HAL
open science

Etude de l'activation du système Zra : régulation de l'activation de ZraS par ZraP la protéine accessoire du système

Raleb Taher

To cite this version:

Raleb Taher. Etude de l'activation du système Zra : régulation de l'activation de ZraS par ZraP la protéine accessoire du système. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV032 . tel-02018735

HAL Id: tel-02018735

https://theses.hal.science/tel-02018735

Submitted on 14 Feb 2019

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.

Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie structurale et nanobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

« Raleb TAHER »

Thèse dirigée par **Eve DE ROSNY,**
préparée au sein du **groupe Métalloprotéines de l'Institut de Biologie Structurale** dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude de l'activation du système Zra : régulation de l'activation de ZraS par ZraP la protéine accessoire du système.

Thèse soutenue publiquement le **16 Novembre 2018**
devant le jury composé de :

M. Franck FIESCHI
Professeur, UGA, Institut de Biologie Structurale, Président du jury
Mme Françoise JACOB-DUBUISSON
Directrice de Recherche, Institut Pasteur de Lille, Rapporteur
M. Jean-Michel BETTON
Directeur de Recherche, Institut Pasteur de Paris, Rapporteur
Mme Nadia BENAROUDJ
Chargé de Recherche, Institut Pasteur de Paris, Examinateur
M. Jean-Michel CAMADRO
Directeur de Recherche, Institut Jacques Monod, Examinateur

Remerciements

Je remercie le docteur Françoise JACOB-DUBUISSON et le docteur Jean-Michel BETTON pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie aussi le docteur Nadia BENAROUDJ, les professeurs Jean-Michel CAMADRO et Franck FIESCHI pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Depuis mon arrivée en thèse, j'ai d'abord pu compter sur les membres soudés du groupe Métalloprotéines.

Je voudrais donc commencer par remercier chaleureusement ma directrice de thèse Eve DE ROSNY qui a vraiment fait tout ce qui était en son pouvoir pour allier ses cours à la direction de ma thèse. Je suis vraiment heureux d'avoir eu une encadrante qui m'a autant fait confiance, ce qui m'a permis de développer une certaine créativité pour répondre aux enjeux majeurs de ma thèse. Je tiens aussi à remercier tous les membres du groupe Métallo que j'ai pu rencontrer et qui ont contribué à rendre cette aventure qu'est la thèse toujours plus enrichissante. Je voudrais donc commencer par remercier Juan FONTECILLA-CAMPS ainsi que Yvain NICOLET pour avoir accepté de me recueillir au sein du groupe Métallo. Je me sens extrêmement chanceux d'avoir pu faire ma thèse dans un laboratoire où l'ambiance est si intéressante et stimulante. Par votre accessibilité, votre immense culture scientifique et vos conseils avisés, j'ai pu grandir scientifiquement et aiguiser mon sens de la critique. Je souhaiterais aussi dire un grand merci aux deux maîtresses du laboratoire Lydie (désolé mais je ne peux m'empêcher d'écrire sur les paillasses) et Claudine qui ont toujours été disponibles pour nous aider à naviguer dans cet océan de produits chimiques. Bien-sûr, je remercie toutes mes copines, notamment Claire, Océane, Oriane et récemment Clara, qui maintiennent une joie de vivre impressionnante dans le bureau. Je souhaite aussi dire merci à Mickaël, Xavier et Frank pour les petites remarques assassines mais toujours très drôles et aussi Anne pour me féliciter à chaque anniversaire passé lors de ces trois années. Enfin, je me demande ce que j'aurais bien pu faire de ma thèse sans l'aide et le soutien inconditionnel de Patricia AMARA. Je ne peux que te remercier pour ta gentillesse naturelle qui m'a permis de me sentir comme chez moi au sein de ce groupe. C'est en voyant comment tu te bats pour nous que j'ai réellement compris ce que c'était l'esprit d'équipe au sein d'un laboratoire. En tout cas, je tiens encore sincèrement à te remercier pour toute l'aide que tu m'as procurée.

En trois ans, j'ai aussi fait la rencontre d'un grand nombre d'étudiants et de post-docs très drôles et stimulants lorsque je vagabondais dans les couloirs de l'IBS. Je veux donc remercier de manière exhaustive, Charles, Quentin, Joyce (les membres de la meute), Daniel, Laura, Silvia, Vilius, Marko, Tomás, Sylvain, Orso, Audrey ... J'espère qu'on continuera à se voir dans l'avenir. Ana, tu es certainement la plus belle rencontre de ces trois années de thèse. Merci d'être restée et être devenue plus qu'une amie.

Ne venant pas de la région grenobloise, il m'était absolument nécessaire de revenir en région parisienne au sein de mon cocon de temps en temps. Je veux donc remercier Georges, Arthur, Miquel et Souraya pour avoir toujours été à mes côtés depuis que l'on s'est rencontrés. Votre amitié sans faille a été nécessaire pour m'aider à traverser cette dure aventure qu'est la thèse. Je me dois aussi de remercier Nadia BENAROUDJ pour m'avoir laissé une chance d'effectuer mon premier stage sous sa direction. Tu es la personne qui m'a initié à la recherche et tu continues à m'aider depuis. Merci encore de m'avoir inspiré à faire une thèse (comme tant d'autres après moi) et j'espère que tu seras contente de voir mon évolution depuis que j'ai quitté les biospiro.

Enfin, il me faut aussi remercier mes parents, ma petite-sœur et mon frère pour m'avoir toujours encouragé à poursuivre une carrière qui mènerait à un travail que j'aime et pas seulement pour survivre. Je vous aime tous et je continuerai où que je sois dans le futur.

Je voudrais finir par remercier et dédier ma thèse à ma tante, Salamar SADAGATOULLA, qui est probablement l'une des personnes les plus braves que je connaisse. Je ne peux pas oublier que tu es celle qui a permis à toute notre famille d'arriver en France et qui m'a donc donné l'incroyable chance de vivre et poursuivre mes rêves dans ce beau pays. À chaque fois que je pense à toi, une phrase d'un grand sportif me vient en tête : « *Suffer now, and live the rest of your life as a champion* » car pour nous tu as traversé le monde et je me dois de me souvenir de toi comme d'une championne. Repose en paix.

Liste des abréviations

ATP : Adénosine triphosphate

bEBP : Protéine bactérienne améliorant la liaison à l'ADN

CA : Domaine catalytique liant l'ATP

C-ter : C-terminal

DHp : Domaine de dimérisation et de phosphotransfert par l'histidine

DO_{600} nm : Densité optique à 600 nm

E. coli : *Escherichia coli*

ESR : Système de réponse aux stress d'enveloppe

Fur : *Ferric uptake regulator* (Régulateur de l'acquisition en fer)

HAMP : Histidine kinases, adenylate cyclases, protéine réceptrices de méthyl et phosphatases

HK : Histidine kinase

IMP : Protéines de la membrane interne

LB : Milieu lysogénique MDH

: Malate deshydrogénase

mSPINE : Expérience d'interaction de protéines membranaires marquées d'une étiquette strep

N-ter : N-terminal

OMP : Protéines de la membrane externe

PAR : 4-(2-pyridylazo)resorcinol

PAS : repliement d'un domaine de type Per-Arnt-Sim

PBP : Periplasmic binding protein (Protéine ligand périplasmique)

PDC : repliement d'un domaine semblable à PhoQ-DcuS-CitA

pHc : pH du cytoplasme pHp : pH du périplasme RR :

Régulateur de la réponse

S. enterica : *Salmonella enterica*

TCS : Système à deux composant

Transporteurs ABC : Transporteurs à cassette liant l'ATP

Zur : *Zinc uptake regulator* (Régulateur de l'acquisition en zinc)

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements 1

Liste des abréviations 3

TABLE DES MATIÈRES 4

INTRODUCTION 9

Les stress environnementaux affectant les bactéries 11

1. Les stress bactériens subis lors d'une infection 12

1.a. Le stress osmotique 12

1.b. Le stress thermique 14

1.c. Le stress acide 14

1.d. Le stress métallique 16

2. Les systèmes de réponse aux stress extracytoplasmiques 17

2.a. Les voies σ^E et Psp 18

2.b. Le phosphorelais Rcs 22

2.c. Les systèmes à deux composants BaeSR et CpxAR 23

Mécanisme d'activation d'une histidine kinase 30

1. Détection du signal par le domaine périplasmique d'une histidine kinase 33

1.a. Les domaines senseurs adoptant un repliement PDC 33

1.b. Les domaines senseurs hélicaux 35

1.c. Les domaines senseurs adoptant un repliement PBP 36

1.d. Cas du domaine senseur de CpxA 37

2. Transmission du signal au travers des domaines transmembranaires 39

La gestion du zinc chez les bactéries 42

1. Généralités : Le zinc est important pour la bactérie 43

2. La bataille entre l'hôte et la bactérie pour le contrôle du zinc 45

3. Régulation de la concentration cytoplasmique en zinc 47

4. Les métallochaperons 50

4.a. Les métallochaperons cytoplasmiques 51

4.b. Les métallochaperons périplasmiques 52

État des connaissances sur le système Zra 56

1. Découverte du système Zra 57

2. Description des différents composants du système Zra 58

2.a. Le régulateur transcriptionnel ZraR 58

2.b. Le senseur histidine kinase ZraS 59

2.c. ZraP 60

2.d. Rôle du système Zra 62

MATÉRIELS ET MÉTHODES 66

1. Méthodes de microbiologie 68

1.a. Souches bactériennes, milieux de culture et plasmides 68

1.b. Conditions de culture et de conservation des souches 70

1.c. Stress bactérien en présence de Polymyxine B 70

2. Méthodes de biologie moléculaire 70

2.a. Extraction et purification d'ADN plasmidique 70

2.b. Clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide 71

2.c. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 73

2.d. Transformation des bactéries par de l'ADN plasmidique 74

2.e. Mutagénèse dirigée 75

3. Méthodes de biochimie 76

3.a. Purification de ZraSp-strep et de ces variants 76

3.b. Purification de ZraP et de ces variants 77

3.c. Décontamination en fer de ZraP 78

3.d. Dosage des protéines par la méthode de Bradford 79

3.e. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium 79

3.f. Test d'interaction *in situ* par mSPINE 79

3.g. Test d'interaction *in vitro* entre ZraSp et ZraP 81

3.h. Immunodétection 82

3.i. Rétention de protéine sur résine d'agarose chargée en zinc (Zn-NTA) 83

4. Méthodes de biophysique 83

4.a. Dosage de la quantité de zinc liée à ZraSp 83

4.b. Suivi de la fluorescence de ZraSp par liaison du zinc 84

4.c. Activité de protection de la malate deshydrogénase (MDH) à la dénaturation thermique 85

4.d. Détermination de la température de demi-dénaturation de ZraSp et des variants 85

4.e. Dichroïsme circulaire 86

RÉSULTATS 88

Mise en évidence de l'interaction entre ZraS et ZraP 90

Caractérisation biochimique du domaine périplasmique de ZraS (ZraSp) 98

1. Purification de ZraSp 100

2. Détermination de l'état oligomérique de ZraSp 101

3. Identification des sites de fixation du zinc sur le domaine périplasmique de ZraS 102

4. Identification des résidus impliqués dans la coordination du zinc 104

5. Stabilité thermique de ZraSp et des variants 107

6. Etude du repliement de ZraSp et des variants 108

Effets du zinc sur l'interaction entre ZraS et ZraP 112

1. Effet du Zinc sur l'interaction entre ZraS et ZraP *in situ* 114

2. Interaction entre ZraS et ZraP *in vitro* 117

2.a. Purification de ZraP 117

2.b. Pontages covalents *in vitro* entre ZraSp et ZraP 119

3. Mécanisme d'activation du système Zra 124

3.a. Modification de la fluorescence intrinsèque de ZraSp par le zinc 124

3.b. Influence de la métallation de ZraP sur son interaction avec ZraSp 127

Rôle de la protéine accessoire ZraP 130

1. Activité de chaperon périplasmique de ZraP 132

1.a. ZraP protège la malate déshydrogénase de la dénaturation chimique 132

1.b. Importance des résidus H1 et H4 pour l'activité chaperon 133

2. Activité chaperon de ZraP, *in vivo*, suite à un stress d'enveloppe 136

2.a. Détermination des conditions de stress d'enveloppe 137

2.b. Impact de la surexpression de ZraP lors d'un stress d'enveloppe 138

2.c. Effet régulateur de ZraP sur l'activation du système Zra 139

Essais de cristallisation de ZraSp et ZraP 144

1. Cristallisation de ZraSp 146

1.a. Digestion de l'étiquette strep de ZraSp 146

1.b. Criblage des conditions de cristallisation de ZraSp 147

2. Cristallisation de ZraP 149

DISCUSSION 152

1. Etude structurale de la boucle périplasmique de ZraS 154

1.a. Etat oligomérique de ZraS 154

1.b. Repliement de ZraSp 155

2. Fixation du zinc 156

3. Mécanisme d'activation du système Zra par le zinc 160

3.a. Interactions entre ZraP et ZraS interagissent 160

3.b. La concentration de zinc liée à ZraP affecte l'interaction avec le domaine périplasmique de ZraS 162

