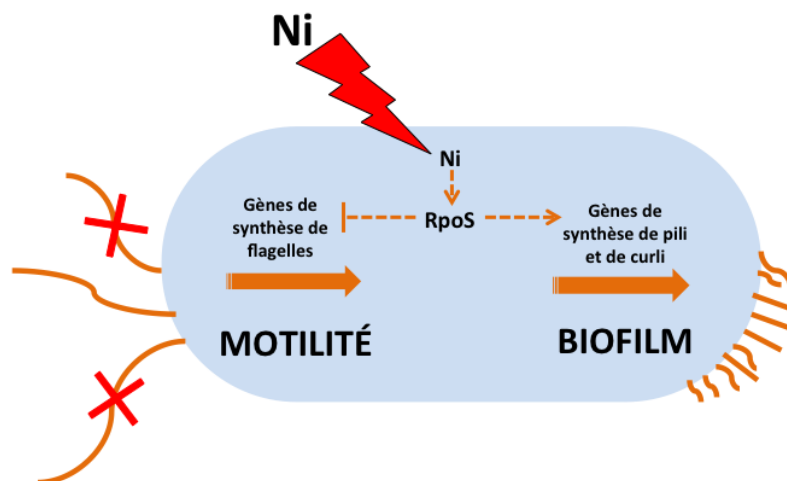


Figure 79 – Le stress Ni favorise la vie en mode biofilm au détriment d'un mode de vie planctonique

Les bactéries, pour mieux s'adapter à un stress provoqué par les ions  $\text{Ni}^{2+}$ , sont capables de ralentir leur croissance. Ce ralentissement de croissance peut être assimilé à un mode de vie en phase stationnaire. En effet, la présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  entraîne indirectement le relâchement de

l'ADN. Les bactéries vont également être capables de changer de mode de vie en formant un biofilm, véritable système de protection contre les ions métalliques et les biocides en général. Cette adaptation confère également aux bactéries la possibilité d'attendre que les conditions extérieures soient meilleures pour se disséminer.

## Conclusion

Une vision réductrice voudrait que chaque "pool" de métal soit indépendant *in vivo* mais la réalité biologique est visiblement plus complexe. En effet, nous venons de montrer que des variations dans la teneur en nickel perturbe les teneurs en ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ . Cela suggère donc que les "pools" des différents métaux sont interconnectés et s'influencent mutuellement.

Pour le cas du nickel, la conséquence directe de ces perturbations des homéostasies, est la production d'un stress oxydant générant des dégâts importants allant jusqu'à la mort cellulaire. Cet exemple d'analyse d'homéostasie croisée confirme l'importance d'étudier plusieurs homéostasies métalliques pour comprendre l'homéostasie d'un métal. L'homéostasie croisée peut aussi être abordée d'une autre manière, en réalisant des doubles stress métalliques. L'exemple présenté en introduction (cf section 2.5.2.3) montre l'effet synergique des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et des ions  $\text{Cu}^{2+}$  chez *Rhodopseudomonas palustris* sur la toxicité cellulaire (Bird et al., 2013). De plus, nos travaux ont également montré que la présence de cuivre et de nickel avait également un effet synergique sur les teneurs en ions  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ . A l'heure actuelle, l'effet d'une molécule isolée est déjà difficile à cerner, et l'effet d'un mélange de molécules toxiques reste encore très compliqué à expliquer. C'est pourquoi l'étude des effets synergiques de substrats nocifs reflétant les véritables sources de toxicité dans l'environnement sont un enjeu majeur de la toxicologie de demain.



# Cinquième partie

## Bibliographie



# Bibliographie

- Alagna, L., Hasnain, S., Piggott, B. and Williams, D. (1984). The nickel ion environment in jack bean urease. *Biochem J.* *220*, 591–595.
- Almiron, M., Link, A., Furlong, D. and Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *6*, 2646–2654.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. and Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* *27*, 215–237.
- Armstrong, J., Adler, J. and Dahl, M. (1967). Nonchemotactic mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* *93*, 390–398.
- Atanassova, A. and Zamble, D. B. (2005). *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *J Bacteriol* *187*, 4689–4697.
- Azam, T. and Ishihama, A. (1999). Twelve species of the nucleoid-associated protein from (?). Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* *274*, 33105–33013.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K., Tomita, M., Wanner, B. and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants : the Keio collection. *Mol Syst Biol.* *2*, 2006–0008.
- Babich, H. and Stotsky, G. (1983). Toxicity of nickel to microbes : environmental aspect. *Adv Appl Microbiol.* *29*, 195–265.
- Babu, M., Sridhar, J. and Gunasekaran, P. (2011). Global transcriptome analysis of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in response to silver nitrate stress. *J Nanobiotechnology.* *9*, doi : 10.1186/1477–3155.
- Bachmann, B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol Rev* *36*, 525–557.
- Bagg, A. and Neilands, J. (1987). Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev.* *51*, 509–518.
- Bardonnet, N. and Blanco, C. (1992). *uidA* antibiotic resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol Lett* *72*, 243–247.
- Battesti, A., Majdalani, N. and Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* *65*, 189–213.
- Benoit, S., Miller, E. and Maier, R. (2013). *Helicobacter pylori* stores nickel to aid its host colonization. *Infect Immun.* *81*, 580–584.
- Berteau, O., Guillot, A. A., Benjdia, A. and Rabot, S. (2006). A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *J Biol Chem* *281*, 22464–22470.
- Bird, L., Coleman, M. and Newman, D. (2013). Iron and copper act synergistically to delay anaerobic growth of bacteria. *Appl Environ Microbiol.* *79*, 3619–3627.
- Blaha, D., Arous, S., Bleriot, C., Dorel, C., Mandrand-Berthelot, M.-A. and Rodrigue, A. (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.
- Blériot, C., Effantin, G., Lagarde, F., Mandrand-Berthelot, M. and Rodrigue, A. (2011). RcnB is a periplasmic protein essential for maintaining intracellular Ni and Co concentrations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* *193*, 3785–3793.
- Blériot, C., Gault, M., Gueguen, E., Arnoux, P., Pignol, D., Mandrand-Berthelot, M. and Rodrigue, A. (2014). Cu binding by the *Escherichia coli* metal-efflux accessory protein RcnB. *Metallomics.* *6*, 1400–1409.



- Braun, V. (1995). Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev.* *16*, 295–307.
- Braun, V., Hantke, K. and Koster, W. (1998). Bacterial iron transport : mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst.* *35*, 67–145.
- Breton, J., Massart, S., Vandamme, P., Brandt, E. D., Pot, B. and Foligne, B. (2013). Eco-toxicology inside the gut : impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacol Toxicol.* *11*, 1–11.
- Brodsky, L., Peng, W., Kuo, M., Salnikow, K., Zoroddu, M. and Costa, M. (2000). Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation. *Cancer Res.* *60*, 238–241.
- Bruins, M. R., Kapil, S. and Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* *45*, 198–207.
- Burd, G., DG, D. D. and Glick, B. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol.* *46*, 237–245.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* *3*, 3–8.
- Cao, J., Woodhall, M. R., Alvarez, J., Cartron, M. L. and Andrews, S. C. (2007). EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe<sup>2+</sup> transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K12 but functional in *E. coli* O157 :H7. *Mol Microbiol* *65*, 857–875.
- Cases, I. and de Lorenzo, V. (2005). Promoters in the environment : transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol.* *3*, 105–118.
- Castanie-Cornet, M., Penfound, T., Smith, D., Elliott, J. and Foster, J. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* *181*, 3525–3535.
- Cha, J., Lee, J., Oh, J., Choi, J. and Baik, H. (2008). Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas. syringae* pv. *tabaci* 11528 : Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing. *Biochem Biophys Res Commun* *366*, 281–287.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V. and Mondragon, A. (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* *301*, 1383–1387.
- Chapman, M., Robinson, L., Pinkner, J., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S. and SJHultgren (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* *295*, 851–855.
- Cherrier, M. V., Cavazza, C., Bochot, C., Lemaire, D. and Fontecilla-Camps, J. C. (2008). Structural characterization of a putative endogenous metal chelator in the periplasmic nickel transporter NikA. *Biochemistry* *47*, 9937–9943.
- Chevance, F. and Hughes, K. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol.* *6*, 455–465.
- Chivers, P., Benanti, E., Heil-Chapdelaine, V., Iwig, J. and Rowe, J. (2012). Identification of Ni-(L-His)<sub>2</sub> as a substrate for NikABCDE-dependent nickel uptake in *Escherichia coli*. *Metal-lomics.* *4*, 1043–1050.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H. (1989). 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.
- Compan, I. and Touati, D. (1993). Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* *175*, 1687–1696.
- Cornelissen, C. and Sparling, P. (1994). Identification of receptor-mediated transferrin-iron uptake mechanism in *Neisseria gonorrhoeae*. *Methods Enzymol.* *235*, 356–363.
- Crichton, R. R. and Pierre, J. L. (2001). Old iron, young copper : from Mars to Venus. *Biometals* *14*, 99–112.
- Crosa, J. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev.* *53*, 517–530.

- D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. and Michaud-Soret, I. (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *99*, 16619–16624.
- de Pina, K., Desjardin, V., Mandrand-Berthelot, M. A., Giordano, G. and Wu, L. F. (1999). Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *181*, 670–674.
- de Reuse, H., Vinella, D. and Cavazza, C. (2013). Common themes and unique proteins for the uptake and trafficking of nickel, a metal essential for the virulence of *Helicobacter pylori*. *Front Cell Infect Microbiol.* *3*.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J., Gaymard, F. and Expert, D. (2005). Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.* *43*, 262–272.
- Dillemann, G. (1969). La pharmacopée au Moyen-Age. *Revue d'histoire de la pharmacie* *57*, 235–244.
- Dillon, S. and Dorman, C. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol.* *8*, 185–195.
- Donohoe, D., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T., Bunger, M. and Bultman, S. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* *13*, 517–526.
- Dorman, C. (2008). Regulation of Transcription in Bacteria by DNA Supercoiling. In *Bacterial Physiology*, W. El-Sharoud.
- Dostal, A., Lacroix, C., Pham, V., Zimmermann, M., Del'homme, C., Bernalier-Donadille, A. and Chassard, C. (2014). Iron supplementation promotes gut microbiota metabolic activity but not colitis markers in human gut microbiota-associated rats. *Br J Nutr.* *111*, 2135–2145.
- Eitinger, T., Rodionov, D., Grote, M. and Schneider, E. (2011). Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes : diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev.* *35*, 3–67.
- Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L. and Smith, J. A. C. (2005). Secondary transporters for nickel and cobalt ions : theme and variations. *Biometals* *18*, 399–405.
- Ferguson, A., Chakraborty, R., Smith, B., Esser, L., van der Helm, D. and Deisenhofer, J. (2002). Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* *295*, 1715–1719.
- Ferguson, A. D. and Deisenhofer, J. (2002). TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* *1565*, 318–332.
- Ferhat, M., Atlan, D., Vianney, A., Lazzaroni, J. C., Doublet, P. and Gilbert, C. (2009). 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.
- Ferreira, K., Iverson, T., Maghlaoui, K., Barber, J. and Iwata, S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science.* *303*, 1831–1838.
- Fones, H. and Preston, G. (2013). The impact of transition metals on bacterial plant disease. *FEMS Microbiol Rev.* *37*, 495–519.
- Forzi, L. and Sawers, R. G. (2007). Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals* *20*, 565–578.
- Foster, J. (2004). *Escherichia coli* acid resistance : tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol.* *2*, 898–907.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C. and Nies, D. H. (2003). Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *185*, 3804–3812.
- Frawley, E., Crouch, M., Bingham-Ramos, L., Robbins, H., Wang, W., Wright, G. and Fang, F. (2013). Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella Typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *110*, 12054–12059.
- Gasper, R., Scrima, A. and Wittinghofer, A. (2006). Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *J Biol Chem* *281*, 27492–27502.

- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. and Nash., H. (1976). DNA gyrase : an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *73*, 3872–3876.
- Gold, B., Deng, H., Bryk, R., Vargas, D., Eliezer, D., Roberts, J., Jiang, X. and Nathan, C. (2008). Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nat Chem Biol* *4*, 609–616.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H. and Rensing, C. (2001). ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *183*, 4664–4667.
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H. and Munkelt, D. (2005). FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* *183*, 9–18.
- Grass, G. and Rensing, C. (2001a). Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *183*, 2145–2147.
- Grass, G. and Rensing, C. (2001b). CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* *286*, 902–908.
- Ha, N., Oh, S., Sung, J., Cha, K., Lee, M. and Oh, B. (2001). Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol.* *8*, 505–509.
- Hänsch, R. and Mendel, R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol.* *12*, 259–266.
- Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* *4*, 172–177.
- Hayes, E., Wilks, J., Sanfilippo, P., Yohannes, E., Tate, D., Jones, B., Radmacher, M., BonDurant, S. and Slonczewski, J. (2006). Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol.* *6*.
- Hebbeln, P. and Eitinger, T. (2004). Heterologous production and characterization of bacterial nickel/cobalt permeases. *FEMS Microbiol Lett.* *230*, 129–135.
- Heller, K., Kadner, R. and Gunther, K. (1988). Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* *64*, 147–153.
- Higgins, C., Dorman, C., Stirling, D., Waddell, L., Booth, I., May, G. and Bremer, E. (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell.* *52*, 569–584.
- Higgs, P., Myers, P. and Postle, K. (1998). Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex : ExbB and ExbD form homomultimers. *J Bacteriol.* *180*, 6031–6038.
- Hobman, J. L., Yamamoto, K. and Oshima, T. (2007). Transcriptomic responses of bacterial cells to sublethal metal ion stress. *Microbiol Monogr* *6*, 74–115.
- Hodgkinson, V. and Petris, M. (2012). Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem.* *287*, 13549–13555.
- Hube, M., Blokesch, M. and Bock, A. (2002). Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli* : role of accessory proteins HypA and HybF. *J Bacteriol* *184*, 3879–3885.
- Huffman, D. L., Huyett, J., Outten, F. W., Doan, P. E., Finney, L. A., Hoffman, B. M. and O'Halloran, T. V. (2002). 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.
- Hung, L., Wang, I., Nikaido, K., Liu, P., Ames, G. and SH., S. K. (1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature.* *386*, 703–707.
- Huo, Y., Rosenthal, A. and Gralla, J. (2008). General stress response signalling : unwrapping transcription complexes by DNA relaxation via the sigma38 C-terminal domain. *Mol Microbiol.* *70*, 369–378.
- Irving, H. and Williams, R. (1948). Order of stability of metal complexes. *Nature* *162*, 746–747.
- Itou, J., Eguchi, Y. and Utsumi, R. (2009). Molecular mechanism of transcriptional cascade initiated by the EvgS/EvgA system in *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem.* *73*, 870–878.

- Iwig, J. S., Rowe, J. L. and Chivers, P. T. (2006). Nickel homeostasis in *Escherichia coli* - the *rcnR-rcnA* efflux pathway and its linkage to NikR function. *Mol Microbiol* 62, 252–262.
- Kansau, I., Guillain, F., Thiberge, J. and Labigne, A. (1996). Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA). *Mol Microbiol*. 22, 1013–1023.
- Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Suzuki, F., Kobayashi, H. and Igarashi, K. (1992). Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 4529–4533.
- Kashyap, D., Rompca, A., Gaballa, A., Helmann, J., Chan, J., Chang, C., Hozo, I., Gupta, D. and Dziarski, R. (2014). Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by inducing oxidative, thiol, and metal stress. *PLoS Pathog*. 10, e1004280. doi : 10.1371/journal.ppat.1004280.
- Kasprzak, K. S., Sunderman, F. W. and Salnikow, K. (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutat Res* 533, 67–97.
- Kasting, J. F. and Siefert, J. L. (2002). Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296, 1066–1068.
- Kearns, D. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*. 8, 634–644.
- Keyhani, E., Abdi-Oskouei, F., Attar, F. and Keyhani, J. (2006). DNA strand breaks by metal-induced oxygen radicals in purified *Salmonella typhimurium* DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 1091, 52–64.
- King, P. W. and Przybyla, A. E. (1999). Response of *hya* expression to external pH in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 5250–5256.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y. and Verkman, A. (1998). Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J*. 74, 1591–1599.
- Kobayashi, N., Nishino, K. and Yamaguchi, A. (2001). Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 5639–5644.
- Konhauser, K. O., Pecoits, E., Lalonde, S. V., Papineau, D., Nisbet, E. G., Barley, M. E., Arndt, N. T., Zahnle, K. and Kamber, B. S. (2009). Oceanic nickel depletion and a methanogen famine before the Great Oxidation Event. *Nature* 458, 750–753.
- Koster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol*. 152, 291–301.
- Krulwich, T., Sachs, G. and Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 9, 330–343.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lau, C., Ishida, H., Liu, Z. and Vogel, H. (2013). Solution structure of *Escherichia coli* FeoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. *J Bacteriol*. 195, 46–45.
- Leach, M. R., Sandal, S., Sun, H. and Zamble, D. B. (2005). Metal binding activity of the *Escherichia coli* hydrogenase maturation factor HypB. *Biochemistry* 44, 12229–12238.
- Leach, M. R., Zhang, J. W. and Zamble, D. B. (2007). The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD. *J Biol Chem* 282, 16177–16186.
- Lebrette, H., Iannello, M., Fontecilla-Camps, J. and Cavazza, C. (2013). The binding mode of Ni-(L-His)<sub>2</sub> in NikA revealed by X-ray crystallography. *J Inorg Biochem* 121, 16–18.
- Lee, P. and Grossman, A. (2006). The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 60, 853–869.
- Lee, S. M., Grass, G., Rensing, C., Barrett, S. R., Yates, C. J. D., Stoyanov, J. V. and Brown, N. L. (2002). The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 616–620.
- Letoffe, S., Ghigo, J. and Wandersman, C. (1994). Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter. *J Bacteriol*. 176, 5372–5377.

- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S. and Huang, C. (1997). Deletions of the *Aequora Victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J Biol Chem.* *272*, 28545–28549.
- Li, Y. and Zamble, D. B. (2009). Nickel homeostasis and nickel regulation : an overview. *Chem Rev* *109*, 4617–4643.
- Lippard, S. and Berg, J. (1994). Principe de biochimie mineral.
- Lu, M., Chai, J. and Fu, D. (2009). Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 1063–1067.
- Lundrigan, M. and Kadner, R. (1986). Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *J Biol Chem.* *261*, 10797–10801.
- Ma, Z., Jacobsen, F. E. and Giedroc, D. P. (2009). Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem Rev* *109*, 4644–4681.
- Ma, Z., Masuda, N. and Foster, J. (2004). Characterization of EvgAS-YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* *186*, 7378–7389.
- Macomber, L., Elsey, S. and Hausinger, R. (2011). Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (class II) is the primary site of nickel toxicity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* *82*, 1291–1300.
- Mahe, B., Masclaux, C., Rauscher, L., Enard, C. and Expert, D. (1995). Differential expression of two siderophore-dependent iron-acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937 : characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family. *Mol Microbiol.* *18*, 33–43.
- Masse, E. and Gottesman, S. (2002). 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.
- McAnaney, T., Park, E., Hanson, G., Remington, S. and Boxer, S. (2002). Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 2. Excited-state dynamics. *Biochemistry.* *41*, 15489–15494.
- McBride, T., Preston, B. and Loeb, L. (1991). Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry.* *30*, 207–213.
- Mika, F. and Hengge, R. (2013). Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Mol Sci* *14*, 4560–4579.
- Mitra, R. S. and Bernstein, I. A. (1978). Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd<sup>2+</sup>. *J Bacteriol* *133*, 75–80.
- Mobley, H. L., Garner, R. M. and Bauerfeind, P. (1995). *Helicobacter pylori* nickel-transport gene *nixA* : synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol Microbiol* *16*, 97–109.
- Mojica, F., Charbonnier, F., Juez, G., Rodriguez-Valera, F. and Forterre, P. (1994). Effects of salt and temperature on plasmid topology in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol.* *176*, 4966–4973.
- Montag, J., L, L. S. and Schönherr, J. (2006). An *in vitro* study on the postinfection activities of copper hydroxide and copper sulfate against Conidia of *Venturia inaequalis*. *J Agric Food Chem.* *54*, 893–899.
- Muller, C., Bahlawane, C., Aubert, S., Delay, C., Schauer, K., Michaud-Soret, I. and Reuse, H. D. (2011). Hierarchical regulation of the NikR-mediated nickel response in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7564–7575.
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W. and O'Halloran, T. V. (2000). Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* *182*, 5864–5871.
- Nakano, M., Iida, T., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Takahashi, A., Tsukamoto, T., Yasunaga, T., Hayashi, T. and Honda, T. (2001). Association of the urease gene with enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains irrespective of their serogroups. *J Clin Microbiol* *39*, 4541–4543.

- Navarro, C., Wu, L. F. and Mandrand-Berthelot, M. A. (1993). The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol Microbiol* *9*, 1181–1191.
- Nies, D. and Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol.* *14*, 186–199.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* *27*, 313–339.
- Nies, D. H. (2007). Bacterial transition metal homeostasis. *Microbiol Monogr* *6*, 117–142.
- Nishino, K. and Yamaguchi, A. (2002). EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the yhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* *184*, 2319–2323.
- Olson, J. and Maier, R. (2002). Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science.* *298*, 1788–1790.
- Oskarsson, A. and Tjalve, H. (1979). Binding of  $^{63}\text{Ni}$  by cellular constituents in some tissues of mice after the administration of  $^{63}\text{NiCl}_2$  and  $^{63}\text{Ni}(\text{CO})_4$ . *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* *45*, 306–314.
- Outten, C. E. and O'Halloran, T. V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* *292*, 2488–2492.
- Outten, F., Huffman, D., Hale, J. and O'Halloran, T. (2001a). The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* *276*, 30670–30677.
- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A. and O'Halloran, T. V. (2001b). The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* *276*, 30670–30677.
- Palmer, R. and Piper, T. (1966). 2,2'-Bipyridine Complexes. I. Polarized Crystal Spectra of Tris (2,2'-bipyridine)copper(II), -nickel(II), -cobalt(II), -iron(II), and -ruthenium(II). *Inorg. Chem.*, *5*, 864–878.
- Patzer, S. and Hantke, K. (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* *28*, 1199–1210.
- Perrin, C., Briandet, R., Jubelin, G., Lejeune, P., Mandrand-Berthelot, M. A., Rodrigue, A. and Dorel, C. (2009). Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K12 strains that produce curli. *Appl Environ Microbiol* *75*, 1723–1733.
- Persmark, M., Expert, D. and Neilands, J. (1989). Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *J Biol Chem.* *264*, 3187–3193.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A. and Hengge, R. (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *22*, 2434–2446.
- Pesavento, C. and Hengge, R. (2012). The global repressor FliZ antagonizes gene expression by  $\sigma^{\text{SS}}$ -containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4783–4793.
- Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* *10*, 12–26.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., TT, T. L. T., Vidal, O., Lejeune, P. and Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains : role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol.* *2*, 450–464.
- Ragsdale, S. (2009). Nickel-based Enzyme Systems. *J Biol Chem.* *284*, 18571–18575.
- Rajkumar, M., Sandhya, S. and Freitas, M. P. H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol Adv.* *30*, 1562–1574.
- Ranquet, C., de Choudens, S. O., Loiseau, L., Barras, F. and Fontecave, M. (2007). Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins. *J Biol Chem* *282*, 30442–30451.

- Rensing, C. and Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27, 197–213.
- Ridge, P. G., Zhang, Y. and Gladyshev, V. N. (2008). Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS One* 3, e1378.
- Rodrigue, A., Effantin, G. and Mandrand-Berthelot, M. A. (2005). Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 2912–2916.
- Rouch, D. A., Lee, B. T. and Morby, A. P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents : a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J Ind Microbiol* 14, 132–141.
- Russell, P. (2005). A century of fungicide evolution. *JAS* 143, 11–25.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. and Bestervelt, L. (2013). Microbial siderophores : a mini review. *J Basic Microbiol.* 53, 303–317.
- Sanders, L., Andermann, T. and Ottemann, K. (2013). A supplemented soft agar chemotaxis assay demonstrates the *Helicobacter pylori* chemotactic response to zinc and nickel. *Microbiology.* 159, 46–57.
- Santini, C., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C. and Wu, L. (2001). Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of<sup>6</sup> and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J Biol Chem.* 276, 8159–8164.
- Schagger, H. and Jagow, G. V. (1987). 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.
- Schauer, K., Gouget, B., Carriere, M., Labigne, A. and de Reuse, H. (2007). Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol Microbiol* 63, 1054–1068.
- Schauer, K., Muller, C., Carriere, Labigne, A., Cavazza, C. and Reuse, H. D. (2010). The *Helicobacter pylori* GroES cochaperonin HspA functions as a specialized nickel chaperone and sequestration protein through its unique C-terminal extension. *J Bacteriol.* 192, 1231–1237.
- Schauer, K., Rodionov, D. and de Reuse., H. (2008). New substrates for TonB-dependent transport : do we only see the ”tip of the iceberg” ? *Trends Biochem Sci.* 33, 330–338.
- Scott, J. A. and Palmer, S. J. (1988). Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.* 10, 21–24.
- Sekirov, I., Russell, S., Antunes, L. and Finlay, B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 90, 859–904.
- Sendra, V., Gambarelli, S., Bersch, B. and Coves, J. (2009). Site-directed mutagenesis reveals a conservation of the copper-binding site and the crucial role of His24 in CopH from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *J Inorg Biochem.* 103, 1721–1728.
- Shure, M., Pulleyblank, D. and Vinograd, J. (1977). The problems of eukaryotic and prokaryotic DNA packaging and *in vivo* conformation posed by superhelix density heterogeneity. *Nucleic Acids Res* 4, 1183–1205.
- Singh, A., Panting, R., Varma, A., Saijo, T., Waldron, K., Jong, A., Ngamskulrungrroj, P., Chang, Y., Rutherford, J. and Kwon-Chung, K. (2013). Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *MBio.* 4.
- Skandamis, P., Stopforth, J., Ashton, L., Geornaras, I., Kendall, P. and Sofos, J. (2009). *Escherichia coli* O157 :H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. *Food Microbiol.* 26, 112–119.
- Slonczewski, J., Macnab, R., Alger, J. and Castle, A. (1982). Effects of pH and repellent tactic stimuli on protein methylation levels in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 152, 384–399.
- Soestbergen, M. V. and Sunderman, F. (1972). 63 Ni complexes in rabbit serum and urine after injection of 63 NiCl 2 . *Clin Chem.* 18, 1478–1484.

- Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 62, 797–821.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. and te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 5187–5192.
- Stewart, P. and Franklin, M. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 6, 199–210.
- Stoyanov, J. V. and Brown, N. L. (2003). The *Escherichia coli* copper-responsive *copA* promoter is activated by gold. *J Biol Chem* 278, 1407–1410.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. and Brown, N. L. (2001). CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* 39, 502–511.
- Struyve, M., Moons, M. and Tommassen, J. (1991). Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol*. 218, 141–148.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113–130.
- Summers, A. (2009). Damage control : regulating defenses against toxic metals and metalloids. *Curr Opin Microbiol*. 12, 138–144.
- Sunderman, F. (1993). Biological monitoring of nickel in humans. *Scand J Work Environ Health*. 19, 34–38.
- Sundin, G., Jones, A. and Fulbright, D. (1989). Copper resistance in *P. syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer *in vitro* and *in planta* with a plasmid. *Phytopathology* 79, 861–865.
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 373, 1–6.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L. and Despied, S. (1995). Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in  $\Delta fur$  mutants of *Escherichia coli* : protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol*. 177, 2305–2314.
- Travers, A. and Muskhelishvili, R. S. R. G. (2001). DNA supercoiling and transcription in *Escherichia coli* : The FIS connection. *Biochimie*. 83, 213–217.
- Tree, J., Kidd, S., Jennings, M. and McEwan, A. (2005). Copper sensitivity of *cueO* mutants of *Escherichia coli* K-12 and the biochemical suppression of this phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 1205–1210.
- Tree, J. J., Ulett, G. C., Hobman, J. L., Constantinidou, C., Brown, N. L., Kershaw, C., Schembri, M. A., Jennings, M. P. and McEwan, A. G. (2007). The multicopper oxidase (CueO) and cell aggregation in *Escherichia coli*. *Environ Microbiol* 9, 2110–2116.
- Turlin, E., Gasser, F. and Biville, F. (1996). Sequence and functional analysis of an *Escherichia coli* DNA fragment able to complement *pqqE* and *pqqF* mutants from *Methylobacterium organophilum*. *Biochimie* 78, 823–831.
- Turner, L., Ryu, W. and Berg, H. (2000). Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J Bacteriol*. 182, 2793–2801.
- Valko, M., Morris, H. and Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 12, 1161–1208.
- Voet, D. and Voet, J. (1998). *Biochimie*. DeBoeck.
- Waldron, K. J. and Robinson, N. J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* 7, 25–35.
- Walker, J., Saraste, M., Runswick, M. and Gay, N. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP -requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945–951.
- Wang, J. (1971). Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol*. 55, 523–533.
- Weast, R. C. (1984). *CRC handbook of chemistry and physics*, 64th edn. CRC, Boca Raton, Florida.



- Weinberg, E. and Brooks, J. (1963). Trace metal control of bacterial flagellation. *Nature* 17, 717–718.
- Wilks, J. and Slonczewski, J. (2007). pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* : rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J Bacteriol.* 189, 5601–5607.
- Wilson, D., Erecinska, M. and Dutton, P. (1974). Thermodynamic relationships in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 3, 203–230.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.* 322, 681–692.
- Wu, L. F. and Mandrand-Berthelot, M. A. (1986). Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie* 68, 167–179.
- Wu, L. F., Navarro, C., de Pina, K., Quenard, M. and Mandrand, M. A. (1994). 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.
- Wu, L. F., Navarro, C. and Mandrand-Berthelot, M. A. (1991). The *hydC* region contains a multi-cistronic operon *nik* involved in nickel transport in *Escherichia coli*. *Gene* 107, 37–42.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.
- Yuan, J. and Berg, H. (2008). Resurrection of the flagellar rotary motor near zero load. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1182–1185.
- Zamponi, G., Bourinet, E. and Snutch, T. (1996). Nickel block of a family of neuronal calcium channels : subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J Membr Biol.* 151, 77–90.
- Zhang, J. W., Butland, G., Greenblatt, J. F., Emili, A. and Zamble, D. B. (2005). A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 280, 4360–4366.
- Zhao, B. and Houry, W. (2010). Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria : an aptitude for survival. *Biochem Cell Biol.* 88, 301–314.
- Zilberstein, D., Agmon, V., Schuldiner, S. and Padan, E. (1984). *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential, and cell growth. *J Bacteriol.* 158, 246–252.

# Sixième partie

## Annexes



# Annexes

## Résultats RNA-Seq

Table 1 :Differentially expressed genes identified in *E. coli* W3110 that were specifically up-regulated by Ni treatment

Table 2 : Differentially expressed genes identified in *E. coli* W3110 that were specifically down-regulated by Ni treatment

Table 3 : Oligonucléotides utilisés dans ces travaux

## Publications

Cu binding by the *Escherichia coli* metal-efflux accessory protein RcnB

Article paru dans la revue *Metallomics* **6**, p 1400-1409 (2014).

## Posters

Strains engineering for the detection of Ni and Co in liquid environmental samples

Poster présenté lors du congrès : 5<sup>th</sup> International IMBG Meeting à Autrans (France) du 17 au 21 septembre 2012

Control of intracellular metal concentration by a periplasmic protein

Poster présenté lors du congrès FEMS à Leipzig (Allemagne) du 21 au 25 juillet 2013

Metal homeostasis : General analysis of stress by a transcriptomic approach

Poster présenté lors du congrès : EMBO Conference "Microbiology after the genomics revolution : Genomes 2014" à l'Institut Pasteur de Paris (France) du 24 au 27 juin 2014



**Table 1:** Differentially expressed genes identified in *E.coli* W3110 that were specifically up-regulated by Ni treatment

Accession number	Gene	FC	Protein	Functional classification
NCBI_gi:1800007	<i>aroF</i>	203,86	3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, tyrosine-repressible	amino acid metabolism
NCBI_gi:85674334	<i>aroP</i>	6,61	aromatic amino acid transporter	amino acid metabolism
NCBI_gi:85675102	<i>astA</i>	6,75	arginine succinyltransferase	amino acid metabolism
NCBI_gi:85675101	<i>astD</i>	5,17	succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase	amino acid metabolism
NCBI_gi:85675412	<i>eutP</i>	4,75	Ethanolamine utilization protein EutP	amine acid metabolism
NCBI_gi:1651365	<i>glnH</i>	4,87	glutamine transporter subunit	amino acid metabolism
NCBI_gi:85676223	<i>metR</i>	5,86	DNA-binding transcriptional activator, homocysteine-binding	amino acid metabolism
NCBI_gi:1742051	<i>trpC</i>	4,89	indole-3-glycerolphosphate	amino acid metabolism
NCBI_gi:1742056	<i>trpD</i>	6,19	glutamine amidotransferase	amino acid metabolism
NCBI_gi:85675476	<i>tyrA</i>	155,14	bifunctional chorismate mutase T/prephenate dehydrogenase	amino acid metabolism
NCBI_gi:4062209	<i>ybdK</i>	6,53	gamma-glutamyl:cysteine ligase	amino acid metabolism
NCBI_gi:1651623	<i>narI</i>	4,50	nitrate reductase 1, gamma (cytochrome b(NR)) subunit	anaerobic metabolism
NCBI_gi:85676987	<i>nrdD</i>	8,94	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	anaerobic metabolism
NCBI_gi:1736559	<i>araF</i>	7,72	L-arabinose transporter subunit	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:1651328	<i>cydB</i>	4,60	cytochrome d terminal oxidase, subunit II	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85675623	<i>fucU</i>	5,76	L-fucose mutarotase	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85675787	<i>glcD</i>	13,58	glycolate oxidase subunit, FAD-linked	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85675786	<i>glcE</i>	5,44	glycolate oxidase FAD binding subunit	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:1805589	<i>glgS</i>	8,44	predicted glycogen synthesis protein	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85677042	<i>sgcE</i>	5,42	predicted epimerase	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85676525	<i>treF</i>	7,23	cytoplasmic trehalase	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85676377	<i>uhpT</i>	8,25	hexose phosphate transporter	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85676783	<i>xylE</i>	10,69	D-xylose transporter	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85675168	<i>yedP</i>	5,28	Putative mannosyl-3-phosphoglycerate phosphatase	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85674490	<i>mhpB</i>	8,97	2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase	carbon utilization
NCBI_gi:85674491	<i>mhpC</i>	6,44	2-hydroxy-6-ketono-2,4-dienedioic acid hydrolase	carbon utilization
NCBI_gi:85674492	<i>mhpD</i>	5,29	2-keto-4-pentenoate hydratase	carbon utilization
NCBI_gi:85674494	<i>mhpE</i>	4,72	4-hydroxy-2-oxovalerate/4-hydroxy-2-oxopentanoic acid aldolase, class I	carbon utilization
NCBI_gi:85674493	<i>mhpF</i>	4,52	acetaldehyde-CoA dehydrogenase II, NAD-binding	carbon utilization
NCBI_gi:1651510	<i>csgB</i>	4,92	curlin nucleator protein, minor subunit in curli complex	cell adhesion
NCBI_gi:4062557	<i>ycjJ</i>	4,86	hypothetical protein	cell adhesion
NCBI_gi:85674827	<i>yceP</i>	5,25	hypothetical protein	cell adhesion
NCBI_gi:85675385	<i>yfdY</i>	4,76	predicted inner membrane protein	cell adhesion
NCBI_gi:4062413	<i>yliH</i>	8,29	regulator of biofilm formation	cell adhesion
NCBI_gi:85674858	<i>ymgB</i>	4,64	regulator of acid resistance, influenced by indole	cell adhesion
NCBI_gi:85676679	<i>fic</i>	4,83	stationary-phase protein, cell division	cell division
NCBI_gi:85674870	<i>ycgR</i>	6,43	protein involved in flagellar function	cell motility
NCBI_gi:85676903	<i>blc</i>	6,14	outer membrane lipoprotein	cell wall
NCBI_gi:85674575	<i>bolA</i>	10,57	regulator of penicillin binding proteins and beta lactamase transcription	cell wall
NCBI_gi:1742735	<i>cfa</i>	7,37	cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase	cell wall
NCBI_gi:85674628	<i>ybbK</i>	4,66	predicted protease, membrane anchored	cell wall
NCBI_gi:4062492	<i>ycbB</i>	5,54	predicted carboxypeptidase	cell wall
NCBI_gi:85675073	<i>ynhG</i>	5,55	L,D-transpeptidase	cell wall
NCBI_gi:85675816	<i>dkgA</i>	5,90	2,5-diketo-D-gluconate reductase A	central intermediary metabolism
NCBI_gi:85674298	<i>fixC</i>	4,83	predicted oxidoreductase, FAD/NAD(P)-binding domain	central intermediary metabolism
NCBI_gi:85674299	<i>fixX</i>	6,44	predicted 4Fe-4S ferredoxin-type protein	central intermediary metabolism
NCBI_gi:1742673	<i>hdhA</i>	4,64	7alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, NAD-dependent	central intermediary metabolism
NCBI_gi:1651348	<i>modA</i>	4,61	molybdate transporter subunit	cofactors and vitamins metabolism
NCBI_gi:1651440	<i>ihfB</i>	4,55	integration host factor (IHF), DNA-binding protein, beta subunit	DNA recombination
NCBI_gi:4062563	<i>rarA</i>	4,53	predicted hydrolase	DNA recombination
NCBI_gi:1736675	<i>sbmC</i>	5,10	DNA gyrase inhibitor	DNA replication
NCBI_gi:85676803	<i>qor</i>	5,81	quinone oxidoreductase, NADPH-dependent	energy production/transport
NCBI_gi:4062205	<i>cusA</i>	5,08	copper/silver efflux system, membrane component	metal efflux
NCBI_gi:4062198	<i>cusB</i>	12,02	copper/silver efflux system, membrane fusion protein	metal efflux
NCBI_gi:4062196	<i>cusC</i>	45,36	copper/silver efflux system, outer membrane component	metal efflux
NCBI_gi:4062197	<i>cusF</i>	15,48	periplasmic copper-binding protein	metal efflux
NCBI_gi:1736829	<i>yohM</i>	27,81	membrane protein conferring nickel and cobalt resistance	metal efflux
NCBI_gi:85675871	<i>yqjI</i>	4,88	predicted transcriptional regulator	metal homeostasis
NCBI_gi:85675151	<i>znuA</i>	6,38	zinc transporter subunit	metal homeostasis
NCBI_gi:85675172	<i>yedW</i>	5,02	predicted DNA-binding response regulator in two-component system	multidrug resistance
NCBI_gi:85674683	<i>ninE</i>	7,57	hypothetical protein	phage origin
NCBI_gi:1742577	<i>ydfD</i>	7,84	hypothetical protein	phage origin
NCBI_gi:4902985	<i>ykfB</i>	8,19	hypothetical protein	phage origin
NCBI_gi:1651401	<i>clpA</i>	8,65	ATPase	protein fate
NCBI_gi:1742677	<i>add</i>	5,66	adenosine deaminase	purine metabolism
NCBI_gi:85675173	<i>yedX</i>	7,62	hypothetical protein	purine metabolism
NCBI_gi:85674814	<i>yedH</i>	7,56	predicted oxidoreductase, flavin:NADH component	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:4062562	<i>yedI</i>	4,54	predicted oxidoreductase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:4062564	<i>yedK</i>	5,73	predicted aminoacrylate peracid reductase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:85674815	<i>yedL</i>	6,65	peroxyureidoacrylate / ureidoacrylate amido hydrolase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:85675002	<i>lsrG</i>	4,54	hypothetical protein	quorum sensing
NCBI_gi:1651605	<i>chaB</i>	4,79	predicted cation regulator	regulator
NCBI_gi:1651517	<i>msyB</i>	5,07	hypothetical protein	secretion
NCBI_gi:85676938	<i>aidB</i>	5,31	isovaleryl CoA dehydrogenase	stress response