3.c. Le système Zra nécessite une régulation fine par ZraP 165

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 171

BIBLIOGRAPHIE 175

INTRODUCTION

Liste des figures de l'introduction :

Figure I. 1 : Schéma de l'enveloppe bactérienne 13

Figure I. 2 : Détection du stress thermique par l'ADN et les protéines bactériennes. 15

Figure I. 3 : Schéma synthétique de la régulation de la transcription par l'ARN polymérase. 18

Figure I. 4 : Exemple de mécanisme d'activation de la voie σ^E. 20

Figure I. 5 : Mécanisme d'activation de la voie Psp par le phage filamenteux f1. 21

Figure I. 6 : Mécanisme d'activation de la voie Rcs. 23

Figure I. 7 : Mécanisme d'activation de la voie Cpx. ..... 26 Figure I. 8 : Domaines composant un senseur histidine kinase de système à deux composants. 30

Figure I. 9 : Structure tridimensionnelle des domaines périplasmiques présentant un repliement de type PDC. 31

Figure I. 10 : Activation de CitA : Mouvement de piston du domaine périplasmique. 33

Figure I. 11 : Structures de domaines périplasmiques n'arborant pas de repliement PDC. 35

Figure I. 12 : Structure de VpCpxAp. 36

Figure I. 13 : Mouvements conduisant à l'activation de l'activité de l'histidine kinase NarQ.38

Figure I. 14 : Représentation schématique des domaines composant ZraS. 39

Figure I. 15 : Distribution relative du zinc parmi les métalloprotéines à zinc chez E. coli. 43

Figure I. 16 : Rôle antibactérien de la calprotectine..... 45

Figure I. 17 : Régulation de la concentration cytoplasmique de zinc. 47

Figure I. 18 : Protéines impliquées dans l'import et l'export du zinc. 48

Figure I. 19 : Exemples de mécanismes impliquant des métallochaperons cytoplasmiques. .. 51

Figure I. 20 : Exemples de mécanismes impliquant des métallochaperons périplasmiques. ... 53

Figure I. 21 : ZraR régule le système à deux composants ZraRS et ZraP. 56

Figure I. 22 : ZraR, un facteur de transcription de la famille des bEBP. 58

Figure I. 23 : Comparaison des structures des potentiels homologues structuraux Spy, CpxP et ZraP. Les codes PDB sont indiqués entre parenthèses. ..... 60 Figure I. 24 : Etat des connaissances sur le système Zra, un probable système de réponse aux stress d'enveloppe. 63

Les stress environnementaux affectant les bactéries

Considérant le fait que les changements environnementaux sont souvent drastiques et très rapides, la survie d'un organisme dépend donc de sa capacité à détecter et répondre à ces modifications. Dans le cas des organismes unicellulaires tels que les bactéries, cette adaptation est nécessaire pour coloniser un milieu, ou même un hôte dans le cas des pathogènes. Pour les bactéries causant des pathogénies d'origine alimentaire comme certaines souches de *Escherichia coli* (*E. coli*), de *Salmonella enterica* (*S. enterica*) ou de *Listeria monocytogenes*, il est nécessaire de s'adapter à la différence d'environnement entre le milieu externe et le milieu interne de l'hôte. Notamment, pour avoir un succès infectieux, ces bactéries doivent pouvoir résister aux conditions de conservation et de transport des aliments avant l'ingestion par l'hôte. Il faudra ensuite que ces bactéries survivent aux systèmes de défense du corps humain comme les acides gastriques (pH 2,5 à 4,5) et les sels biliaires. Les bactéries doivent donc détecter ces rapides changements de conditions et y répondre en adaptant leur expression génique ainsi que leur activité protéique. Identifier les mécanismes qui régissent les changements moléculaires permettant aux bactéries de s'adapter à un hôte et le coloniser est un défi scientifique important.

1. Les stress bactériens subis lors d'une infection

Parmi les stress auxquels les bactéries pathogènes sont exposées, je vais ici détailler l'effet du stress osmotique, du stress thermique, du stress lié à une acidification et au stress métallique. L'enveloppe des bactéries à gram-négatif est composée, d'une membrane interne semi-perméable contenant en particulier des canaux protéiques permettant le transport facilité d'eau, les porines. Cette membrane est entourée, chez beaucoup de bactéries (dont *E. coli*) d'une paroi composée de peptidoglycanes permettant de maintenir la forme de la cellule. Chez les bactéries à gram-négatif ces deux couches sont entourées par une seconde membrane, dite externe, aussi semi perméable et contenant des porines (Figure I. 1). L'espace contenu entre les deux membranes constitue l'espace périplasmique (Meroueh *et al.*, 2006).

1.a. Le stress osmotique

L'enveloppe bactérienne agissant comme une membrane semi-perméable, une différence de concentration de soluté entre le milieu externe et le cytoplasme sera équilibrée par osmose. Ce phénomène intervient par diffusion du solvant depuis le milieu le moins concentré en soluté vers le milieu le plus concentré. L'intégrité de la cellule et de ses

compartiments dépend donc de l'équilibre des concentrations de soluté entre le milieu externe et les compartiments bactériens c'est-à-dire le cytoplasme et le périplasme. Un choc osmotique se produit donc lorsqu'il y a une modification soudaine de la concentration en soluté de l'environnement. Une concentration trop grande en soluté causera une sortie massive d'eau qui entrainera un phénomène de plasmolyse (perte d'eau cytoplasmique). Au contraire, une trop faible concentration en soluté dans le milieu externe causera un fort influx d'eau dans la cellule qui augmentera la pression intracellulaire entrainant une lyse cellulaire (Csonka, 1989). Les mécanismes osmoadaptatifs bactériens passent donc par l'accumulation ou le relargage de solutés en fonction du stress osmotique subi ou alors par une atténuation des flux d'eau à travers l'enveloppe bactérienne (Wood, 2015). La réhydratation des cellules peut se faire par accumulation de potassium dans le cytoplasme cette accumulation est médiée par l'activité proton motrice du symporteur (transporteur membranaire permettant le mouvement dans le même sens de plusieurs molécules) Trk (Binepal *et al.*, 2016) ou par le transport actif effectué par des ATPase (transporteur permettant le transport actif par hydrolyse d'ATP de molécules à travers la membrane interne) comme le transporteur Kdp (Greie, 2011). L'accumulation de potassium dans la cellule va « forcer » l'entrée d'eau dans la cellule par osmose. Toutefois, cette réhydratation par le potassium est délétère pour la croissance bactérienne. Un autre moyen de réhydrater la cellule sans affecter la croissance bactérienne passe par la synthèse et l'accumulation d'osmolytes comme le glutamate, la bétaine, le tréhalose etc… (Rahman *et al.*, 2018). À l'inverse, les mécanismes actifs mis en place lors d'un choc hyper-osmotique nécessitent l'export de ces osmolytes (Wood, 2015).

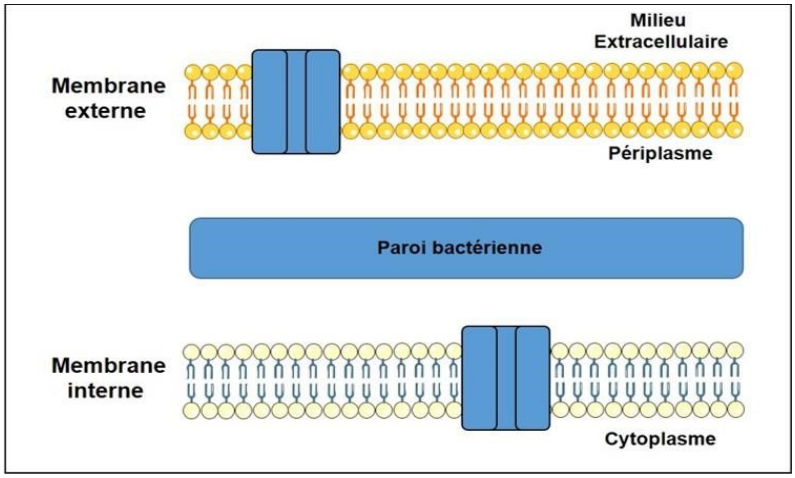


Figure I. 1 : Schéma de l'enveloppe bactérienne

Représentation de l'enveloppe bactérienne composée de deux membranes et de la paroi du peptidoglycane. Les protéines représentées dans la membrane interne (IMP) et externe (OMP) sont des porines.

1.b. Le stress thermique

La capacité de détecter les changements de température est partagée par tous les organismes. Pour les bactéries, l'augmentation de la temperature du milieu peut être le signe d'une infection réussie. En effet, l'augmentation de la température corporelle lors d'une fièvre causée par une infection bactérienne est un signal pour les bactéries permettant de savoir quand exprimer certains facteurs de virulence (Konkel & Tilly, 2000). La détection de ces variations de température dans les bactéries peut être réalisée par différents types de macromolécules organiques. Par exemple, les modifications de l'ADN peuvent être un bon senseur de la modification de la température de l'environnement bactérien. Dans la cellule, l'ADN est sous forme compacte surenroulée. L'augmentation de la température externe va causer une relaxation de ce surenroulement permettant d'augmenter l'expression de protéines de réponse au choc thermique. Il est à noter que la diminution de la température (un choc froid) va au contraire accentuer le surenroulement de l'ADN ce qui empêchera toute expression de protéines du choc thermique (Figure I. 2 A). De même, la modification conformationnelle de protéines par la température peut permettre la régulation du stress thermique. Par exemple, chez *Salmonella enterica*, l'augmentation de la température cause un changement de conformation du répresseur TlpA (Hurme *et al.*, 1997). Ainsi, TlpA se dissocie de l'ADN et la transcription des gènes de réponses au stress thermique est possible (Figure I. 2 B). D'autres macromolécules permettent aussi de détecter un changement de température comme les lipides ou l'ARN (Shapiro & Cowen, 2012).

1.c. Le stress acide

Les entérobactéries comme *E. coli* colonisent le tractus gastro-intestinal. Pour atteindre l'intestin il leur est d'abord nécessaire de survivre aux conditions physico-chimiques très acides de l'estomac. Ces conditions acides vont d'abord modifier l'état de protonation des macromolécules comme les protéines, l'ADN et les lipides. Pour *E. coli*, la limitation du flux de protons passe d'abord par une réduction de la fluidité membranaire (Shabala & Ross, 2008).

L'exposition à un acide fort a aussi pour effet de modifier la force proton motrice au niveau des différents compartiments cellulaires. Il faut savoir que le pH cytoplasmique (pHc) dans la cellule est très précisément régulé et *chez E. coli* ; en fonction du pH dans lequel les bactéries sont cultivées, le pHc est compris entre 7,2 et 7,8 (Lund *et al.*, 2014; De Biase & Lund, 2015). Lorsque les bactéries sont exposées à un acide fort (pH 2,5 à 4,5), une nette diminution du pHc à lieu (jusqu'à pH 5) mais les pompes à efflux permettent de rééquilibrer rapidement le pH jusqu' 7,2. La membrane externe étant perméable mais non la membrane interne, il y a une différence de pH importante entre le pH périplasmique (pHp) et le pHc. Ces conditions acides causent l'activation de décarboxylases cytoplasmiques, impliquées dans le recyclage de d'acides aminés (Glu, Gln, Arg, Lys) et qui vont donc consommer des protons ce qui aura pour effet d'équilibrer le pHc. Le pH optimum de ces décarboxylases étant très bas, elles ne fonctionnent qu'en cas de stress acide.

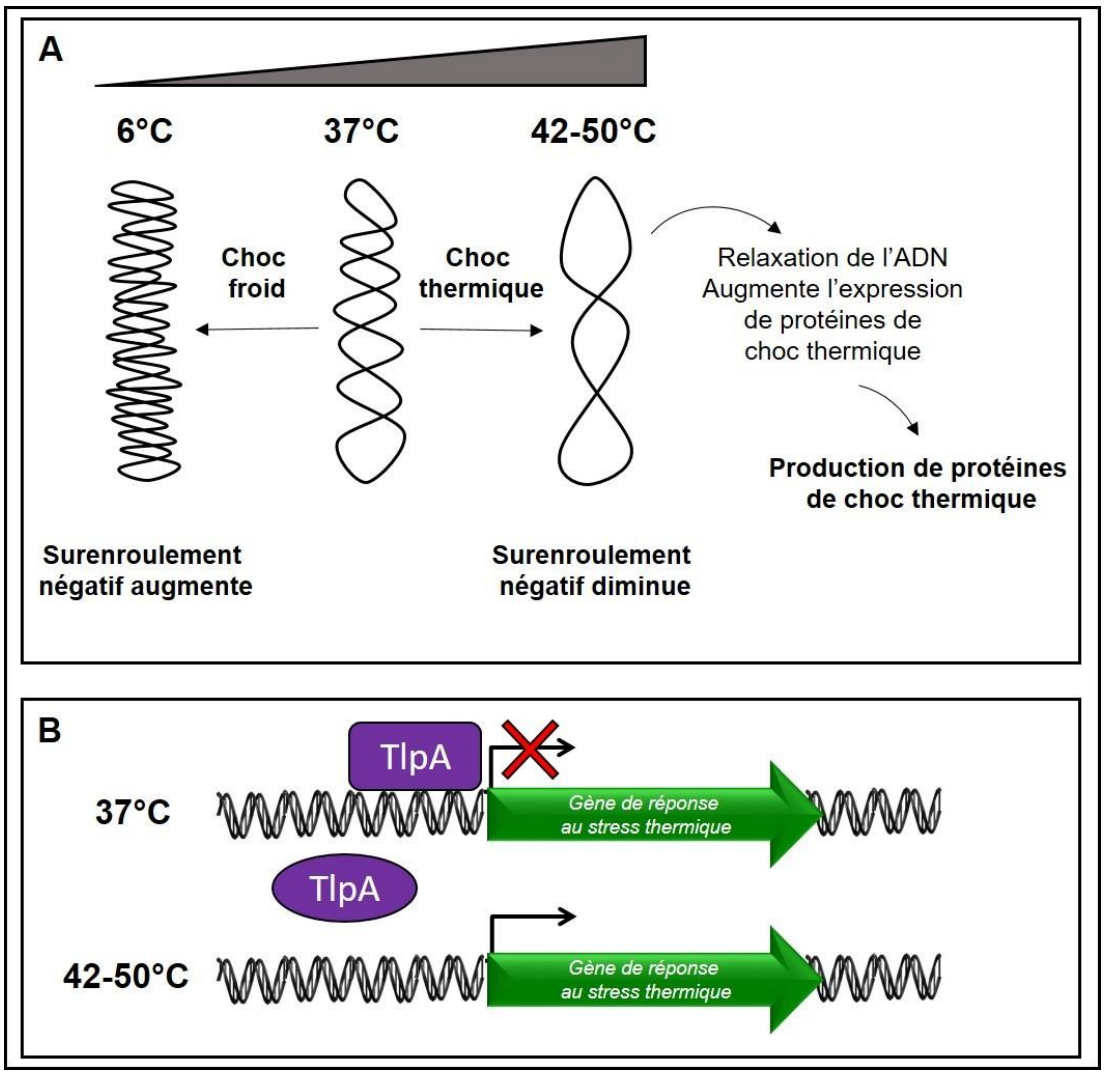


Figure I. 2 : Détection du stress thermique par l'ADN et les protéines bactériennes.

Représentation schématique de la modification du surenroulement de l'ADN bactérien par la température (A). Régulation différentielle des gènes de réponse au stress thermique par la modification conformationnelle de TlpA causée par l'augmentation de la température (B).

1.d. Le stress métallique

Une fois arrivées dans l'intestin les entérobactéries pathogènes doivent se multiplier, mais les nutriments (matières organiques et métaux) nécessaires à cette multiplication sont séquestrés par les cellules du système immunitaire de l'hôte ou convoités par les bactéries commensales de l'intestin (formant le microbiote intestinal). Les métaux, tels que le fer, sont importants pour la bactérie car ce sont des cofacteurs de protéines impliquées dans divers processus allant du métabolisme à la réplication de l'ADN (Becker & Skaar, 2014). De ce fait, le développement de systèmes d'acquisition de métaux, comme les sidérophores, est essentiel à la croissance bactérienne. Un des moyens que le système immunitaire possède pour limiter ou empêcher ce phénomène est de sécréter des protéines qui lient les sidérophores, comme les lipocalines (Fischbach *et al.*, 2006). Mais, ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques aux sidérophores de bactéries pathogènes et ils affectent aussi ceux des commensales. Certains pathogènes tels que *Salmonella enterica* ont développé des sidérophores « améliorés » qui sont plus efficaces et non reconnus par les inhibiteurs du système immunitaire (Crosa & Walsh, 2002). Ils ne sont donc pas affectés par cette limitation en ions métalliques et ont, de surcroît, moins de concurrents. Il est à noter que les bactéries pathogènes peuvent subir un excès de zinc par les cellules de l'immunité innée que sont les macrophages. En effet, suite à la phagocytose des bactéries, il se forme une vésicule dans les macrophages, le phagolysosome qui permet la dégradation de ces bactéries (Stafford *et al.*, 2013). Le zinc, lorsqu'il est accumulé dans la bactérie, prend la place d'autres ions métalliques dans les enzymes et les empêchent de fonctionner. Le succès d'un pathogène dépend donc de sa capacité à détecter et répondre de manière adéquate aux différents stress subis lors de l'infection. Un équilibre entre la carence et l'excès de zinc est notamment important pour une croissance bactérienne optimale.

La réponse majeure à tous ces stress se fait par la régulation (positive ou négative) de l'expression de gènes de réponse spécifique à ces stress. Cela est majoritairement effectué par la régulation de l'ARN polymérase bactérienne qui va transcrire les gènes de réponse aux stress.

2. Les systèmes de réponse aux stress extracytoplasmiques

Les réponses aux stress d'enveloppe chez les bactéries à gram négatif sont majoritairement effectuées par cinq voies de signalisation qui forment les *envelope stress response systems* (ESR). Ce groupe est composé des voies σ^E, *Phage shock proteins* (Psp), *Regulator of colanic acid capsule synthesis* (Rcs), *Conjugative plasmid expression* (Cpx) et *Bacterial adaptative response* (Bae). Les voies σ^E et Psp sont des voies de signalisation régulées *via* la séquestration et le relargage de facteurs de transcription en réponse à des stimuli spécifiques. Le phosphorelais Rcs participe aussi à la réponse au stress extracytoplasmique. L'activation de ce système mène à une cascade de phosphorylation de plusieurs protéines membranaires causant l'activation de facteurs de transcription. Enfin, les voies Bae et Cpx sont des systèmes à deux composantes détectant des stress extracytoplasmiques spécifiques dont l'activation aboutit à la phosphorylation de facteurs de transcription (Bury-Moné *et al.*, 2009).
Le mécanisme de ces différentes voies va être détaillé ci-après.

Le choix des gènes exprimés ou non et le moment de l'expression dépend des différents moyens de réguler l'activité de l'ARN polymérase. Cette enzyme se compose de cinq sousunités (α2, β, β' et ω) formant l'enzyme core (Murakami, 2015). Les facteurs σ sont des sousunités qui s'associent à cette enzyme core pour former l'ARN polymérase holoenzyme, ce qui permet la transcription de gènes spécifiques. La transcription de gènes de réponse aux stress dépend donc en premier lieu des facteurs σ associés à l'enzyme core (Mooney & Landick,
1999), l'ARN polymérase peut également être recrutée pour la transcription d'un gène particulier par des facteurs de transcriptions. Certains se fixent à l'holoenzyme par interaction avec le facteur σ et la transcription du gène est initiée (Lee *et al.*, 1974). Enfin, il existe des répresseurs de la transcription. Ces protéines se fixent généralement en amont d'un gène et empêchent physiquement la transcription par l'ARN polymérase holoenzyme (Eron & Block, 1971). La transcription dépend toujours de facteurs σ notamment σ^{70}.

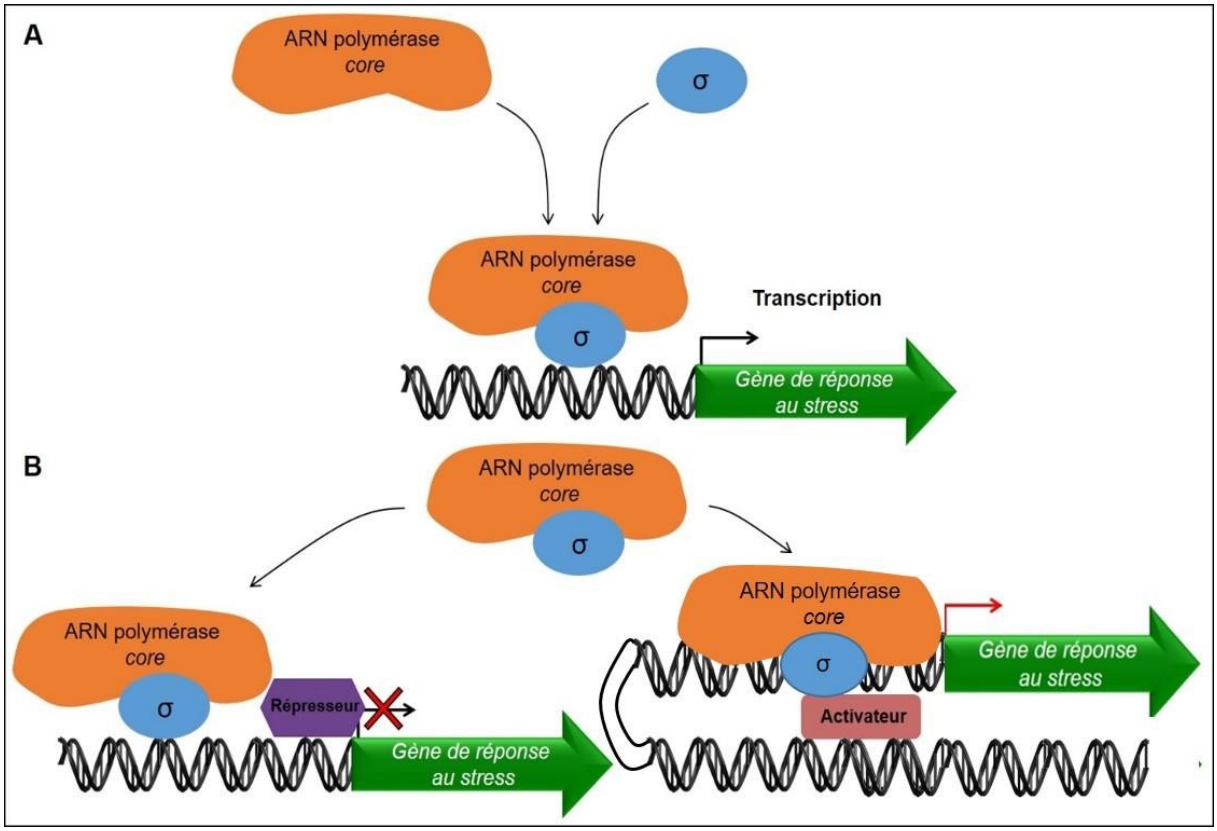


Figure I. 3 : Schéma synthétique de la régulation de la transcription par l'ARN polymérase.