Table 1: (continued)

Accession number	Gene	FC	Protein	Functional classification
NCBI_gi:1651400	<i>cspD</i>	5,25	cold shock protein homolog	stress response
NCBI_gi:1651366	<i>dps</i>	11,46	Fe-binding and storage protein	stress response
NCBI_gi:1742701	<i>gst</i>	5,88	glutathionine S-transferase	stress response
NCBI_gi:85675171	<i>hchA</i>	5,67	Hsp31 molecular chaperone	stress response
NCBI_gi:85676118	<i>katG</i>	5,62	catalase/hydroperoxidase HPI(I)	stress response
NCBI_gi:85676970	<i>msrA</i>	5,49	methionine sulfoxide reductase A	stress response
NCBI_gi:1742412	<i>osmC</i>	5,08	osmotically inducible, stress-inducible membrane protein	stress response
NCBI_gi:1742845	<i>osmE</i>	7,16	DNA-binding transcriptional regulator	stress response
NCBI_gi:1651507	<i>phoH</i>	13,08	conserved hypothetical protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	stress response
NCBI_gi:85674525	<i>psiF</i>	5,34	hypothetical protein	stress response
NCBI_gi:85675562	<i>rpoS</i>	5,71	RNA polymerase, sigma S (sigma 38) factor (pseudogene)	stress response
NCBI_gi:1742729	<i>sodB</i>	5,59	superoxide dismutase, Fe	stress response
NCBI_gi:85675057	<i>sodC</i>	5,75	superoxide dismutase, Cu, Zn	stress response
NCBI_gi:85676549	<i>uspA</i>	7,80	universal stress global response regulator	stress response
NCBI_gi:1742248	<i>uspF</i>	8,23	stress-induced protein, ATP-binding protein	stress response
NCBI_gi:4062223	<i>uspG</i>	11,23	universal stress protein UP12	stress response
NCBI_gi:1742519	<i>ydeI</i>	4,54	hypothetical protein	stress response
NCBI_gi:1742901	<i>yeaG</i>	6,47	conserved hypothetical protein family serine protein kinases	stress response
NCBI_gi:85676550	<i>yhiO</i>	9,35	predicted universal stress (ethanol tolerance) protein B, UspB	stress response
NCBI_gi:85676137	<i>yjiT</i>	9,87	Universal stress protein D, uspD	stress response
NCBI_gi:85676782	<i>yjbA</i>	28,54	predicted phosphate starvation inducible protein	stress response
NCBI_gi:4062423	<i>yliU</i>	5,15	predicted glutathione S-transferase	stress response
NCBI_gi:85675176	<i>yodA</i>	23,93	Cd, Zn induced Cd, Zn binding protein, ZinT	stress response
NCBI_gi:85675167	<i>yodD</i>	7,70	stress-induced protein	stress response
NCBI_gi:85675815	<i>yqhD</i>	5,24	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	stress response
NCBI_gi:85675902	<i>yqjG</i>	6,02	S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductase, glutathione transferases	stress response
NCBI_gi:85676965	<i>cysQ</i>	5,47	adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase	sulfur metabolism
NCBI_gi:85674375	<i>rof</i>	4,68	modulator of Rho-dependent transcription termination	termination
NCBI_gi:85675824	<i>ygiT</i>	4,71	MqsA antitoxin of the MqsRA toxin-antitoxin	toxin
NCBI_gi:85675825	<i>ygiU</i>	4,94	toxin of the MqsR-MqsA toxin-antitoxin system	toxin
NCBI_gi:85676557	<i>rbbA</i>	8,85	fused ribosome-associated ATPases	translation
NCBI_gi:1800000	<i>yfiA</i>	10,08	Ribosome-associated inhibitor A	translation
NCBI_gi:85676751	<i>mscL</i>	4,59	mechanosensitive channel	transporter
NCBI_gi:85675735	<i>mscS</i>	4,90	mechanosensitive channel	transporter
NCBI_gi:85676548	<i>yhiP</i>	5,47	predicted transporter	transporter
NCBI_gi:4062558	<i>wrbA</i>	6,21	predicted flavoprotein in Trp regulation	unknown
NCBI_gi:21238972	<i>yacl</i>	4,84	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:21239019	<i>yaeh</i>	6,31	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4902931	<i>yaep</i>	7,54	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4902945	<i>yafc</i>	4,56	predicted DNA-binding transcriptional regulator	unknown
NCBI_gi:4902986	<i>yafy</i>	6,72	predicted DNA-binding transcriptional regulator	unknown
NCBI_gi:85674472	<i>yahO</i>	8,83	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85674523	<i>yaiB</i>	6,30	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4062258	<i>ybel</i>	5,50	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4062325	<i>ybgS</i>	8,07	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4062353	<i>ybhG</i>	5,93	predicted membrane fusion protein (MFP)	unknown
NCBI_gi:4062347	<i>ybhP</i>	4,85	predicted DNase	unknown
NCBI_gi:4062445	<i>ybjP</i>	5,04	predicted lipoprotein	unknown
NCBI_gi:4062476	<i>ycaN</i>	5,55	predicted DNA-binding transcriptional regulator	unknown
NCBI_gi:85674805	<i>yccX</i>	4,53	acylphosphatase	unknown
NCBI_gi:4062773	<i>ycgB</i>	15,95	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4062755	<i>ycgK</i>	16,23	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:1742405	<i>yddl</i>	8,18	putative outer membrane porin	unknown
NCBI_gi:85675066	<i>ydhR</i>	5,68	predicted monooxygenase	unknown
NCBI_gi:85675123	<i>yeaO</i>	4,88	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85675170	<i>yedR</i>	6,67	predicted inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:85675212	<i>yegP</i>	10,66	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:18000008	<i>yfiL</i>	18,87	putative lipoprotein	unknown
NCBI_gi:85675514	<i>ygaU</i>	9,48	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85675809	<i>yghA</i>	6,00	Uncharacterized oxidoreductase	unknown
NCBI_gi:85675903	<i>yhaH</i>	4,83	putative cytochrome	unknown
NCBI_gi:85676678	<i>yhfg</i>	5,31	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85676595	<i>yhhA</i>	12,19	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85676556	<i>yhil</i>	5,30	predicted HlyD family secretion protein	unknown
NCBI_gi:85676441	<i>yibT</i>	26,56	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85676138	<i>yiiS</i>	9,12	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85676812	<i>yjcB</i>	6,84	predicted inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:85676861	<i>yjdA</i>	4,60	conserved hypothetical protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	unknown
NCBI_gi:85677119	<i>yjil</i>	5,75	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4062780	<i>ymgE</i>	8,50	predicted inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:85675111	<i>ynjH</i>	6,64	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85675126	<i>yoaG</i>	5,25	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85675249	<i>yohC</i>	9,93	predicted inner membrane protein	unknown

Table 1: (continued)

Accession number	Gene	FC	Protein	Fonctional classification
NCBI_gi:85675378	<i>ypdJ</i>	11,57	hypothetical protein	unkown
NCBI_gi:85676483	<i>ysaB</i>	5,21	hypothetical protein	unkown
NCBI_gi:85677115	<i>ytjA</i>	6,40	hypothetical protein	unkown
NCBI_gi:85675667	<i>ygeG</i>	6,15	predicted chaperone	virulence



**Table 2:** Differentially expressed genes identified in *E.coli* W3110 that were specifically down-regulated by Ni treatment

Accession number	Gene	FC	Protein	Functional classification
NCBI_gi:85675717	<i>gcvT</i>	-4,64	aminomethyltransferase	amino acid metabolism
NCBI_gi:85676273	<i>ilvC</i>	-8,07	ketol-acid reductoisomerase, NAD(P)-binding	amino acid metabolism
NCBI_gi:85675270	<i>lysP</i>	-4,64	lysine transporter	amino acid metabolism
NCBI_gi:85674277	<i>thrB</i>	-4,59	homoserine kinase	amino acid metabolism
NCBI_gi:21321894	<i>thrC</i>	-5,58	threonine synthase	amino acid metabolism
NCBI_gi:85675190	<i>yeeF</i>	-10,95	predicted amino-acid transporter	amino acid metabolism
NCBI_gi:85674572	<i>cyoA</i>	-5,33	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85675215	<i>gatA</i>	-5,23	galactitol-specific enzyme IIA component of PTS	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85676785	<i>malF</i>	-8,88	maltose transporter subunit	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85676787	<i>malK</i>	-9,06	fused maltose transport subunit, ATP-binding component of ABC superfamily	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85675263	<i>mglA</i>	-6,28	methyl-galactoside transporter	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:1736851	<i>mgo</i>	-13,69	malate dehydrogenase, FAD/NAD(P)-binding domain	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85674335	<i>pdhR</i>	-17,65	DNA-binding transcriptional dual regulator	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85676289	<i>rbsA</i>	-11,03	D-ribose transporter	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:85676290	<i>rbsD</i>	-5,59	predicted cytoplasmic sugar-binding protein	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:1799941	<i>suhB</i>	-28,31	inositol monophosphatase	carbohydrate metabolism
NCBI_gi:4062658	<i>flgI</i>	-5,28	predicted flagellar basal body protein	cell motility
NCBI_gi:4062659	<i>flgJ</i>	-6,81	muramidase	cell motility
NCBI_gi:1736550	<i>flhC</i>	-14,68	DNA-binding transcriptional regulator with FlhD	cell motility
NCBI_gi:1736551	<i>flhD</i>	-14,89	DNA-binding transcriptional dual regulator with FlhC	cell motility
NCBI_gi:1736600	<i>fliE</i>	-12,41	flagellar basal-body component	cell motility
NCBI_gi:1736607	<i>fliI</i>	-4,75	flagellum-specific ATP synthase	cell motility
NCBI_gi:1736608	<i>fliJ</i>	-5,58	flagellar protein	cell motility
NCBI_gi:1736609	<i>fliK</i>	-7,41	flagellar hook-length control protein	cell motility
NCBI_gi:85675166	<i>fliO</i>	-6,11	flagellar biosynthesis protein	cell motility
NCBI_gi:1736614	<i>fliP</i>	-10,61	flagellar biosynthesis protein	cell motility
NCBI_gi:1736615	<i>fliQ</i>	-13,88	flagellar biosynthesis protein	cell motility
NCBI_gi:1736616	<i>fliR</i>	-20,56	flagellar export pore protein	cell motility
NCBI_gi:85674573	<i>ampG</i>	-11,80	muropeptide transporter	cell wall
NCBI_gi:85676499	<i>eptB</i>	-4,67	predicted metal dependent hydrolase	cell wall
NCBI_gi:85674661	<i>lpxH</i>	-4,66	UDP-2,3-diacetylglucosamine pyrophosphatase	cell wall
NCBI_gi:85676645	<i>mrcA</i>	-4,75	penicillin-binding protein 1a murein transglycosylase and murein transpeptidase	cell wall
NCBI_gi:1651266	<i>mrda</i>	-6,50	transpeptidase involved in peptidoglycan synthesis	cell wall
NCBI_gi:85676042	<i>mreC</i>	-7,31	cell wall structural complex MreBCD transmembrane component MreC	cell wall
NCBI_gi:1736617	<i>rcsA</i>	-7,79	DNA-binding transcriptional co-regulator with RcsB	cell wall
NCBI_gi:1742691	<i>nth</i>	-6,48	DNA glycosylase and apyrimidinic (AP) lyase	DNA repair
NCBI_gi:85676391	<i>recG</i>	-5,85	ATP-dependent DNA helicase	DNA repair
NCBI_gi:85676229	<i>recQ</i>	-4,90	ATP-dependent DNA helicase	DNA repair
NCBI_gi:1736840	<i>spr</i>	-7,05	predicted peptidase, outer membrane lipoprotein	DNA repair
NCBI_gi:85676299	<i>atpI</i>	-6,69	ATP synthase, membrane-bound accessory subunit	energy production/transport
NCBI_gi:1651546	<i>ndh</i>	-4,51	respiratory NADH dehydrogenase 2/cupric reductase	energy production/transport
NCBI_gi:85675269	<i>cirA</i>	-18,51	outer membrane transporter	iron metabolism
NCBI_gi:85674717	<i>entA</i>	-7,05	2,3-dihydroxy-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	iron metabolism
NCBI_gi:85674716	<i>entB</i>	-6,06	isochorismatase	iron metabolism
NCBI_gi:85674714	<i>entC</i>	-8,09	isochorismate synthase 1	iron metabolism
NCBI_gi:85674704	<i>entD</i>	-13,97	phosphopantetheinyltransferase	iron metabolism
NCBI_gi:85674715	<i>entE</i>	-6,75	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	iron metabolism
NCBI_gi:85677032	<i>fecA</i>	-9,64	ferric citrate outer membrane transporter	iron metabolism
NCBI_gi:85677031	<i>fecB</i>	-6,53	iron-dicitrate transporter subunit	iron metabolism
NCBI_gi:85677030	<i>fecC</i>	-12,77	iron-dicitrate transporter subunit	iron metabolism
NCBI_gi:85677029	<i>fecD</i>	-9,38	iron-dicitrate transporter subunit	iron metabolism
NCBI_gi:85677028	<i>fecE</i>	-7,97	iron-dicitrate transporter subunit	iron metabolism
NCBI_gi:85677034	<i>fecI</i>	-5,09	RNA polymerase, sigma 19 factor	iron metabolism
NCBI_gi:85677033	<i>fecR</i>	-7,54	transmembrane signal transducer for ferric citrate transport	iron metabolism
NCBI_gi:4062212	<i>fepA</i>	-8,22	iron-enterobactin outer membrane transporter	iron metabolism
NCBI_gi:85674708	<i>fepE</i>	-16,68	regulator of length of O-antigen component of lipopolysaccharide chains	iron metabolism
NCBI_gi:1651542	<i>fhuE</i>	-4,95	ferric-rhodotorulic acid outer membrane transporter	iron metabolism
NCBI_gi:4062366	<i>fiu</i>	-23,82	predicted iron outer membrane transporter	iron metabolism
NCBI_gi:1805560	<i>purN</i>	-9,73	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 1	iron metabolism
NCBI_gi:85674718	<i>ybdB</i>	-8,21	hypothetical protein	iron metabolism
NCBI_gi:85674765	<i>ybiX</i>	-8,43	hypothetical protein	iron metabolism
NCBI_gi:4062584	<i>ycdB</i>	-9,78	hypothetical protein	iron metabolism
NCBI_gi:85674816	<i>ycdO</i>	-8,38	hypothetical protein	iron metabolism
NCBI_gi:85676046	<i>accB</i>	-4,52	acetyl CoA carboxylase, BCCP subunit	lipids metabolism
NCBI_gi:85676434	<i>gpsA</i>	-4,64	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)	lipids metabolism
NCBI_gi:85676047	<i>accC</i>	-5,12	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit	metabolism of cofactors and vitamins
NCBI_gi:4062256	<i>cobC</i>	-4,53	predicted alpha-ribazole-5'-P phosphatase	metabolism of cofactors and vitamins
NCBI_gi:21238998	<i>folK</i>	-6,42	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylhydropteridine pyrophosphokinase	metabolism of cofactors and vitamins
NCBI_gi:85674563	<i>thiI</i>	-4,52	sulfurtransferase required for thiamine and 4-thiouridine biosynthesis	metabolism of cofactors and vitamins
NCBI_gi:1800070	<i>emrA</i>	-5,62	multidrug efflux system	multidrug resistance
NCBI_gi:85676055	<i>envR</i>	-10,41	DNA-binding transcriptional regulator	multidrug resistance
NCBI_gi:1742634	<i>mdtJ</i>	-11,57	multidrug efflux system transporter	multidrug resistance