Les facteurs sigma s'associent avec l'ARN polymérase core pour permettre une reconnaissance spécifique des promoteurs des gènes et donc une transcription spécifique (A). La transcription par l'ARN polymérase holoenzyme spécifique d'un gène peut être inhibée par la présence d'un répresseur lié à la région promotrice d'un gène cible (B à gauche). Il peut aussi y avoir un accroissement de la transcription suite au recrutement de l'ARN polymérase holoenzyme par un activateur (B à droite).

2.a. Les voies σ^E et Psp

Chez les bactéries, les facteurs σ sont composés de deux familles structurellement différentes, le σ^{54} et le σ^{70}. Les facteurs σ^{54} (aussi appelés σ^N ou RpoN) régulent le métabolisme du nitrogène mais aussi une série de processus métaboliques (Merrick, 1993; Buck *et al.*, 2000). Les facteurs σ^{70} comprennent quatre groupes structurellement semblables (au niveau de la séquence d'acides aminés et de la structure tertiaire). Le premier groupe contient les facteurs σ^{70} régulant les gènes de ménage c'est-à-dire les gènes essentiels liés à la croissance et au métabolisme bactérien (Boor, 2006). Les autres groupes contiennent des

facteurs σ^{70} dits alternatifs qui régulent des processus physiologiques spécifiques tels que la sporulation (Paget & Helmann, 2003). Les facteurs σ^{70} qui contribuent spécifiquement à la réponse aux stress extra cytoplasmiques sont appelés *ExtraCytoplasmic sigma Factor* (ECF) ou alors σ^{E} (Boor, 2006).

Chez *E. coli*, ce sont des facteur σ^{E} qui régulent des gènes impliqués dans la réponse au stress d'enveloppe (régulon σ^{E}). L'expression de ces gènes mène à la synthèse de protéines impliquées dans le repliement ou la dégradation des protéines d'enveloppe, comme la protéase/chaperon DegP qui va dégrader les protéines mal repliées. Les pepidyl-prolyl isomérases (*surA*), les protéines chaperons, (*fkpA* et skp) et les thiol-disulfide oxydoréductases (*dsbC*) font aussi parti du régulon σE et permettent le bon repliement des protéines lors du stress thermique (Dartigalongue *et al.*, 2001; Rezuchova *et al.*, 2003; Bury-Moné *et al.*, 2009). Le mécanisme d'activation de la voie σ^{E} implique une cascade de réactions, opérée par les protéases DegS et RseP, qui mènera à la protéolyse du facteur anti-σ RseA qui séquestre σ^{E} au niveau de la membrane interne (Figure I. 4 : Mécanisme d'activation de la voie σ^{E}.).

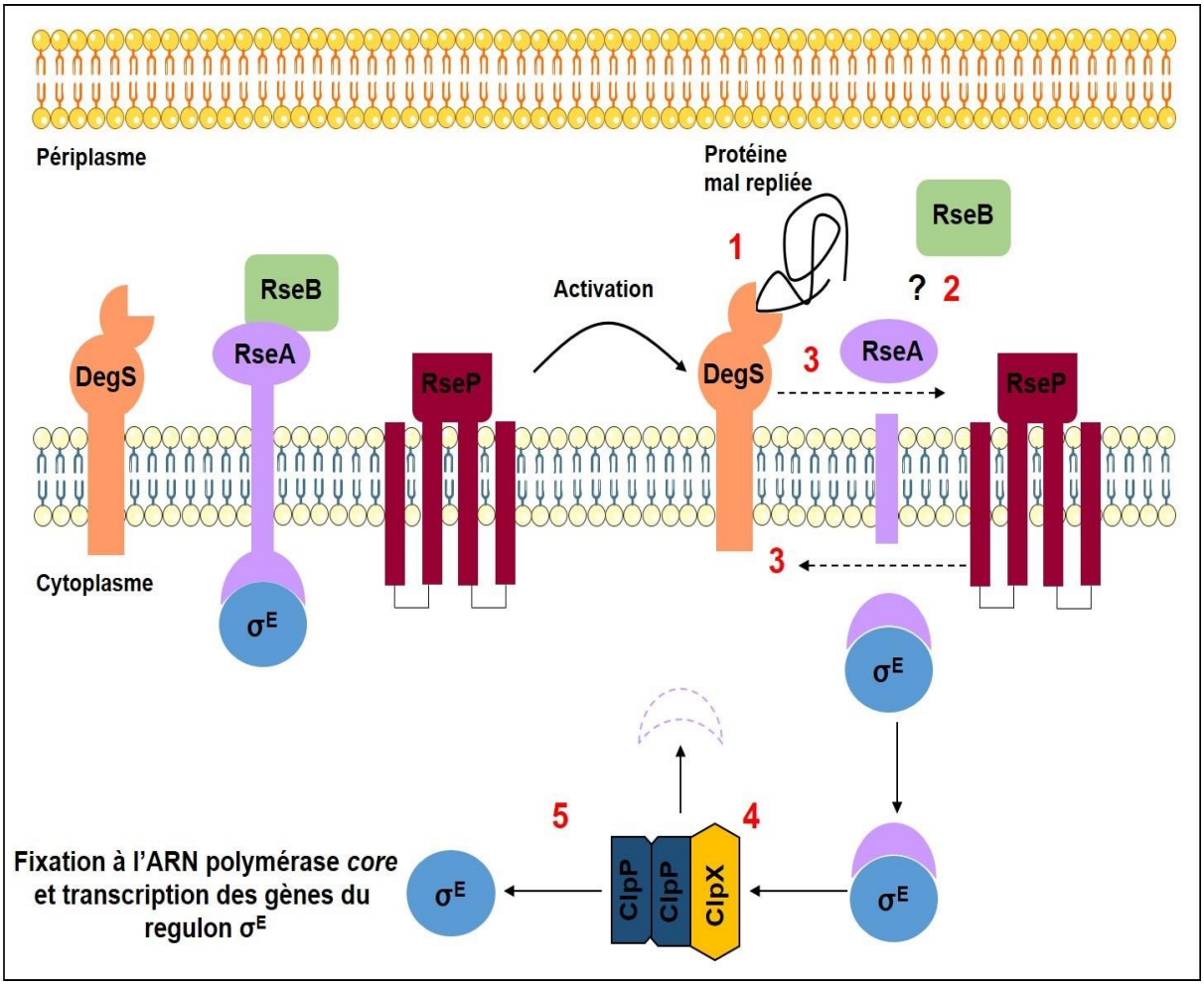


Figure I. 4 : Exemple de mécanisme d'activation de la voie σ^E.

Sans stress thermique affectant l'enveloppe bactérienne, la protéine RseB inhibe la protéolyse de RseA et il n'y a pas de cascade protéolytique (gauche). Suite à un stress thermique, il y a une accumulation d'OMP (Outer membrane proteins) mal repliées dans le périplasme qui vont se lier au domaine de reconnaissance de DegS (1). Par un mécanisme inconnu à ce jour, RseB n'inhibe plus RseA (2) il y a alors un clivage du domaine périplasmique de RseA par DegS et du domaine cytoplasmique par RseP, conduisant à la libération du complexe RseA cytoplasmique-σ^E dans le cytoplasme (3). Ce complexe est ensuite pris en charge par la protéase ClpXP qui va dégrader spécifiquement le domaine cytoplasmique de RseA en peptides (4) pour relarguer σ^E qui va pouvoir interagir avec l'ARN polymérase core et induire la réponse aux stress extra cytoplasmique.

L'autre principal système de réponse aux stress d'enveloppe qui implique la séquestration d'un facteur de transcription est la voie *phage shock protein* (Psp). La voie Psp a été découverte en 1990 (Brissette *et al.*, 1990) et doit son nom à l'accumulation de la protéine PspA suite à l'infection de *E. coli* par le phage filamenteux f1. Il a ensuite été montré que l'activation de ce système n'était en fait pas spécifique à la pénétration phagique mais à la

perturbation de la membrane interne bactérienne et du maintien de la force proton motrice par divers stress

(Flores-Kim & Darwin, 2016). Le mécanisme d'activation de ce système implique les senseurs membranaires PspB et PspC ainsi que deux protéines cytoplasmiques impliquées dans l'activation et l'inhibition de ce système PspF et PspA (Mécanisme expliqué en légende de la Figure I. 5.).

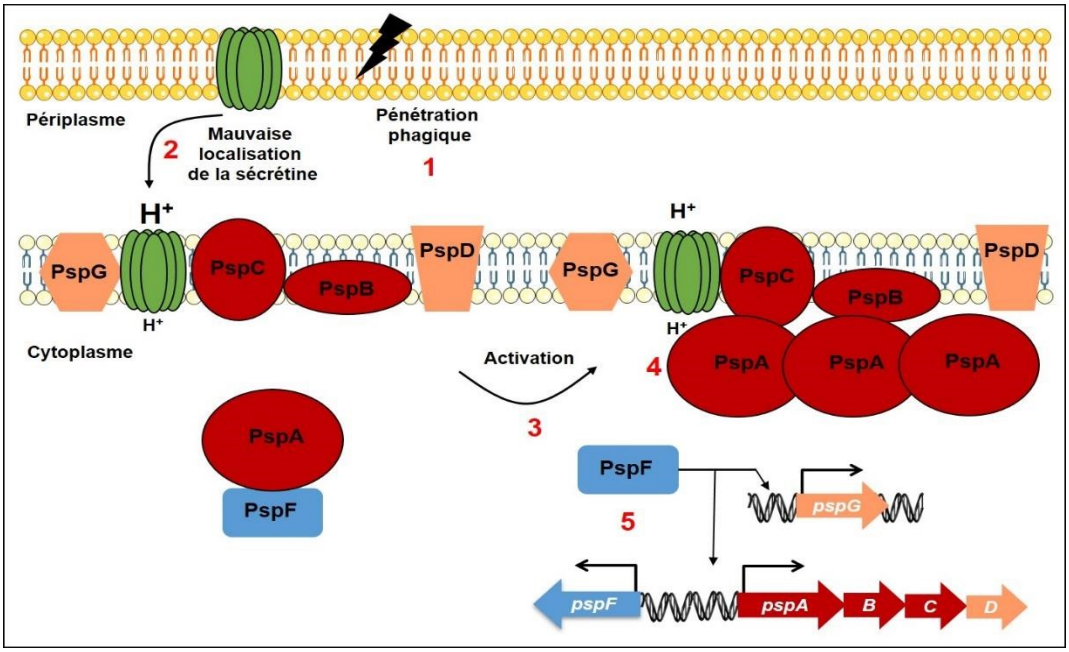


Figure I. 5 : Mécanisme d'activation de la voie Psp par le phage filamenteux f1.

Suite au stress causé par une pénétration phagique (1), la protéine sécrétine de la bactérie, localisée dans l'OMP va s'enchâsser dans l'IMP (2) et perturber la force proton-motrice. Cette perturbation serait détectée par les protéines PspB et PspC (3) qui vont recruter la protéine PspA au niveau de la membrane interne (4), relâchant le facteur PspF dans le cytoplasme. Ainsi, PspF peut se lier à l'ADN et promouvoir la transcription des gènes de l'opéron Psp (5). Les complexes composés de PspABC permettraient de diminuer la force proton-motrice au niveau de la membrane interne. Le rôle des protéines PspG et PspD dans la régulation de l'activité du système Psp n'as pas encore été expliqué.

PspF est un activateur dit σ^{54} dépendant c'est-à-dire qu'il permet de recruter l'ARN polymérase holoenzyme contenant le facteur σ^{54}. En effet, le complexe de l'ARN polymérase-σ^{54} nécessite toujours l'association d'un facteur de transcription appelé *bacterial enhancer binding protein* (bEBP) pour pouvoir initier la transcription.

2.b. Le phosphorelais Rcs

Parmi les cinq principaux systèmes de réponse aux stress d'enveloppe, on distingue, la voie Rcs qui implique de multiples phosphorylations (phosphorelais). Cette voie permettant la transmission du signal d'un stress extracytoplasmique vers le cytoplasme. Cette voie a d'abord été décrite pour son implication dans la synthèse de l'acide colanique un composant la capsule bactérienne de *E. coli* K-12 (Gottesman *et al.*, 1985). Il a été montré depuis que ce phosphorelais est activé par différents troubles impliquant les protéines de la membrane externe et par des défauts d'assemblage du peptidoglycane (Wall *et al.*, 2018).