Table 2: (continued)

Accession number	Gene	FC	Protein	Functional classification
NCBI_gi:1800069	<i>mprA</i>	-5,32	DNA-binding transcriptional regulator	multidrug resistance
	<i>intG</i>	-17,38	predicted protein	phage origin
NCBI_gi:85674692	<i>rzoD</i>	-107,43	predicted lipoprotein	phage origin
NCBI_gi:4902973	<i>gpt</i>	-14,09	guanine-hypoxanthine phosphoribosyltransferase	purine metabolism
NCBI_gi:85675431	<i>guaB</i>	-4,81	IMP dehydrogenase	purine metabolism
NCBI_gi:4062790	<i>prsA</i>	-6,22	phosphoribosylpyrophosphate synthase	purine metabolism
NCBI_gi:1651559	<i>purB</i>	-7,80	adenylosuccinate lyase	purine metabolism
NCBI_gi:1799903	<i>purC</i>	-21,64	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthetase	purine metabolism
NCBI_gi:85676064	<i>purD</i>	-28,19	phosphoribosylglycinamide synthetase phosphoribosylamine-glycine ligase	purine metabolism
NCBI_gi:85674660	<i>purE</i>	-113,94	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	purine metabolism
NCBI_gi:85675353	<i>purF</i>	-16,22	amidophosphoribosyltransferase	purine metabolism
NCBI_gi:85676063	<i>purH</i>	-46,31	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	purine metabolism
NCBI_gi:85674659	<i>purK</i>	-82,97	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase	purine metabolism
NCBI_gi:85675448	<i>purL</i>	-37,76	phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase	purine metabolism
NCBI_gi:1805559	<i>purM</i>	-88,24	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	purine metabolism
NCBI_gi:85675149	<i>purT</i>	-12,65	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	purine metabolism
NCBI_gi:1805557	<i>uraA</i>	-9,28	uracil transporter	purine metabolism
NCBI_gi:21321914	<i>carA</i>	-100,30	carbamoyl phosphate synthetase small subunit, glutamine amidotransferase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:21321915	<i>carB</i>	-33,43	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:1651431	<i>cmk</i>	-4,75	cytidylate kinase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:85674479	<i>codA</i>	-5,68	cytosine deaminase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:85674478	<i>codB</i>	-9,29	cytosine transporter	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:1799917	<i>ndk</i>	-11,55	nucleoside diphosphate kinase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:85676994	<i>pyrB</i>	-26,23	aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:1651523	<i>pyrC</i>	-11,44	dihydro-orotase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:1651460	<i>pyrD</i>	-23,97	dihydro-orotate oxidase, FMN-linked	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:1742095	<i>pyrF</i>	-7,84	orotidine-5'-phosphate decarboxylase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:85676993	<i>pyrI</i>	-9,44	aspartate carbamoyltransferase, regulatory subunit	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:85676995	<i>pyrL</i>	-9,20	pyrBI operon leader peptide	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:4062271	<i>rihA</i>	-7,03	ribonucleoside hydrolase 1	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:1805558	<i>upp</i>	-10,59	uracil phosphoribosyltransferase	pyrimidine metabolism
NCBI_gi:85676052	<i>fis</i>	-5,12	global DNA-binding transcriptional dual regulator	regulator
NCBI_gi:85677088	<i>hsdS</i>	-8,55	specificity determinant for hsdM and hsdR	restriction modification
NCBI_gi:1742100	<i>rnb</i>	-7,94	ribonuclease II	RNA fate
NCBI_gi:85676340	<i>rnpA</i>	-31,97	protein C5 component of RNase P	RNA fate
NCBI_gi:85675063	<i>rnt</i>	-4,66	ribonuclease T (RNase T)	RNA fate
NCBI_gi:85675969	<i>secG</i>	-5,00	preprotein translocase membrane subunit	secretion
NCBI_gi:1742553	<i>cspF</i>	-7,21	cold shock protein	stress response
NCBI_gi:85674811	<i>cspH</i>	-10,13	stress protein, member of the CspA-family	stress response
NCBI_gi:1742688	<i>rsxC</i>	-7,95	inner membrane iron-sulfur protein in SoxR-reducing complex	stress response
NCBI_gi:85675049	<i>rsxD</i>	-8,11	predicted inner membrane oxidoreductase	stress response
NCBI_gi:1742690	<i>rsxE</i>	-8,16	predicted inner membrane NADH-quinone reductase	stress response
NCBI_gi:1742689	<i>rsxG</i>	-9,94	predicted oxidoreductase	stress response
NCBI_gi:1799841	<i>cysA</i>	-20,00	sulfate/thiosulfate transporter subunit	sulfur metabolism
NCBI_gi:85675571	<i>cysC</i>	-7,16	adenosine 5'-phosphosulfate kinase	sulfur metabolism
NCBI_gi:85675573	<i>cysD</i>	-8,10	sulfate adenyltransferase, subunit 2	sulfur metabolism
NCBI_gi:85675583	<i>cysH</i>	-12,05	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase	sulfur metabolism
NCBI_gi:85675584	<i>cysI</i>	-33,60	sulfite reductase, beta subunit, NAD(P)-binding	sulfur metabolism
NCBI_gi:85675585	<i>cysJ</i>	-25,77	sulfite reductase, alpha subunit, flavoprotein	sulfur metabolism
NCBI_gi:1799840	<i>cysM</i>	-5,72	cysteine synthase B	sulfur metabolism
NCBI_gi:85675572	<i>cysN</i>	-5,35	sulfate adenyltransferase, subunit 1	sulfur metabolism
NCBI_gi:1799844	<i>cysP</i>	-4,99	thiosulfate transporter subunit	sulfur metabolism
NCBI_gi:1799843	<i>cysU</i>	-12,70	sulfate/thiosulfate transporter subunit	sulfur metabolism
NCBI_gi:1799842	<i>cysW</i>	-20,00	sulfate/thiosulfate transporter subunit	sulfur metabolism
NCBI_gi:1651317	<i>sdhC</i>	-6,07	succinate dehydrogenase, membrane subunit, binds cytochrome b556	TCA cycle
NCBI_gi:1651318	<i>sdhD</i>	-4,87	succinate dehydrogenase, membrane subunit, binds cytochrome b556	TCA cycle
NCBI_gi:1799694	<i>cvpA</i>	-12,65	membrane protein required for colicin V production	toxin
NCBI_gi:85676051	<i>dusB</i>	-6,14	tRNA-dihydrouridine synthase B	translation
NCBI_gi:1651402	<i>infA</i>	-5,68	translation initiation factor IF-1	translation
NCBI_gi:85674556	<i>nusB</i>	-4,72	transcription antitermination protein	translation
NCBI_gi:85677113	<i>prfC</i>	-6,32	peptide chain release factor RF-3	translation
NCBI_gi:85674545	<i>queA</i>	-6,00	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	translation
NCBI_gi:1742064	<i>rluB</i>	-4,54	23S rRNA pseudouridylate synthase	translation
NCBI_gi:4062660	<i>rluC</i>	-6,37	23S rRNA pseudouridylate synthase	translation
NCBI_gi:85676086	<i>rplA</i>	-7,39	50S ribosomal subunit protein L1	translation
NCBI_gi:85676724	<i>rplB</i>	-9,82	50S ribosomal subunit protein L2	translation
NCBI_gi:85676721	<i>rplC</i>	-11,32	50S ribosomal subunit protein L3	translation
NCBI_gi:85676722	<i>rplD</i>	-10,43	50S ribosomal subunit protein L4	translation
NCBI_gi:85676087	<i>rplK</i>	-8,12	50S ribosomal subunit protein L11	translation
NCBI_gi:85676024	<i>rplM</i>	-4,84	50S ribosomal subunit protein L13	translation
NCBI_gi:85676726	<i>rplV</i>	-8,45	50S ribosomal subunit protein L22	translation
NCBI_gi:85676723	<i>rplW</i>	-11,64	50S ribosomal subunit protein L23	translation

Table 2: (continued)

Accession number	Gene	FC	Protein	Functional classification
NCBI_gi:85675294	<i>rplY</i>	-9,21	50S ribosomal subunit protein L25	translation
NCBI_gi:85676341	<i>rpmH</i>	-13,58	50S ribosomal subunit protein L34	translation
NCBI_gi:1651439	<i>rpsA</i>	-5,88	30S ribosomal subunit protein S1	translation
NCBI_gi:85676727	<i>rpsC</i>	-6,14	30S ribosomal subunit protein S3	translation
NCBI_gi:85676023	<i>rpsI</i>	-4,55	30S ribosomal subunit protein S9	translation
NCBI_gi:85676720	<i>rpsJ</i>	-11,76	30S ribosomal subunit protein S10	translation
NCBI_gi:85675480	<i>rpsP</i>	-4,93	30S ribosomal subunit protein S16	translation
NCBI_gi:85676725	<i>rpsS</i>	-8,47	30S ribosomal subunit protein S19	translation
NCBI_gi:21321906	<i>rpsT</i>	-8,43	30S ribosomal subunit protein S20	translation
NCBI_gi:85675866	<i>rpsU</i>	-7,15	30S ribosomal subunit protein S21	translation
NCBI_gi:85674788	<i>ycaO</i>	-7,03	hypothetical protein	translation
NCBI_gi:1742096	<i>yciH</i>	-7,67	translation initiation factor	translation
NCBI_gi:85674693	<i>borD</i>	-5,02	predicted lipoprotein	unknown
NCBI_gi:85676008	<i>gltF</i>	-4,54	periplasmic protein	unknown
NCBI_gi:85675856	<i>htrG</i>	-7,90	predicted signal transduction protein	unknown
NCBI_gi:21321895	<i>yaaX</i>	-4,52	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4062453	<i>ybjE</i>	-5,13	predicted transporter	unknown
	<i>ycdN</i>	-4,86	predicted protein	unknown
NCBI_gi:4062629	<i>yceA</i>	-5,73	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4062693	<i>ycfZ</i>	-7,50	predicted inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:85674855	<i>ycgX</i>	-5,56	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85674893	<i>yciW</i>	-4,56	predicted oxidoreductase	unknown
NCBI_gi:85674992	<i>yddA</i>	-8,17	predicted multidrug transporter	unknown
NCBI_gi:85675090	<i>ydiY</i>	-6,81	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:1742823	<i>ydjN</i>	-15,71	predicted transporter	unknown
NCBI_gi:85675095	<i>ydjO</i>	-12,69	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:1736440	<i>yeaZ</i>	-8,01	predicted peptidase	unknown
NCBI_gi:85675165	<i>yedM</i>	-11,85	hypothetical protein	unknown
	<i>yedN</i>	-47,28	predicted protein	unknown
NCBI_gi:1736686	<i>yeeD</i>	-6,32	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:1736687	<i>yeeE</i>	-10,79	predicted inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:85675180	<i>yeeN</i>	-4,53	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85675239	<i>yehU</i>	-4,81	predicted sensory kinase in two-component system with YehT	unknown
NCBI_gi:85675266	<i>yeiB</i>	-4,74	conserved inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:85675287	<i>yeiU</i>	-7,31	undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	unknown
NCBI_gi:85675356	<i>yfcl</i>	-6,67	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:1799748	<i>yfdH</i>	-4,51	bactoprenol glucosyl transferase	unknown
NCBI_gi:85675368	<i>yfdI</i>	-9,77	predicted inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:85675453	<i>yfhL</i>	-7,01	predicted 4Fe-4S cluster-containing protein	unknown
NCBI_gi:85675586	<i>ygcM</i>	-8,25	6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase	unknown
NCBI_gi:85675819	<i>ygiQ</i>	-7,39	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85676658	<i>yhfZ</i>	-5,20	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85676428	<i>yibQ</i>	-4,69	predicted polysaccharide deacetylase	unknown
NCBI_gi:85676389	<i>yicE</i>	-7,87	predicted transporter	unknown
NCBI_gi:85676338	<i>yidC</i>	-5,21	cytoplasmic insertase into membrane protein, Sec system	unknown
NCBI_gi:85676339	<i>yidD</i>	-26,00	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85676324	<i>yieG</i>	-10,27	predicted inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:85676186	<i>yihM</i>	-5,36	predicted sugar phosphate isomerase	unknown
NCBI_gi:85676816	<i>yjcD</i>	-6,15	predicted permease	unknown
NCBI_gi:85676955	<i>yjfZ</i>	-5,76	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:4062410	<i>yliE</i>	-27,82	conserved inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:4062411	<i>yliF</i>	-4,55	predicted diguanylate cyclase	unknown
NCBI_gi:4062412	<i>yliG</i>	-7,64	predicted SAM-dependent methyltransferase	unknown
NCBI_gi:85674842	<i>ymfA</i>	-6,94	predicted inner membrane protein	unknown
NCBI_gi:1736852	<i>yojI</i>	-5,65	predicted multidrug transport	unknown
NCBI_gi:85675750	<i>yqgC</i>	-4,93	hypothetical protein	unknown
NCBI_gi:85675947	<i>yraQ</i>	-4,80	predicted permease	unknown

**Table 3:** Oligonucléotides utilisés dans ces travaux

noms	Séquences oligonucléotides	références
adiAFQ	5' TGG TGA CCA ACT GCA CCT AT 3'	Ce travail
adiARQ	5' ATG GCA TAG TGA TCG GCA TA 3'	Ce travail
adiYFQ	5' AGC GAT ATT CAC AAA GAC TGG A 3'	Ce travail
adiYRQ	5' TCA TTT ACG GCA TAA CGC AT 3'	Ce travail
cadAFQ	5' CGT ATT CAG GAA CTG GCT CA 3'	Ce travail
cadARQ	5' TCA TAC CGT GCA GCT CTT TC 3'	Ce travail
cadBFQ	5' CTG TAC TGG GTT GCG TGT TC 3'	Ce travail
cadBRQ	5' CGG TGT GGT TAT CCA TTG AG 3'	Ce travail
cadCFQ	5' AGC TCT CTT ACG CGA TAG GC 3'	Ce travail
cadCRQ	5' CGC TGA TTA ACA AAC GCA AT 3'	Ce travail
CueOup	5' GTT TGA TTT TGT TTC GCC TGC 3'	laboratoire
CueOdwn	5' CGG GCA TAT TTC CGA ATA CG 3'	laboratoire
cusCFQ	5' AAT GTC GCG CAA AGC TAT TT 3'	Ce travail
cusCRQ	5' CGC TGC GGG TAC TTT CTA TC 3'	Ce travail
CusFup	5' TGA CTT TTA ACT CCA GGA GAG 3'	laboratoire
CusFdwn	5' TTT TCA TCT CAT TAA ACC TGG G 3'	laboratoire
emrKFQ	5' CAC AAC TCA CGG ATG TAC GG 3'	Ce travail
emrKRQ	5' ACG CTG AAC GAT TTT GAT CC 3'	Ce travail
emrYFQ	5' CCC TGT TAG TGC TCG GTG TT 3'	Ce travail
emrYRQ	5' CTG AGA TCA AGA ATC GGG TT 3'	Ce travail
evgAf	5' CAA CCG GTT TGT TGG AAG TT 3'	Ce travail
evgAr	5' ACT TTT ATA AGT GCT GAC AG 3'	Ce travail
evgSfor	5' TCA GGC GTT TAA GCA GGT CT 3'	Ce travail
evgSrev	5' TCC TGC GATT AAT CCA CTT CC 3'	Ce travail
fabZFQ	5' TTC CCG TTC TTA CTG GTG GA 3'	Ce travail
fabZRQ	5' CAT TGC TTC CAG AAT CAG CA 3'	Ce travail
fbaAF	5' AAA CCT GGC GTA ATC ACT GG 3'	Ce travail
fbaAR	5' CCG TTG GAG AAC TGA ACG AT 3'	Ce travail
gadAFQ	5' TTA CCA GGT TGC CGC TTA TC 3'	Ce travail
gadARQ	5' ACG CAG CAG TTC AGA GAG GT 3'	Ce travail
gadCFQ	5' CTA AAG TGG GCA CCC TGG TA 3'	Ce travail
gadCRQ	5' TCG CAA TAG ACA AAC CAC CA 3'	Ce travail
gadEFQ	5' TGC CCC ATA AGA ATT CAC AA 3'	Ce travail
gadERQ	5' GTG ACG ATG TCG CTC ATA CG 3'	Ce travail
gadWFQ	5' TTA CTC GCC TCC AGG ATG TC 3'	Ce travail
gadWRQ	5' AAG GTA CCT GGC GAA TGT TG 3'	Ce travail
gadXFQ2	5' TTT ATA CCG CTG CTT CTG AAC GT 3'	Ce travail
gadXRQ2	5' GTG TCC ACT CAT GGG CGA TAT TA 3'	Ce travail
gadYFQ	5' ACT GAG ATG AGC ACA AAG TTT CCC 3'	Ce travail
gadYRQ	5' GAG GAT AGT CTG CCG TCT CC 3'	Ce travail
hdeAFQ	5' TGC AGT TGG TTT TGC TGA AG 3'	Ce travail
hdeARQ	5' TTG TCC CAT TCG CCT TTA AC 3'	Ce travail
hdeBFQ	5' GCC AAT GAA TCC GCT AAA GA 3'	Ce travail
hdeBRQ	5' CAA ATT TTT CTG CGG GTT TT 3'	Ce travail
hdeDFQ	5' CCG GAT TTA TCC GGT TTC CT 3'	Ce travail
hdeDRQ	5' TGA ACG CTG ACG ATA CCA AC 3'	Ce travail
ldcCFQ	5' CTG ACG GTT GGT TTT TCG AT 3'	Ce travail
ldcCRQ	5' ATC CCC TCC TCG CTC ATA TT 3'	Ce travail
mdtEfor	5' AAT GTC ACC TCG CCG ATT AC 3'	Ce travail
mdtErev	5' CAC TGG CGA CCT CTT CTT TC 3'	Ce travail
mdtFfor	5' GAA AGT GCT GCA ACA GGT GA 3'	Ce travail
mdtFrev	5' GTT TTC CTC ACC GAC ACG TT 3'	Ce travail
pAWFw	5' CAT GTC AAA TTT CAC TGC TTC ATC 3'	Applied biosystems
pAWRev	5' TGA CCA CCC AGC CAT CCT T 3'	Applied biosystems
rpoSFQ	5' ACC AGG TTG CGT ATG TTG AG 3'	Ce travail
rpoSRQ	5' GTT ATG GCA ATC GTG GTC TG 3'	Ce travail
speFFQ	5' CGC AAA CTG ATC CTC GAT AA 3'	Ce travail
speFRQ	5' AAA CTG GAA GAA GCG CAG AT 3'	Ce travail
yddAFQ	5' TCG CTT AGC GTT CTT CCC TA 3'	Ce travail
yddARQ	5' CCA GTT CAG CAA GTT CGT CA 3'	Ce travail
yddBFQ	5' CAT GGA TTT CAC GCA TCA AC 3'	Ce travail
yddBRQ	5' GGC TGC TAT CCA GTT TTT CG 3'	Ce travail
ydeOFQ	5' GCG GCA TTT TAA AGA GAT CG 3'	Ce travail
ydeORQ	5' ATG ATT GCG TTC TTC CGA GT 3'	Ce travail
YohNup	5' CTT CAG CCC CAT ATG ATT CTT AAA TCA GC 3'	laboratoire
Yohdwn2	5' CCA CCA TAT AGG TCC AG 3'	laboratoire
YohN2FQ	5'GGC AGG AAA GAT ATG CGA CT 3'	laboratoire
YohN1RQ	5' CAC CGT CGT AGG CTT TAA TG 3'	laboratoire



# Strains engineering for the detection of Ni and Co in liquid environmental samples

<sup>1</sup>Prudent E., <sup>2</sup>Escoffier C., <sup>1</sup>Gault M., <sup>1</sup>Mandrand MA., <sup>2</sup>Pignol D., <sup>2</sup>Garcia D., <sup>1</sup>Rodrigue A.

<sup>1</sup>Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, CNRS-UCB-INSA-BayerCrop Science, Bât. Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois 69 222 Villeurbanne Cedex  
<sup>2</sup>LBC- CEA Cadarache IBEB/UMR7265 CNRS/CEA/Université Aix-Marseille CEA Cadarache Bat 156- 13108 Saint Paul lez Durance

Introductory

## The COMBITOX Project

The COMBITOX\* project was born by the necessity to control the purity water at a lower cost. Indeed, existing methods are complex and expensive.

The multiparametric device should allow the detection in continuous a bioavailable toxic compounds that can impact the human health via drinking water.

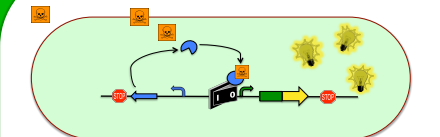
Three families of compounds are chosen:

- toxins
- pathogenic microorganisms
- heavy metals.

Among the metals to be detected Ni and Cobalt are of great importance. Here we present the development of a sensitive and specific biosensor for the detection of nickel.

\*Conception d'un instrument de Mesure Biologique multiparamétrique en continu de TONque

## Whole Cell Bacterial biosensor



A biosensor is based on the adaptation of bacteria to their environment via regulatory networks. These regulatory pathways are used to detect a specific signal and establish a biologic response which it is coupled with a chimioluminescence signal.

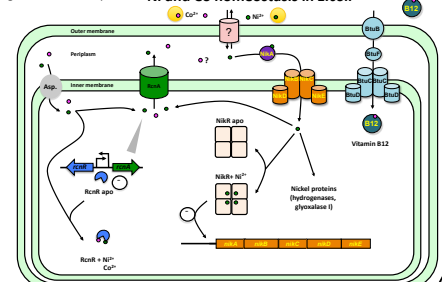
A regulatory gene encodes a regulatory protein. This protein detects toxic compounds and activates transcription of the target gene. The expression of the reporter gene is under the control of the target promoter.

The *lux* operon encodes luciferase. This enzyme catalyzes a reaction producing visible light.

## Rcn system in *E.coli*

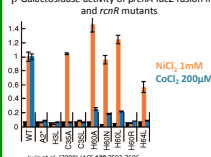
Ni and Co are essential components of all living cells because they are constitutive of many proteins. However, they become toxic when present in excess. That's why, the Ni and Co level is tightly regulated. Ni enters in the cytoplasm by the Nik system and Co by the Btu system. The model bacterium *Escherichia coli* possesses a resistance system Rcn, that allows the Ni and Co efflux from the cytoplasm to the periplasm. The Rcn system (Resistance to Cobalt and Nickel) is composed of a membrane protein RcnA, which is the efflux pump. The *rcnA* gene is regulated by the metallo-regulator RcnR. The *rcnR* gene is located upstream of the *rcnA* gene and is divergently transcribed. The RcnR protein binds DNA and represses the *rcn* operon transcription in the absence of metals. When Ni and Co are present in the cell, they bind on RcnR which loses its affinity for DNA leading to *rcnA* transcription.

### Ni and Co homeostasis in *E.coli*



It was previously shown that cysteine 35 and histidine 60 residues are involved in Co binding by RcnR (Iwig, 2008).

$\beta$ -Galactosidase activity of prcnA-lacZ fusion in wt and rcnR mutants



De Pina et al. (2005) Biochem J 388, 479-474  
 Schneider et al. (2006) PNAS 103, 13676-13681  
 Iwig et al. (2008) JACS 130, 7592-7596  
 Redinger et al. (2005) Biochem J 392, 2103-2109  
 Hagg et al. (2006) Mol Microbiol 62, 212-222  
 Blaha, et al. (2011) Biochem

Experimental procedure

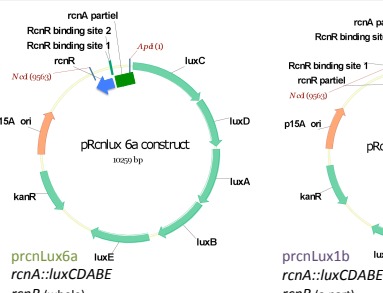
## Plasmids construction



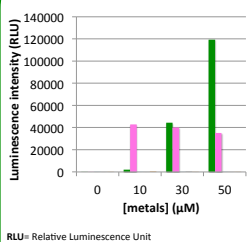
The *rcnA* operon PCR amplified and digested by two restriction enzymes *NcoI* and *ApaI*.