L'activation de la voie Rcs est complexe et met en jeu un grand nombre de protéines. La détection du signal et l'activation sont dues respectivement à la lipoprotéine de la membrane externe RcsF et à la protéine de la membrane interne IgaA. Le phosphorelais est essentiellement effectué par les protéines de la membrane interne RcsC et RcsD. Enfin, la régulation de la transcription implique deux régulateurs transcriptionnels, RcsA et RcsB (le mécanisme d'activation de la voie Rcs est expliqué dans la légende de la Figure I. 6). L'activation de la voie Rcs induit l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des structures de la surface cellulaire tels que les flagelles, qui permettent la motilité des bactéries, le lipopolysaccharide

(facteur de virulence bactérien) ou encore les fimbriae qui permettent l'adhérence bactérienne (Clarke, 2010). L'activation de la voie Rcs mène à la régulation de l'expression génique par les facteurs de transcription RcsB ou RcsB et RcsA. Chez *E. coli*, les gènes régulés par l'homodimère de RcsB sont nécessaires à la division cellulaire (*ftsAZ*) mais aussi impliqués dans la protection contre les chocs osmotiques (*osmC* et *osmB*). Les gènes régulés par RcsB et RcsA (dits RcsA dépendants) sont liés à la synthèse des flagelles (*flhDC*) affectant la motilité, mais aussi à la formation des biofilms. En effet, parmi les gènes dépendants de RcsA, on retrouve l'opéron *yjbEFGH* qui permet la synthèse d'exopolysaccharides qui constitue la matrice formant les biofilms bactériens, et les gènes codant pour les curli (*csgBA* et *csgDEFG*) qui sont des fibres permettant l'adhésion à des surfaces et donc qui sont impliqués dans la biogénèse de biofilms (Clarke, 2010). Cette voie étant très importante pour l'assemblage et le maintien des édifices extracellulaires de la bactérie, il a été montré que l'activation de la voie Rcs améliore la survie cellulaire suite à un traitement antibiotique. Cela a aussi été observé pour deux autres systèmes de réponse aux stress d'enveloppe, la voie σ^E et le système à deux composantes (TCS) Cpx (Laubacher & Ades, 2008).

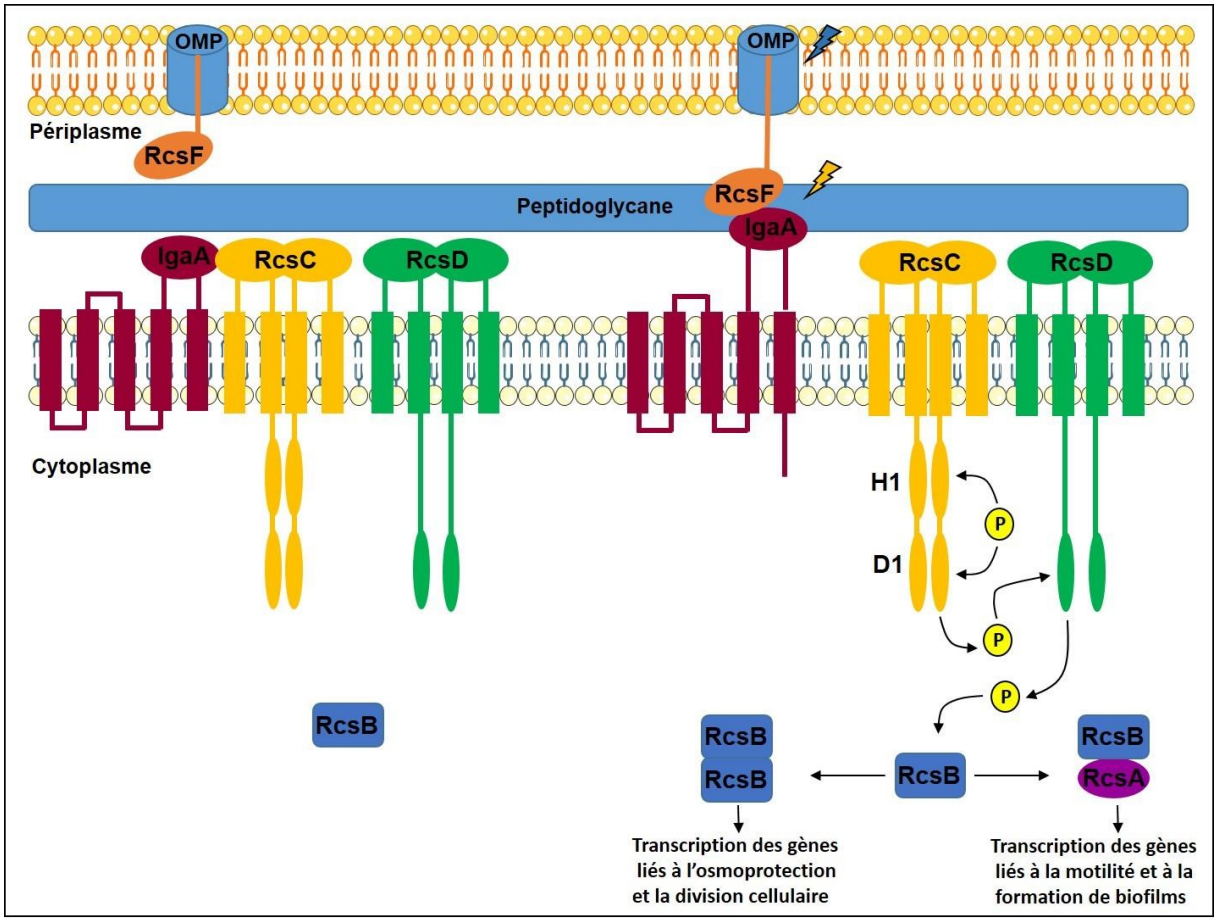


Figure I. 6 : Mécanisme d'activation de la voie Rcs.

Lorsque le système Rcs est au repos, la protéine de la membrane interne IgaA inhibe les histidine-kinases RcsC et RcsD. Suite à un stress affectant les OMP (éclair bleu) ou le peptidoglycane (éclair jaune) la lipoprotéine RcsF va lever l'inhibition de IgaA sur RcsC et la cascade de phosphorylation peut avoir lieu. La kinase RcsC s'autophosphoryle sur un résidu histidine de son domaine H1, transfère ce phosphate d'abord sur un résidu aspartate du domaine D1 puis sur le domaine HPt de RcsD. Ce phosphate est ensuite transféré par RcsD sur le domaine receveur de RcsB. Une fois activée, RcsB s'homodimérise ou alors forme un complexe avec RcsA avant d'activer la transcription de gènes en fonction du stress détecté par RcsF.

2.c. Les systèmes à deux composants BaeSR et CpxAR

Les systèmes à deux composants (TCS) sont un des principaux moyens de transduction de signal à travers la membrane interne des bactéries vers le cytoplasme. Ces systèmes impliquent deux protéines *à minima* et permettent la détection de changement dans l'environnement, causant un stress bactérien, et la transmission d'un signal depuis le périplasme vers le cytoplasme. Par définition, un système à deux composante est constitué d'une protéine de la membrane interne possédant une activité histidine kinase (HK) et d'un

régulateur de la réponse transcriptionnelle (RR) cytoplasmique (Parkinson, 1993). Chez *E. coli*, vingt-neuf histidine kinases et trente-deux régulateurs de la réponse transcriptionnelle sont prédits

(www.p2cs.org). Les histidine kinases senseurs sont généralement composées d'un domaine périplasmique senseur entouré par deux domaines transmembranaires en N-terminal (N-ter) et d'un domaine cytoplasmique, en C-terminal (C-ter), permettant les transferts de phosphate. Les protéines régulatrices de la réponse transcriptionnelle sont composées d'un domaine receveur de groupements phosphate et d'un domaine de fixation à l'ADN. Suite à la détection du signal par le domaine périplasmique de l'histidine kinase, le domaine cytoplasmique de la protéine s'autophosphoryle (par son activité kinase) avant de transférer ce phosphate (par son activité phosphatase) vers le régulateur transcriptionnel. Une fois activé, le régulateur de la réponse transcriptionnelle va se lier à l'ADN pour permettre l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase holoenzyme (Bourret & Silversmith, 2010). Le mécanisme des histidine kinase sera développé plus loin dans l'introduction.

Le système Bae :

Parmi les cinq principaux systèmes de réponse aux stress d'enveloppe, il y a deux systèmes à deux composants, les systèmes BaeSR et CpxARP. La voie Bae est l'une des moins détaillée dans la littérature. Ce système à deux composants a été découvert pour son implication dans la régulation de l'expression de pompes d'efflux impliquées dans la résistance à un antibiotique, la novobiocine (Baranova & Nikaido, 2002). Ce système est principalement activé par la présence d'indole (Hirakawa *et al.*, 2004), de zinc et de cuivre (Nishino *et al.*, 2007). Le régulon contrôlé par le système Bae contient peu de gènes, dont font partie *baeS* et *baeR*.

L'activation du système Bae permet notamment l'expression des gènes *mdtABCD* et *tolC*, codant pour des pompes d'efflux impliquées dans la résistance à des biocides (Nagakubo *et al.*, 2002). Il active aussi *spy*, qui code pour une protéine chaperon périplasmique impliqué dans le repliement des protéines malformées suite à une stress d'enveloppe (Quan *et al.*, 2011). Ce système est un archétype de système à deux composants étant donné qu'il est composé de BaeS l'histidine kinase transmembranaire qui va détecter le signal dans le périplasme, puis s'autophosphoryler avant de transférer ce phosphate sur BaeR qui pourra se fixer à l'ADN et permettre la transcription du régulon.

Ce système est important car il régule spécifiquement des pompes à efflux qui servent massivement à la protection des bactéries lors de l'exposition à des traitements antibiotiques. En effet, ce type de pompes, malgré leur coût énergétique, est le moyen le plus efficace pour la bactérie de se détoxifier rapidement d'un antibiotique en l'excrétant (Horiyama & Nishino, 2014). Le système Bae est le seul système permettant à la bactérie d'éviter les dommages causés par certains antibiotiques (Nagakubo *et al.*, 2002). Toutefois, le lien entre la réponse au stress antibiotique et les signaux activateurs du système Bae (indole, zinc et cuivre) n'est pas encore compris sauf dans le cas de la ciprofloxacine (Guerrero *et al.*, 2012).

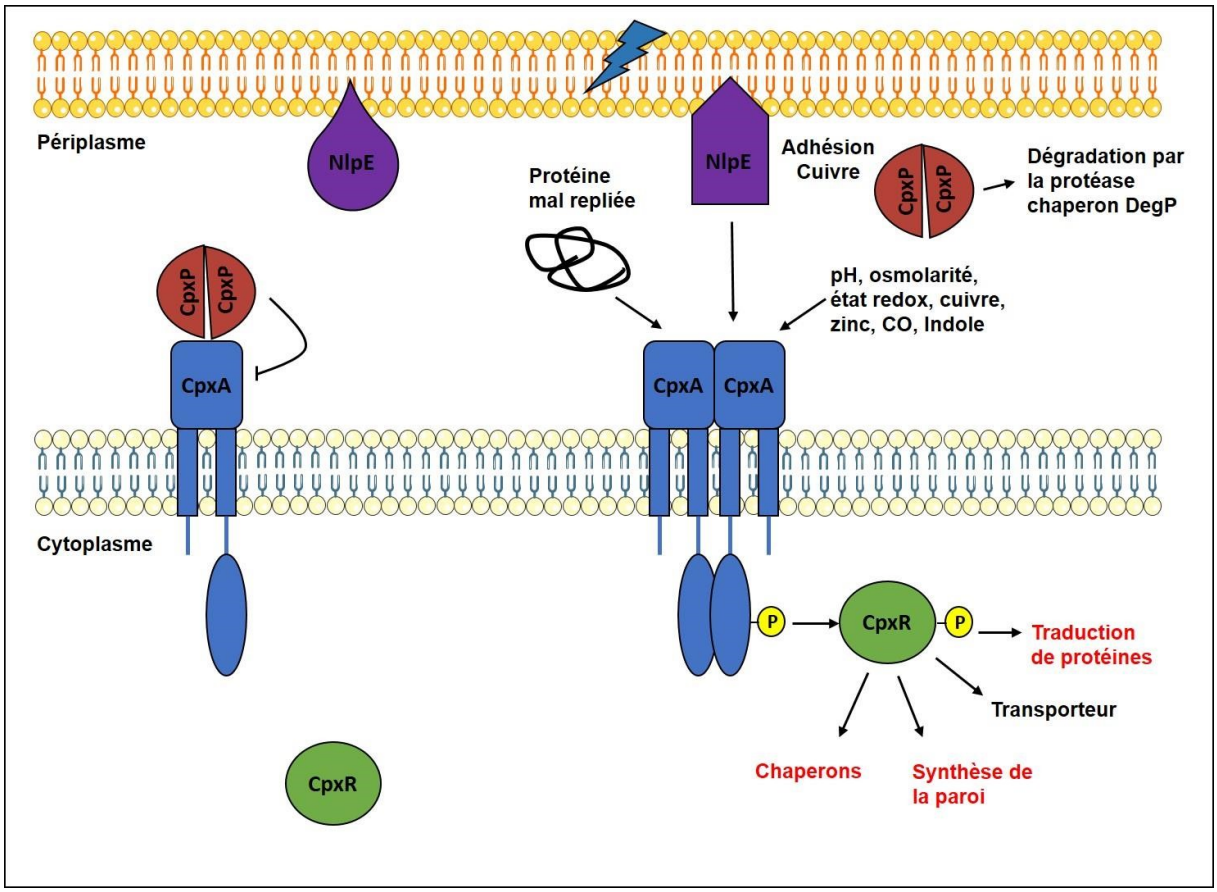
La voie Cpx maintient l'intégrité de l'enveloppe bactérienne :