Then *rcnA* part was fused with the *lux* operon. 2 mutant versions of *rcnR* where synthesized one leading to RcnR C35A, the other to RcnR H60A, using site directed mutagenesis

Plasmid name	Plasmid description
prcnLux6a	rcnA::luxCDABE rcnR (whole)
prcnLux1b	rcnA::luxCDABE rcnR (a part)
pALux	rcnA::luxCDABE rcnR (C35A)
pALux	rcnA::luxCDABE rcnR (H60A)

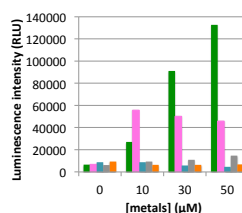


The prcnLux6a was introduced in *E.coli* DH10 $\beta$  strain. Bioluminescence was measured by during the bacterial growth with several metals.



The prcnLux6a allows the specific detection of Ni and Co  
 - Co below 10  $\mu$ M and Ni from 30  $\mu$ M

The prcnLux1b was introduced in *E.coli* DH10 $\beta$  strain. Bioluminescence was measured during the bacterial growth with different metals.



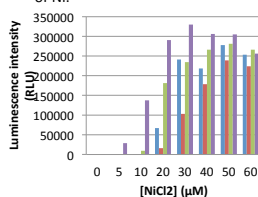
The prcnLux1b allows the detection :  
 - of Ni and Co  
 - Co from 10  $\mu$ M and Ni from 10  $\mu$ M  
 -Some residual detection of Cu, Zn, Cd

prcnLux1b is more sensitive than prcnLux6a to Ni and Co but retains specific detection of other metals

Results

## Luminescence monitoring during growth with Ni

The 4 plasmids, prcnLux6a, prcnLux1b, pALux and pALux are introduced in *E.coli* W3110  $\Delta$ rcnA strain. Bioluminescence was detected during the bacterial growth with different concentrations of Ni.

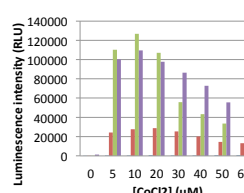


-The 4 plasmids construction allows Ni detection.  
 -Their sensitivity profile is :  
 prcnLux1b > prcnLux6a > pALux > pALux

The RcnR H60A and C35A mutations triggers a loss in Ni sensitivity

## Luminescence monitoring during growth with Co

The 4 plasmids, prcnLux6a, prcnLux1b, pALux and pALux are introduced in *E.coli* W3110  $\Delta$ rcnA strain. The bioluminescence was detected by during the bacterial growth with different concentrations of Co.



-prcnLux6a, prcnLux1b, and pALux can detect Co below 5  $\mu$ M  
 -The pALux plasmid is not responsive to Co

The pALux is the best candidate for the construction of a specific biosensor for Ni

Conclusion

The *rcnA* is a suitable genetic system for the engineering of a bacterial biosensor as its expression is proportional to the concentrations of Ni or Co present in the medium. Presence of the *rcnR* gene in multicopy slightly decreases Ni/Co detection but strongly increases metal specificity. Using the native *rcnR*, we obtained a sensitive bacterial biosensor for Ni and Co detection, undifferentiated. The main insight is the obtention of Ni specific biosensor by mutating *rcnR*. The cysteine 35 substitution by an alanine in the RcnR protein lead to the complete loss of Co recognition. The strain containing this substitution encoded by the pALux plasmid is the best candidate for a specific biosensor of nickel.

### Acknowledgements:

This work was supported by an ANR grant : Ecotech program, COMITOX project; and by a BQR grant from INSA Lyon

Cette these est accessible a l'adresse : <http://theses.insa-lyon.fr/publication/2014ISAL0130/these.pdf>

© [M. Gault], [2014], INSA de Lyon, tous droits réservés

# CONTROL OF INTRACELLULAR METAL CONCENTRATIONS BY A PERIPLASMIC PROTEIN

M. Gault<sup>1\*</sup>, C. Blériot<sup>2\*</sup>, E. Guéguen<sup>1</sup>, M.-A. Mandrand<sup>1</sup>, A. Rodrigue<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, CNRS-UCB-INSA-BayerCrop Science, Bât. Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois 69 622 Villeurbanne Cedex FRANCE, <sup>2</sup>Institut Pasteur Biology of Infection Unit Inserm U1117 28, rue du Dr Roux 75015 Paris-France

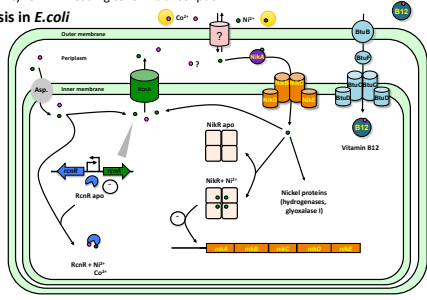
\*contributed equally  
agnes.rodrigue@insa-lyon.fr

Introduction

## The Rcn system in *E. coli*

Ni and Co are essential components of all living cells because they are constitutive of many proteins. However, they become toxic when present in excess. Therefore, the Ni and Co level is tightly regulated. Ni enters in the cytoplasm by the Nik system and Co by the Btu system. The model bacterium *Escherichia coli* possesses a resistance system Rcn, that allows the Ni and Co efflux from the cytoplasm to the periplasm. The Rcn system (Resistance to Cobalt and Nickel) is composed of a membrane protein RcnA, which is the efflux pump. The *rcnA* gene is regulated by the metallo-regulator RcnR. The *rcnR* gene is located upstream of the *rcnA* gene and is divergently transcribed. The RcnR protein binds DNA and represses the *rcn* operon transcription in the absence of metals. When Ni and Co are present in the cell, they bind on RcnR which loses its affinity for DNA leading to *rcnA* transcription.

### Ni and Co homeostasis in *E. coli*



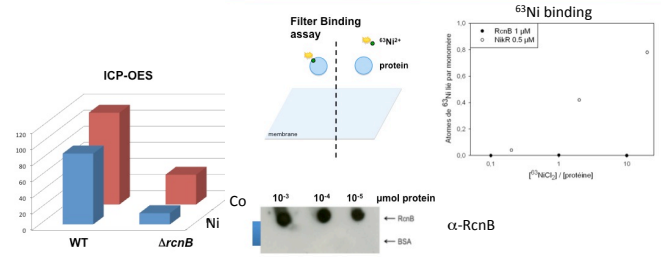
De Pina et al. (1998) J Bacteriol 180, 630-634; Rodrigue et al. (2005) J Bacteriol 187, 2932-2936; Blériot et al. (2005) Mol Microbiol 62, 232-242; Blériot et al. (2011) J Bacteriol 193, 3785-3793

## RcnB controls Ni and Co levels

We have shown recently that a second protein, RcnB, is essential to control Ni and Co intracellular levels in *E. coli*. In contrast to RcnR, RcnB is periplasmic. The mode of action of RcnB is actually unclear, but it does not seem to imply a regulatory event. Still RcnB is thought to act as a modulator of the efflux mediated by the RcnA pump and is required to maintain proper metal homeostasis.

<sup>1</sup> Blériot et al. (2011) J Bacteriol-193:3785-93

### Interactions between RcnB and Ni<sup>2+</sup>

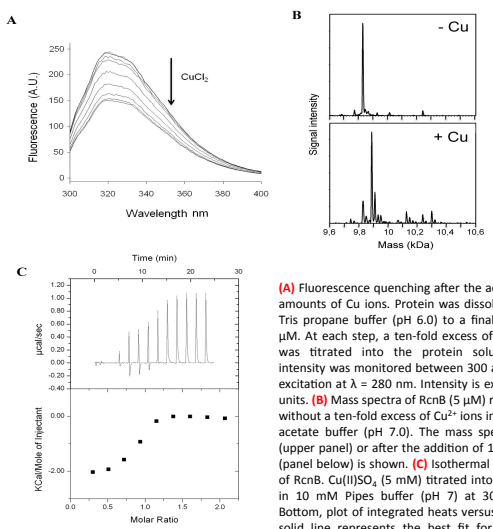


Total amounts of Ni and Co are less important in a *rcnB* mutant strain

No direct binding of Ni<sup>2+</sup> ions by RcnB (K<sub>d</sub> > 100 μM).

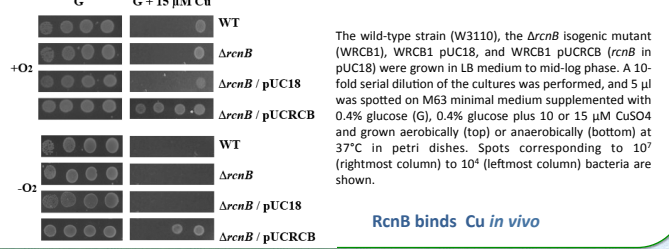
Results

## RcnB is a copper binding protein



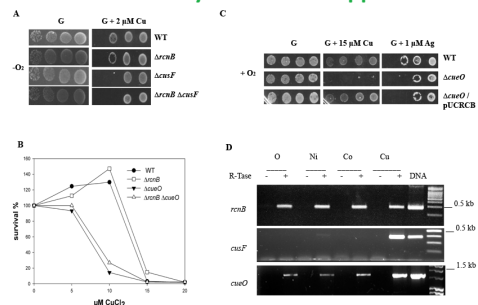
RcnB binds 1 Cu with a micromolar affinity

## Cu binding has a physiological relevance



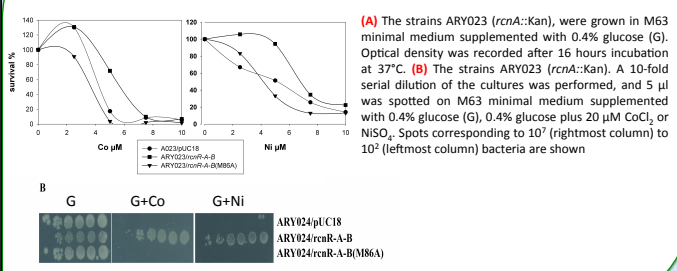
RcnB binds Cu in vivo

## RcnB is not directly involved in copper homeostasis



(A) The wild-type strain (W3110), *ΔrcnB*, *ΔcusF* and *ΔrcnB ΔcusF* isogenic mutants. A 10-fold serial dilution of the cultures was performed, and 5 μl was spotted on M63 minimal medium + 0.4% glucose (G), 0.4% glucose plus 2 μM CuSO<sub>4</sub> and grown anaerobically. Spots corresponding to 10<sup>7</sup> (rightmost column) to 10<sup>4</sup> (leftmost column) bacteria are shown. (B) The strains were grown in M63 minimal medium + 0.4% glucose (G) + increasing amounts of CuSO<sub>4</sub>. O.D. was recorded after 16 hours incubation at 37°C. (C) The strains were grown as in (A) and 5 μl was spotted on M63 minimal medium + 0.4% glucose (G), or 0.4% glucose + 15 μM CuSO<sub>4</sub> or 1 μM Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and grown aerobically. (D). Total RNA was extracted from WT bacteria grown in LB medium alone or supplemented with non-inhibitory amount of NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, or CuSO<sub>4</sub>. RNA were PCR amplified without (RTase -) or with (RTase +) a reverse transcription step. The amplification was done by using specific primers for *rcnB*, *cusF* or *cueO* genes.

## Mutants deficient in Cu binding are deficient in controlling Ni and Co homeostasis



(A) The strains ARY023 (*rcnA::Kan*), were grown in M63 minimal medium supplemented with 0.4% glucose (G). Optical density was recorded after 16 hours incubation at 37°C. (B) The strains ARY023 (*rcnA::Kan*). 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 20 μM CoCl<sub>2</sub> or NiSO<sub>4</sub>. Spots corresponding to 10<sup>7</sup> (rightmost column) to 10<sup>2</sup> (leftmost column) bacteria are shown

Conclusion

The RcnB protein is the periplasmic partner of the RcnA Ni/Co efflux pump. RcnB is required to maintain proper Ni/Co homeostasis but is unable to bind the ions in vivo. Instead we show here that RcnB is able to bind 1 Cu ion with a micromolar affinity *in vitro*. The Cu binding is also evidenced *in vivo* where overexpression of RcnB renders the bacteria more resistant to Cu probably by buffering the Cu pool. Although we show that RcnB is not involved in Cu homeostasis. Finally, we constructed a mutant of *rcnB* leading to M86A substitution. The purified mutant protein was unable to bind Cu *in vitro*. Most interestingly we show that this mutant is unable to fulfill its Ni/Co homeostatic control *in vivo*. Taken together these results suggest that RcnB is a new type of copper-protein and that copper is essential for the function of RcnB.

**Acknowledgements:**  
This work was supported by an ANR grant : Ecotech program, COMBITOX project; and by a BQR grant from INSA Lyon

M. Gault, G. Effantin, E. Gueguen, MA. Mandrand-Berthelot and A. Rodrigue

Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, CNRS-UCB-INSA-BayerCrop Science, Bât. Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois 69 622 Villeurbanne Cedex FRANCE, manon.gault@insa-lyon.fr

## Introduction

Transition metal ions like Ni, Co, Cu, or Fe are required for life. Approximately 50% of bacterial proteins are predicted to be dependent on metal atoms for their structure or their activity, such as electron transfer (1). Conversely, all metal ions are toxic in excess, and their intracellular availability is tightly regulated. Microorganisms have evolved regulatory machineries to acquire, utilize, traffic or detoxify the intracellular and extracellular metal ions that they encounter in their environment (figure 1).

The objective of this work was to depict the principal strategies established by bacteria to adapt to a metallic stress. For that purpose, we carried out a transcriptomic analysis by RNAseq in *Escherichia coli* exposed to a Ni stress.

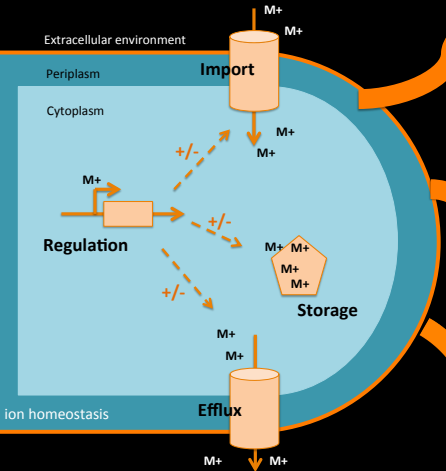


Figure 1: Metal ion homeostasis

## Results

### I - Ni stress deregulates a large amount of genes

In order to better understand the molecular basis of Ni toxicity, we determined the transcription profile of *E. coli* W3110 upon Ni exposure by RNAseq. Bacteria were exposed to Ni (50µM) during the early logarithmic growth phase, for 10 min. RNAs were phenol extracted. Then, directional libraries were sequenced on the Illumina HiSeq2500.

384 differentially expressed genes were identified (FC >4, p-value <0,05). 60% of the genes were down-regulated and 40% were up-regulated. (Figure 2)

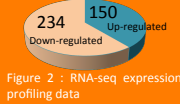


Figure 2 : RNA-seq expression profiling data

The differentially expressed genes were classified according to their GO-biological process. (figure 3)

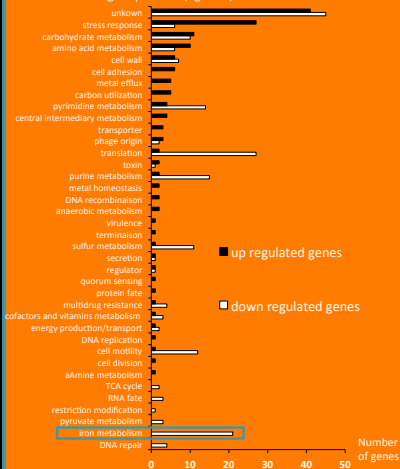


Figure 3 : RNA-Seq data. The differentially expressed genes were classified by their GO-biological process.

Our data show that Ni stress induced genes involved in Fe metabolism and notably that genes encoding Fe import systems were down-regulated. This suggests a link between Fe and Ni homeostasis. This observations raise a question: Can Ni regulate the genes involved in Fe metabolism?

### II - Ni mimics Fe for the regulation of Fur-dependent genes

Genes encoding Fe import systems are regulated by FUR (Ferric Uptake Regulation). Fur acts as a transcriptional repressor switching off expression in case of excess iron (figure 4). *fhuF* is regulated by FUR. We measured the activity of *fhuF-lacZ* and  $\Delta fhuF$  *fhuF-lacZ* transcriptional fusions in the presence of Fe or Ni. Expression of *fhuF* is repressed by Fe and Ni in presence of Fur and is induced in the mutant  $\Delta fhuF$  with Fe and Ni (figure 5).

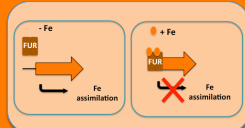


Figure 4: FUR mediated Fe regulation in *E. coli*

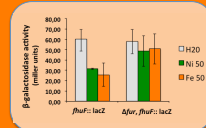


Figure 5: Metal-responsive regulation of *fhuF*

Ni induces the expression of Fe-regulated genes, in the FUR-dependent manner. This data suggests three possibilities:  
 1: Ni acts on Fe assimilation by a direct interaction with Fur?  $\rightarrow$  Ni-FUR interaction *in vitro* but currently is not proved *in vivo*.  
 2: Ni can substitute for native Fe in proteins?  $\rightarrow$  This implies that the Fe intracellular content won't change during a exposure to Ni.  
 3: Ni acts directly on the intracellular Fe homeostasis?  $\rightarrow$  This implies that the Fe intracellular content will change during a exposure to Ni.  
 To deepen these data, we performed intracellular Ni and Fe assays during a nickel stress by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)

### III - Ni stress increase copper and iron contents

*E. coli* W3110 cultures are performed in minimum medium supplemented with H<sub>2</sub>O, Co, Cu, or Ni. Then, cells were harvested, lyophilised and mineralized. At last, metals are quantified by ICP-MS.

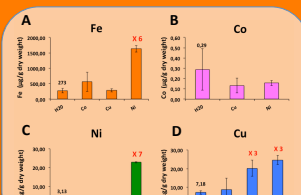


Figure 6: Metals quantification by ICP-MS

These results clearly show that the exposure to Ni increases the Fe and Cu cellular levels. They explain the induction of FUR-controlled genes by Ni. Moreover, as free cytoplasmic Fe or Cu can participate in oxidative Fenton chemistry that generates free radicals capable of damaging proteins and DNA. To test if the increase of intracellular Fe and Ni results in DNA damages, we measured the supercoiling of DNA.

### VI - Ni provokes the relaxation DNA

pUC18 plasmids were isolated from *E. coli* W3110 and separated on an agarose gel containing chloroquine. At this concentration of chloroquine, the most negatively supercoiled DNA is, the farthest it migrates in the gel (figure 6, left). Plasmid topoisomers were analysed by densitometry using image J software (figure 6, right).

Different conditions were tested :

- A) Novobiocin led to the relaxation of plasmid DNA. This drug inhibits the generation of negative supercoils by DNA gyrase (2).
- B) Ni has the same effect as novobiocin. During a Ni stress, DNA is also relaxed.
- C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generates an oxidative stress. It has been shown that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes a transient DNA relaxation (3). Tiron (1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonic acid) is a quencher of superoxide anion (4). Here, we show that tiron counterbalances the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the relaxation of DNA.
- D) In the presence of Fe, the Fenton reaction is possible. This reaction generates some hydroxyl radicals and damages DNA inducing a relaxation. Tiron quenched this effect.
- E) Similarly, tiron blocks the DNA relaxation in the presence of Ni. DNA relaxation induced by Ni is thus due to an oxidative stress, probably through the increase of Fe content.
- F) The other divalent metals like Co have no impact on DNA topoisomers apart Cu that is able to induce a DNA relaxation (data not shown)

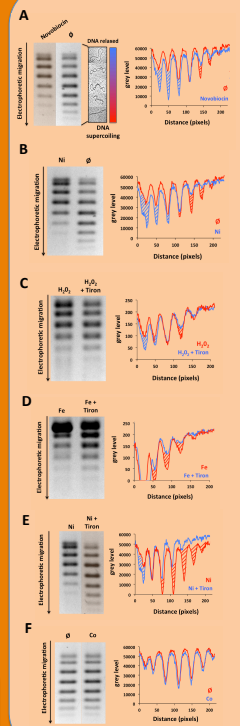


Figure 7: DNA topology analysis by chloroquine gel

In conclusion, we show that a Ni stress causes the indirect generation of ROS that results in the relaxation of DNA.

## Conclusion

The transcriptomics approach by RNAseq used in this study showed that a high quantity of genes were deregulated during an exposure to Ni. Data analysis revealed that the genes involved in Fe acquisition were repressed. We demonstrated that Ni has an impact on the homeostasis of Fe and notably that Ni increases the Fe intracellular content. The same results were observed for Cu. Further work is required to investigate the exact mechanism by which Ni impacts Fe and Cu homeostasis. However, the increase of Fe and Cu levels generates ROS that damage DNA and modify its topology. In response to a metallic stress, the expression of the genome is thus changed, by a global regulatory network involving DNA topology and the RNA polymerase with associated transcription factors. Ni triggers changes in DNA supercoiling that induce large transcriptomic modifications. Taken together, our results unravel the mechanisms by which a Ni stress leads to a massive change in gene expression.

## References

- (1) Waldron, K.J. Robinson, N.J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Rev Microbiol.* 7, 25-35 (2009)
- (2) Maxwell A. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* 5, 102-109 (1997)
- (3) Weinstein-Fisher, D. Elgrably-Weiss M. Altuvia S. *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, Topoisomerase I and Fis. *Mol Microbiol.* 35, 1413-1420 (2000)
- (4) Jung LL, Oh T.J, Kim I.G. Abnormal growth of polyamine deficient *Escherichia coli* mutant is partially caused by oxidative stress-induced damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 418, 125-132 (2003)







## FOLIO ADMINISTRATIF

### THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : GAULT

DATE de SOUTENANCE : 12/12/2014

Prénoms : Manon

**TITRE : L'homéostasie des métaux chez la bactérie *Escherichia coli* : de l'analyse générale d'un stress sur l'expression des gènes, à la compréhension des mécanismes moléculaires.**

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2014ISAL0130

Ecole doctorale : Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)

Spécialité : Microbiologie moléculaire

#### RESUME :

Les métaux sont indispensables à la vie cellulaire car ils sont constitutifs de nombreuses protéines. Les ions nickel, par exemple, font partie intégrante des hydrogénases, enzymes primordiales pour le métabolisme énergétique. Paradoxalement, en excès, les ions métalliques deviennent toxiques pour la cellule. Les bactéries luttent contre cette toxicité en produisant différents systèmes de résistance ou d'adaptation. Les cellules procaryotes peuvent, par exemple, équilibrer les teneurs en ions métalliques en contrôlant leur entrée ou leur efflux grâce à la biogénèse de transporteurs spécifiques. L'objectif de ces travaux de thèse a consisté à comprendre les mécanismes principaux permettant à la bactérie modèle *Escherichia coli* de s'adapter à de fortes variations en ions métalliques, en prenant comme modèle un stress provoqué par un excès d'ions Ni<sup>2+</sup>. Afin d'appréhender l'ensemble de la réponse cellulaire, l'effet de ce stress a été évalué sur l'expression de l'ensemble des gènes d'*E. coli* par des approches de transcriptomique couplées à une validation fonctionnelle.

L'excès d'ions Ni<sup>2+</sup> induit le système d'efflux RcnRAB. En plus de la pompe d'efflux RcnA, ce système comporte une protéine périplasmique, RcnB, qui module le trafic des ions Ni<sup>2+</sup> ou Co<sup>2+</sup> via RcnA. Ces travaux ont montré que RcnB n'interagit pas avec les ions Ni<sup>2+</sup> ou Co<sup>2+</sup> mais de façon inattendue avec les ions Cu<sup>2+</sup>, définissant une nouvelle classe de cupro-protéines. Nous montrons que si RcnB n'intervient pas dans le contrôle de l'homéostasie du Cu, l'interaction avec ces ions est essentielle à sa fonction dans la modulation de l'efflux des ions Ni<sup>2+</sup> et Co<sup>2+</sup>. Ces résultats suggèrent des connexions entre les différents systèmes de maintien des homéostasies métalliques. En effet les résultats d'analyse transcriptomique montrent une forte modulation de l'expression des gènes impliqués dans les homéostasies du Cu et du Fe en présence d'un excès d'ions Ni<sup>2+</sup>, corrélée à une augmentation cellulaire de leur teneur mesurée par spectrométrie plasma. Ces deux métaux sont responsables de la production d'espèces réactives oxygénées entraînant de sérieux dégâts cellulaires, une des cibles privilégiée étant l'ADN. Nous montrons que les ions Ni<sup>2+</sup> ne provoquent pas de cassures de l'ADN et n'ont pas d'effet mutagène, par contre ils provoquent une modification importante de l'état de repliement de l'ADN. Nous proposons que ce relâchement de l'ADN soit dû à l'induction indirecte d'un stress oxydant.

Ces travaux ont également aboutis à l'identification du premier système de transport des ions Ni<sup>2+</sup> à travers la membrane externe chez *E. coli*. Ce système, composé des protéines YddA et YddB, permet le franchissement des deux membranes et s'exprime dans des conditions de micro-aérobiose en milieu minimum proches de conditions de vie de type biofilm. De plus, ces travaux ont montré que l'excès d'ions Ni favorisait la formation d'un biofilm par opposition à un mode de développement planctonique. En effet, lors d'un stress nickel, la synthèse des flagelles est réprimée et la synthèse de structures permettant l'adhérence est activée.

En résumé, un excès d'ions Ni<sup>2+</sup> affecte les systèmes spécifiques d'entrée et d'efflux des ions métalliques troublant les teneurs intracellulaires des autres métaux comme le Cu et le Fe. Ces métaux sont en partie responsables de la production de ROS létaux pour les cellules bactériennes. L'excès de Ni va induire une profonde reprogrammation génétique entraînant des changements physiologiques multifactoriels importants pour la survie bactérienne dans ces conditions de stress.

**MOTS-CLES :** *Escherichia coli*, métaux, homéostasie, résistance, transcriptome, motilité, stress oxydant, topologie de l'ADN.

Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR5240 UCBL-INSA-CNRS-BayerCropSciences  
Campus de la Doua- Bâtiment Lwoff, 10 rue Raphael Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex

Directeur de thèse: Agnès RODRIGUE

Président de jury : William NASSER

Composition du jury : Hilde DE REUSE (Directrice de recherche à l'Institut Pasteur Paris, rapporteur) ;  
Alia DELLAGI, (Maître de conférences, INRA-AgroParisTech Versailles, rapporteur) ;  
William NASSER (Directeur de recherche, CNRS Lyon, examinateur)  
Agnès RODRIGUE (Maître de conférences, INSA Lyon, directrice de thèse)