Contrairement au système BaeSR, le système Cpx a été extensivement étudié depuis le début des années 80. À l'origine, son implication dans le transfert d'ADN lors des évènements de conjugaison entre deux bactéries a été démontrée, en effet une mutation dans le gène *cpxA* conduit à un défaut de formation du pilus F chez la bactérie receveuse (McEwen & Silverman, 1980). Sur la base de sa forte homologie avec la protéine EnvZ d'un système à deux composant, CpxA a été identifiée comme étant une histidine kinase et CpxR le régulateur associé (Weber & Silverman, 1988; Dong *et al.*, 1993). La voie Cpx répond à une très grande diversité de signaux extracytoplasmiques (variations de pH, hyper osmolarité, métaux ou indole) à tel point qu'il est difficile de trouver un point commun entre les signaux détectés (Hunke *et al.*, 2012).

De plus, le système est activé par la formation de corps d'inclusion causée par l'agrégation du variant défectueux de la *maltose binding-protein* (MalE31), prouvant que le système Cpx détecte les protéines périplasmiques mal repliées suite à un stress d'enveloppe (Hunke & Betton, 2003). La surexpression de la lipoprotéine de la membrane externe NlpE est aussi capable d'activer spécifiquement la voie Cpx. En effet, NlpE est ancrée à la membrane externe et changerait de conformation en réponse à l'adhésion des bactéries à des surfaces abiotiques causant l'activation de CpxA (Snyder *et al.*, 1995; Otto & Silhavy, 2002; Hirano *et al.*, 2007).

La délétion de *nlpE* cause un trouble de l'homéostasie du cuivre chez la bactérie expliquant l'activation du système Cpx par le cuivre (Gupta *et al.*, 1995). Le manque de points communs entre tous les signaux activateurs du système Cpx rends difficile la détermination du rôle de

ce système de réponse aux stress d'enveloppe. Mais on peut voir que de façon générale, le système Cpx à un rôle de maintien de l'intégrité de l'enveloppe.



Transporteur	Synthèse de la paroi	Régulation	Traduction de protéines	Chaperon protéique	Fonction inconnue
dctA, *efeU*, *fadL*, *mglB*, *nhaB*, *ompF*, *putP*, *sbmA*, *tppB*	*dacC*, *slt*, *ycbB*, *yqaU*	*flhC*, *mzrA*, *ydeH*	*raiA*, *rmF*	*cpxP*, *spy*, *dsbA*, *yccA*	*yebE*, *yjfN*, *yijP*, *yncJ*, *ynfD*, *yqaE*, *ytfK*

Figure I. 7 : Mécanisme d'activation de la voie Cpx.

Lorsque le système est au repos, l'activation de CpxA est inhibée par son interaction avec la protéine périplasmique CpxP. Les différents signaux activateurs du système Cpx vont dissocier CpxP de CpxA, causant l'autophosphorylation de l'histidine kinase avant le transfert du phosphate vers le régulateur transcriptionnel du cytoplasme CpxR. Une fois actif, CpxR se lie à l'ADN pour activer la transcription des gènes du régulon Cpx. CpxP dans le périplasme est dégradé par la protéase chaperon DegP (Hunke et al., 2012). Le tableau ci-dessous présente les gènes du régulon excepté les gènes *cpxA* et *cpxR*. Leur expression varie au moins deux fois lors de l'activation par rapport à la condition contrôle. Ces gènes ont été mis en évidence par la surexpression de l'activateur NlpE. La transcription des gènes en rouge est activée et celle des gènes en noir est inhibée par la voie Cpx.

L'activation du système Cpx déclenche la transcription d'une grande quantité de gènes. La caractérisation du système Cpx a permis de d'identifier certains des gènes du régulon mais aussi définir une séquence consensus de fixation de CpxR (de type GTAAAN$_{4\text{-}8}$GTAAA). Ainsi, par une approche bio-informatique, une centaine d'opérons théoriquement contrôlés par CpxR ont été déterminés (De Wulf *et al.*, 2002). Cependant, seulement une partie de ces gènes a été confirmée expérimentalement (Price & Raivio, 2009; Raivio *et al.*, 2013). Les gènes activés codent pour des protéines chaperons périplasmiques mais aussi des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi, dans la régulation ou que la traduction de protéines. Les gènes inhibés codent pour des transporteurs membranaires (Figure I. 7 tableau). Par ailleurs, un grand nombre des gènes régulés par Cpx ont des fonctions inconnues.

La particularité du système Cpx, par rapport aux autres systèmes à deux composants, est la présence, dans le périplasme de la troisième protéine accessoire, CpxP (Danese & Silhavy, 1998). La surexpression de CpxP conduit à une régulation négative de l'activité de la voie Cpx (Raivio *et al.*, 1999, 2000), ce qui implique que CpxP inhibe l'activation de CpxA, probablement par une interaction physique entre les deux protéines (comme présenté sur la Figure I. 7). Des expériences de résonnance nucléaire magnétique réalisées avec CpxP et le domaine périplasmique de CpxA de *Vibrio cholerae* (VpCpxAp) n'avaient pas permis de mettre en évidence une interaction entre les deux protéines (Kwon *et al.*, 2012). Pourtant, quelques années plus tard, leur interaction a pu être détectée, grâce à la purification d'un complexe composé de CpxA et CpxP préalablement stabilisé, dans la bactérie, avec un agent pontant (Tschauner *et al.*, 2014). Il semblerait donc que le contexte membranaire et peut-être l'état d'oligomérisation de CpxA soit nécessaires pour permettre l'interaction avec CpxP. Enfin, la résolution de la structure cristallographique de CpxP a mis en avant une similarité structurale avec la protéine chaperon Spy (Zhou *et al.*, 2011; Thede *et al.*, 2011). Pourtant les essais *in vitro* de protection de la MDH à la dénaturation thermique montrent que CpxP n'a qu'une faible activité chaperon (Quan *et al.*, 2011). L'inhibition de l'histidine kinase CpxA par CpxP serait donc son rôle prédominant, par rapport à son activité chaperon, et participerait à la régulation fine du système Cpx (Delhaye *et al.*, 2016). Cette hypothèse est corroborée par des expériences qui montrent qu'une suractivation de CpxA chez *E. coli* conduit à une diminution de la vitesse de croissance bactérienne.

Mécanisme d'activation d'une histidine kinase

Le rôle du senseur de l'histidine kinase (HK), au sein d'un système à deux composants, est de transférer un signal détecté dans le périplasme vers le cytoplasme et de permettre ainsi une réponse adaptée. Le prototype d'une histidine kinase est une protéine intégrale de la membrane interne, homodimérique, dont le domaine senseur est constitué d'un domaine extracellulaire contenu entre deux domaines transmembranaires. Le domaine transmetteur kinase du signal suit le second domaine transmembranaire et se trouve dans le cytoplasme.

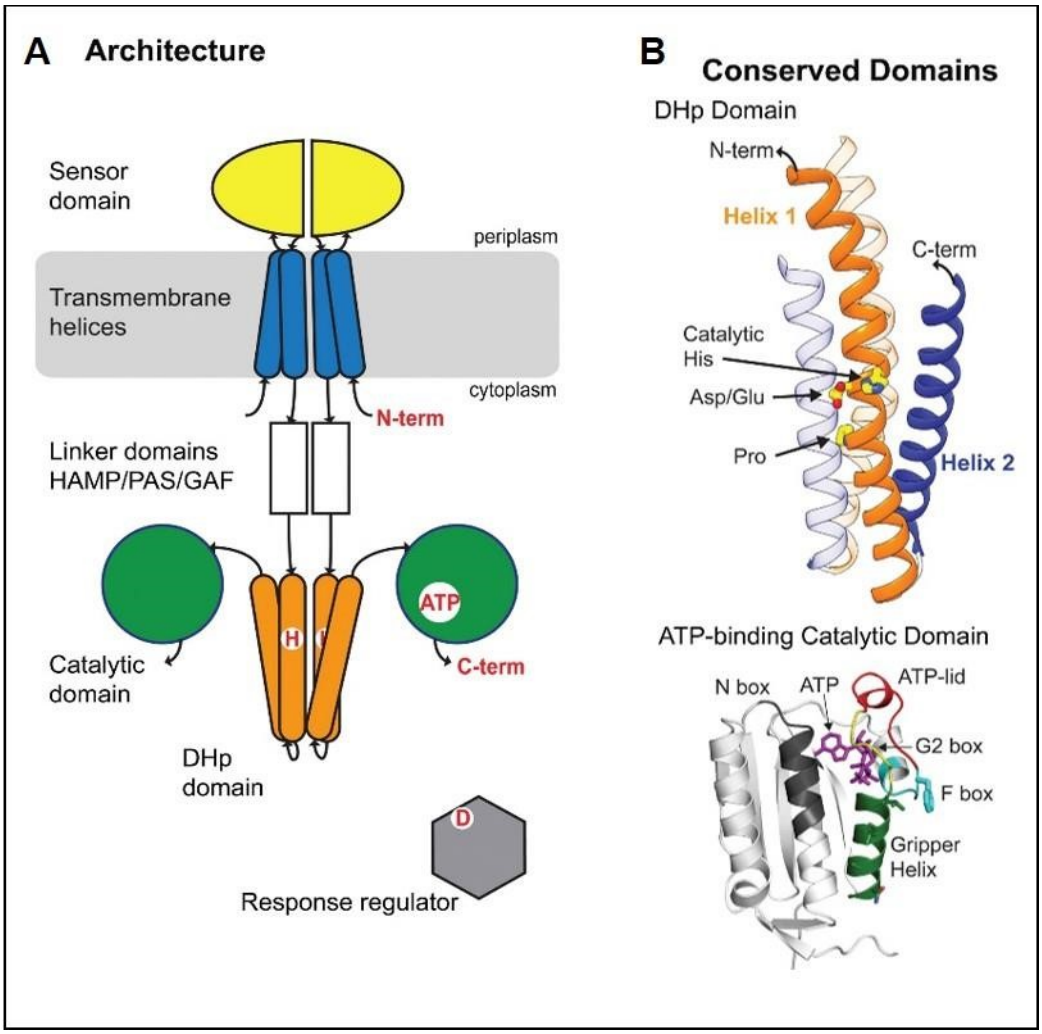


Figure I. 8 : Domaines composant un senseur histidine kinase de système à deux composants.

Représentation schématique de la topologie d'une histidine kinase canonique (A). Structures des domaines conservés, les domaines DHp (impliqué dans l'autophosphorylation) et CA (permettant l'apport de l'ATP). Les régions critiques pour les activités des domaines DHp e CA sont colorées sur les structures cristallographiques (B). Figure issue de Bhate et al., 2015.

Au sein des histidines kinases formant les systèmes à deux composants, certains domaines sont variables et d'autres sont conservés. Les domaines variables sont les domaines senseurs (Figure I. 8 *sensor*), qui vont capter le signal, et les domaines connecteurs (Figure I. 8 *linker*) qui vont transférer et amplifier le signal vers la partie cytoplasmique. Les domaines conservés des senseurs histidine kinase sont les domaines *dimerization and histidine phosphotransfer* (DHp) et les domaines catalytiques liant l'ATP (CA). Le domaine DHp est nécessaire lors de la l'autophosphorylation de la partie cytoplasmique de l'histidine kinase, via une molécule d'ATP, lié puis apportée par le domaine CA. Ce phosphate est ensuite transféré du domaine DHp au domaine receveur d'un régulateur de la réponse transcriptionnelle par phosphotransfert du phosphate. Ces réactions font suite à la détection du signal par le domaine périplasmique de l'histidine kinase dans le périplasme. Toutefois, la diversité des signaux entraine une diversité dans les mécanismes que les protéines mettent en place pour capter ces signaux. Les données structurales obtenues par cristallographie aux rayons X, ont permis de mettre en évidence certains de ces mécanismes. Dans ce chapitre je vais donc décrire les différents mécanismes connus de détection des signaux par le domaine périplasmique des histidine kinases.

1. Détection du signal par le domaine périplasmique d'une histidine kinase

Les récentes études des domaines senseurs des histidine kinase révèlent trois grandes classes structurales : (1) les domaines repliés en hélices α et brins β, (2) les domaines seulement hélicaux (3) repliés de manière similaire aux *periplasmic binding protein* (PBP).

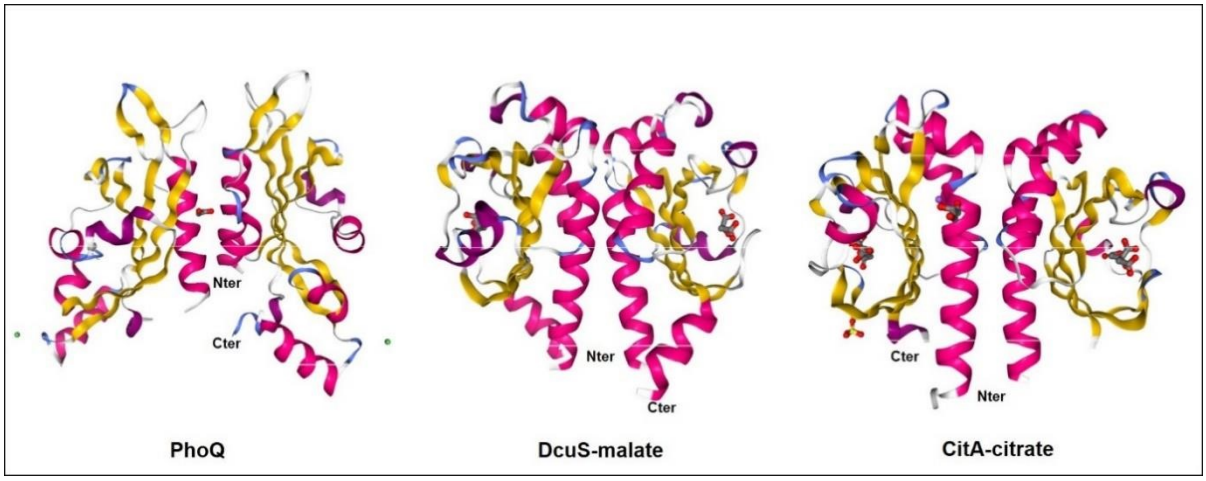


Figure I. 9 : Structure tridimensionnelle des domaines périplasmiques présentant un repliement de type PDC.

Structure de PhoQ (3BQ8), DcuS en présence de malate (3BY8) et CitA en présence de citrate (1P0Z). Les hélices α sont représentées en fuchsia, les brins β en jaune et les boucles non repliées en gris.

1.a. Les domaines senseurs adoptant un repliement PDC

Le terme PDC (PhoQ-DcuS-CitA) est employé pour une classe structurale de domaines périplasmiques composés d'hélices α et de brins β, ressemblant au repliement de type PerARNT-Sim (PAS Vogt & Schippers, 2015). Ce repliement est retrouvé chez les senseurs PhoQ, DcuS et CitA (Cheung & Hendrickson, 2010). Il semble être le plus répandu parmi les domaines périplasmiques des histidine kinase étudiées. Comme les domaines PAS, les domaines PDC possèdent cinq brins β antiparallèles, mais les domaines PDC sont en plus flanqués d'hélices α à chaque extrémité. En effet, ils commencent en général par une longue hélice α en N-ter et se terminent souvent par une petite hélice, en C-ter, nommée hélice-p précédant le domaine transmembranaire.

PhoQ est un capteur d'ions divalents qui est impliqué dans l'estimation de la concentration intracellulaire en magnésium de la bactérie (Miller *et al.*, 1989; Choi *et al.*, 2009). La structure du domaine périplasmique de PhoQ (Cheung *et al.*, 2008) montre un dimère stabilisé par la présence d'un pont salin (Figure I. 9 gauche), cette organisation dimérique étant celle attendue pour la forme fonctionnelle (Goldberg *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2008). La présence d'ions nickel et non de magnésium, ainsi que le fait que la structure de la forme apo n'a pas été résolue, ne nous permet pas de postuler sur le mécanisme d'activation par les ions divalents. Cependant, de récentes études montrent que l'interaction du domaine senseur de PhoQ avec une protéine périplasmique, SafA, changerait sa conformation causant l'activation de PhoQ en conditions acides (Ishii *et al.*, 2013).

DcuS est une autre histidine kinase impliquée dans la régulation du transport et du métabolisme des C_4-dicarboxylates. La résolution de la structure par résonnance magnétique nucléaire du domaine senseur montre un monomère replié en hélices α en N et C-ter suggérant un lien direct avec les domaines transmembranaires eux-mêmes hélicoïdaux (Pappalardo *et al.*, 2003). La résolution de la structure cristallographique en présence de malate (C_4-dicarboxylate) met en évidence un changement de conformation au niveau des brins β causant un mouvement de piston de l'hélice en C-terminal (Cheung & Hendrickson, 2008) qui correspond à la forme active (Figure I. 9 milieu). Contrairement à la structure résolue par RMN, dans les cristaux,

DcuS est dimérique et l'orientation des hélices aux extrémités N et C-ter est cohérente avec celle observée pour PhoQ. En effet, la purification des domaines périplasmiques d'histidine kinase donne souvent des formes monomériques qui se dimérisent parfois lorsque la protéine est concentrée. Cela suggère que l'énergie d'interaction entre les domaines périplasmiques est probablement faible.

Le plus étudié de ces domaines périplasmiques est celui du senseur de citrate CitA. Les structures des formes en présence ou en absence de citrate sont dimériques et contrairement à

PhoQ et DcuS, le domaine périplasmique de CitA ne se termine pas par une hélice α mais par un brin β (Figure I. 9 droite). La comparaison des structures montre que la liaison du citrate, coordonné par quatre résidus des brins β et deux résidus d'une boucle en face des brins β (Figure

I. 10 A), cause une contraction qui engendre un raccourcissement du brin β en C-ter (Sevvana *et al.*, 2008). Ce mouvement de piston, comme pour DcuS, agirait sur les domaines transmembranaires activant CitA (Figure I. 10 B).

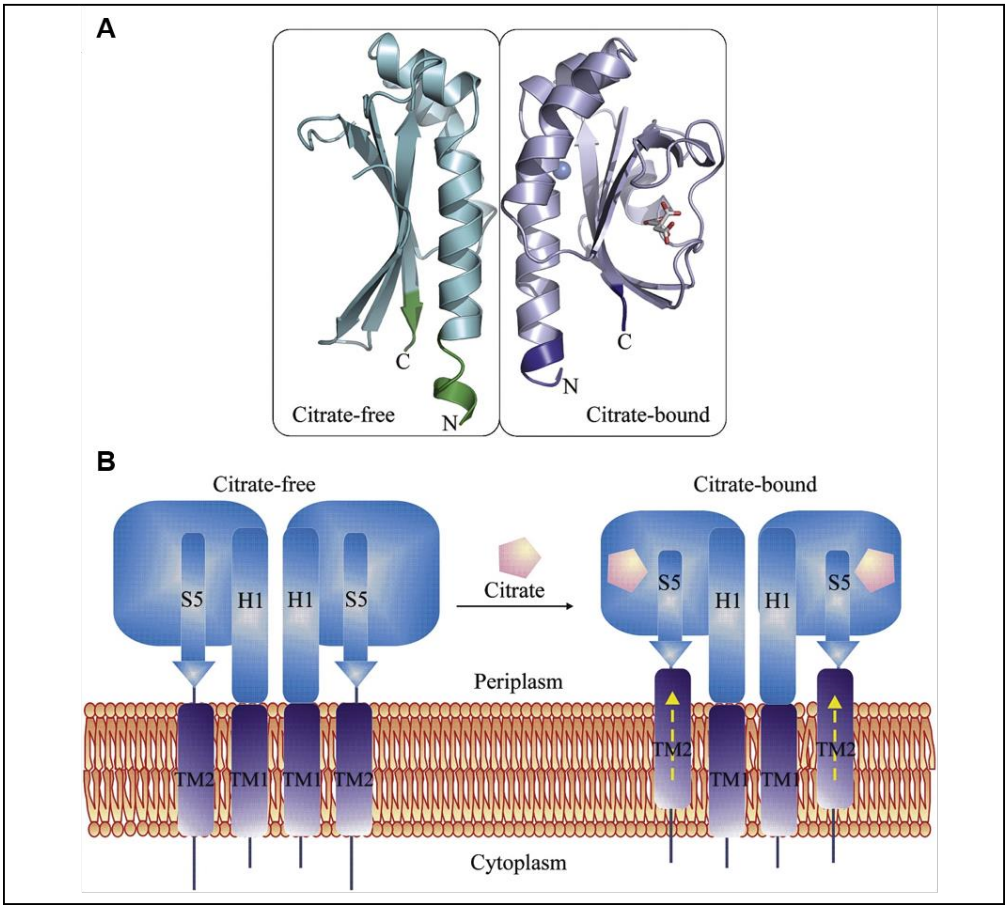


Figure I. 10 : Activation de CitA : Mouvement de piston du domaine périplasmique.

Comparaison des structures cristallographiques de CitA en absence (2V9A) ou en présence (1P0Z) de citrate montrant la contraction des brins β antiparallèles et un mouvement de brin en C-ter (A). Schéma du mouvement de piston causé par le domaine périplasmique de CitA sur les domaines transmembranaires suite à la liaison du citrate. TM, H et S signifient respectivement domaine transmembranaires, hélices α et brin β (B). Figure issue de l'article de Sevvana et al., 2008.

Il n'existe pas d'informations structurales sur la protéine ZraS que nous étudions. Cependant, la prédiction de structure secondaire de ZraS, montre que son domaine périplasmique (ZraSp) pourrait adopter un repliement PDC (Figure I. 14) avec cinq brins β flanqués de deux hélices en N-ter (dont la première longue de quarante-cinq acides aminés) et une petite hélice α en Cter qui pourrait être une hélice-p.

1.b. Les domaines senseurs hélicaux

Parmi les senseurs périplasmiques totalement hélicaux, on retrouve la protéine NarQ. Cette protéine est un senseur du nitrate et du nitrite périplasmique. La structure

cristallographique d'un fragment de la protéine NarQ, depuis le domaine senseur périplasmique jusqu'au premier domaine cytoplasmique relais (domaine HAMP), a été résolue. La structure présente une protéine composée de huit hélices α, dont une allant du périplasme au cytoplasme, arrangée en dimère (Gushchin *et al.*, 2017). La structure de la protéine liée au nitrate, a aussi été résolue et indique que ce ligand se lie à l'interface des deux domaines périplasmiques (Figure I. 11 A). La comparaison des structures apo et holo-NarQ montre que la liaison du NO_3 induit le déplacement des hélices du domaine senseur de 0,5 à 1 Å. Ce mouvement se traduit par un réarrangement des hélices transmembranaires, induisant un mouvement de piston de 2,5
Å et causant l'activation de NarQ. C'est ainsi qu'un signal capté dans le périplasme peut être transduit à travers la membrane jusqu'au périplasme.

1.c. Les domaines senseurs adoptant un repliement PBP

La dernière classe structurale de domaines périplasmiques d'histidine kinase présente un repliement dit de *periplasmic binding protein* (PBP). Ce repliement se caractérise par un mélange d'hélices α et de brins β. Mais, contrairement aux domaines senseurs PDC (PhoQ-DcuS-CitA), la présence d'une longue hélice en N-ter ou de l'hélice courte en C-ter n'est pas observée. De plus, le prototype du repliement PBP conduit à la formation de deux domaines connectés par une région charnière avec la présence de sites de liaison des ligands à l'interface des deux domaines. Ce genre de repliement a d'abord été identifié pour l'histidine kinase $HK29_s$ (Cheung *et al.*, 2009). Un autre exemple est le domaine périplasmique de l'histidine kinase
BvgS. Celle-ci contient deux domaines repliés en PBP permettant la régulation de l'expression des facteurs de virulence chez la bactéries *Bordatella pertussis* (Scarlato *et al.*, 1990). Le domaine périplasmique de BvgS contient deux domaines VFT. La structure du domaine VFT2, nommé ainsi en référence à la forme d'une dionée (en anglais *Venus flytrap*), montre deux lobes liés par un domaine charnière composé de brins β (Herrou *et al.*, 2010). Ces structures existent sous deux conformations, ouverte ou fermée. La fixation d'un ligand spécifique dans la cavité stabilise la conformation fermée, déclenchant l'activation de la réponse. En effet, le domaine VFT2 a été cristallisé sous forme active avec les deux lobes formant deux cavités closes (Figure I. 11 B haut). Cette conformation fermée de VFT2 a été confirmée comme étant celle de la forme active puisqu'un variant constitutivement actif, aussi

cristallisé (Figure I. 11 B haut), présente la même conformation (Herrou *et al.*, 2010). La résolution de la structure du domaine périplasmique complet de BvgS, indique que le domaine VFT1 doit être ouvert et le domaine
VFT2 doit être fermé pour que BvgS s'autophosphoryle et puisse transférer ce phosphate pour activer le régulateur transcriptionnel associé, BvgA (Dupré *et al.*, 2015).

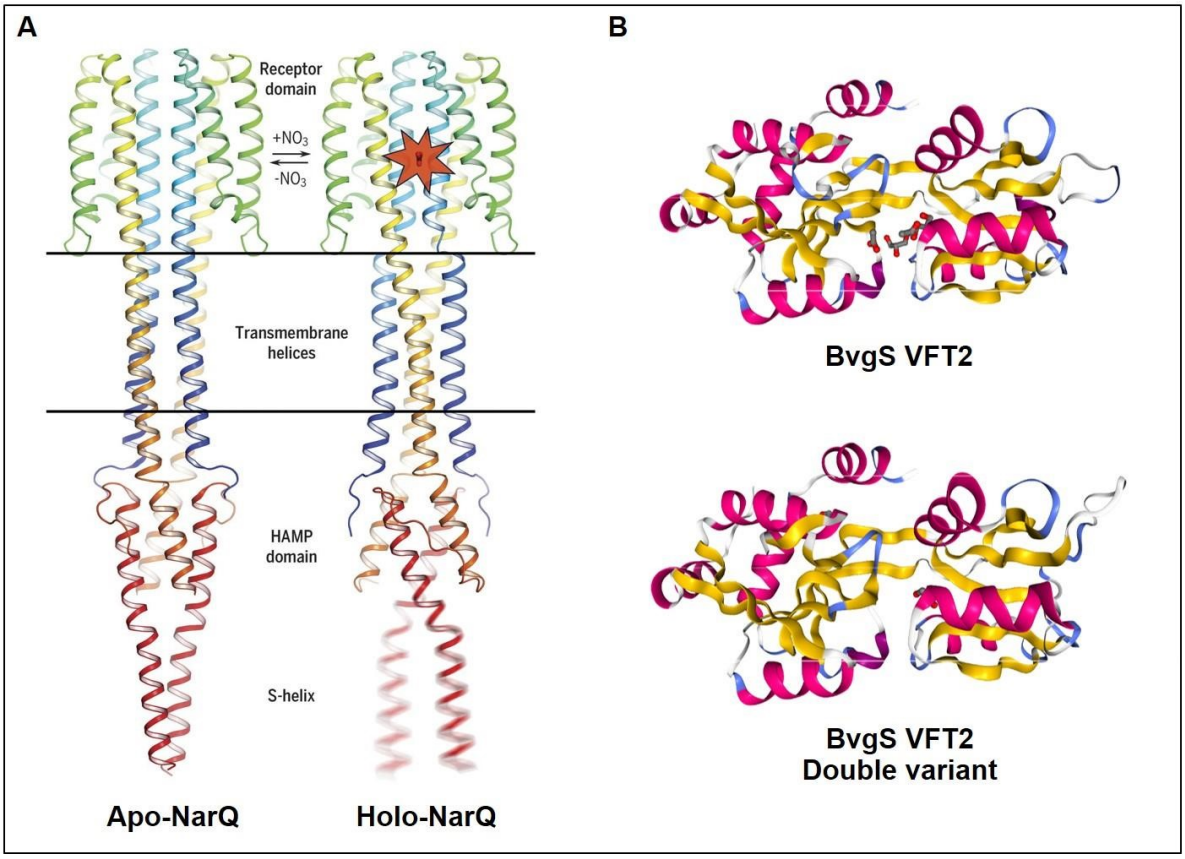


Figure I. 11 : Structures de domaines périplasmiques n'arborant pas de repliement PDC.

Structures cristallographiques d'un fragment de NarQ en absence (5JEQ) ou en présence de nitrate (5IJI). La structure contient le domaine périplasmique, les domaines transmembranaires ainsi que le domaine relais cytoplasmique de NarQ (A). Structures du domaine VFT2 issu du domaine périplasmique de BvgS (3MPK). Le repliement du domaine VFT2 natif est semblable à celui d'un double variant de VFT2 constitutivement actif (3MPL) (B).

1.d. Cas du domaine senseur de CpxA

Le système Cpx est celui dont nous nous sommes le plus inspiré lors de nos études sur le système Zra. La structure cristallographique du domaine périplasmique de CpxA issu de la bactérie *Vibrio parahemolyticus,* nommé VpCpxAp a été résolue (Kwon *et al.*, 2012). Dans

les cristaux, il y avait deux molécules par unité asymétrique, suggérant que VpCpxAp est un dimère (Figure I. 12). Toutefois il est fort probable que cette association soit non-spécifique et due aux longues extrémités C-ter qui enchâssent un protomère dans l'autre (Figure I. 12 B). En effet, la position de ces extrémités, qui sont normalement liées aux hélices transmembranaires, ne parait pas compatible avec un ancrage à la membrane. La structure montre une forme globulaire repliée en cinq brins β entourés de trois hélices α. Toutefois, ce repliement n'est pas caractéristique d'un senseur PDC car une boucle flexible précède l'hélice H1 et succède le dernier brin β. Ceci diffère beaucoup du repliement PDC d'autant plus que ce sont ces parties qui permettent le transfert du signal depuis le périplasme aux domaines transmembranaires.

Toutefois, par comparaison de structure, il a été proposé que VpCpxAp aurait un repliement de type PAS, retrouvé dans différents domaines de détection de signaux de senseurs (Kwon *et al.*,
2012). Sachant qu'aucun ligand inducteur de CpxA n'a encore pu être identifié, cette structure n'est pas suffisante pour nous informer sur le mécanisme d'activation.

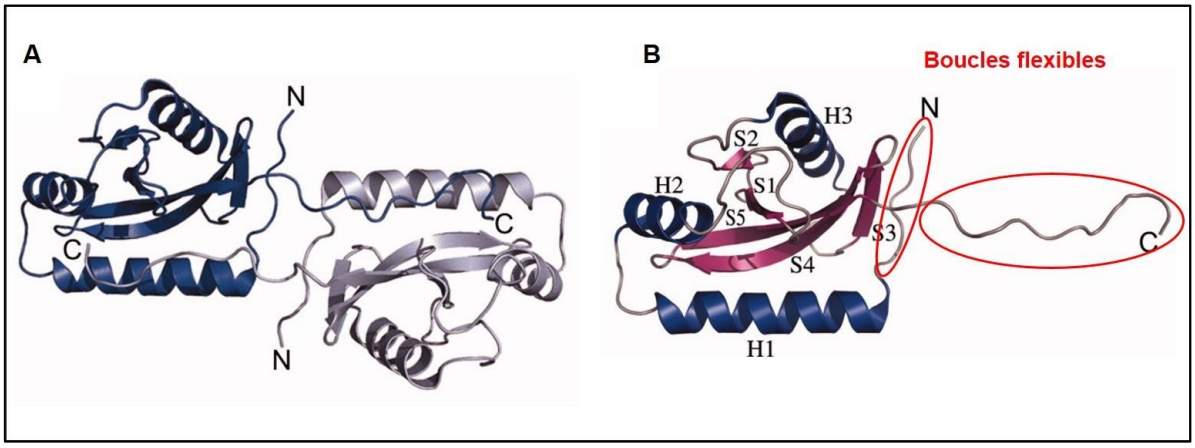


Figure I. 12 : Structure de VpCpxAp.

Structure du dimère cristallisé de VpCpxAp (3V67). Le N et le C pointent les extrémités N et C-terminales de la protéine. On peut voir que les domaines C-ter sont enchâssés l'un dans l'autre conduisant à la dimérisation (A). La structure du monomère montre bien la présence des deux boucles flexibles entourées en rouge qui devraient précéder les domaines transmembranaires (B).

2. Transmission du signal au travers des domaines transmembranaires

La description des changements conformationnels des histidine kinase suite à la détection d'un signal montre que la fixation d'un ligand sur le domaine périplasmique influence le mouvement des domaines transmembranaires sous-jacents. Dans cette partie, je vais présenter des exemples, trouvés dans la bibliographie, explicitant les mouvements des domaines transmembranaires permettant la transmission d'un signal du périplasme au cytoplasme par une histidine kinase. Certains ont déjà été succinctement mentionnés dans les paragraphes précédents.

L'étude des domaines périplasmiques de DcuS et CitA (Cheung & Hendrickson, 2008; Sevvana *et al.*, 2008) a montré que la contraction observée suite à la liaison du ligand cause une contraction des brins β qui conduit à un mouvement de piston du second domaine transmembranaire (Figure I. 10 B). C'est le premier exemple de mouvement qui convertit un signal périplasmique en signal cytoplasmique. Toutefois, étant donné qu'il n'y a pas encore de données structurales avec les trois domaines : périplasmique, transmembranaire et cytoplasmique, il n'est pas encore possible de comprendre précisément l'impact d'un mouvement en piston sur la partie cytoplasmique de ces histidine kinases. Une première structure a été résolue par cristallographie aux rayons X avec un fragment protéique contenant le domaine périplasmique, le domaine transmembranaire et seulement une partie du domaine cytoplasmique, il s'agit de NarQ (Gushchin *et al.*, 2017). La comparaison des structures en présence ou en absence de nitrate montrent un petit déplacement des hélices H1 périplasmiques de 0,5 à 1 Å. Ce mouvement se traduit en un mouvement de cisaillement au niveau de l'interface entre les domaines périplasmiques et membranaires. C'est-à-dire que les premières hélices membranaires (TM1) de chaque protomère vont se rapprocher l'une de l'autre alors que les secondes hélices vont s'éloigner (Figure I. 13 A). Ces réarrangements induisent, en plus, un mouvement de piston qui dilate de 2,5 Å les hélices TM1 conduisant à un mouvement de levier de 7 Å au niveau des domaines cytoplasmiques (Figure I. 13 B). La conversion des mouvements de cisaillements et de piston en mouvement de levier est due à un domaine commun, le domaine

HAMP, à partir de l'acronyme de Histidine kinases, Adenylate cyclases, protéine réceptrices de Méthyl et Phosphatases, suit les domaines transmembranaires du coté cytoplasmique

(Gushchin & Gordeliy, 2018; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2018). Les domaines HAMP des deux monomères permettraient, par amplification des mouvements des domaines transmembranaires, d'initier les activités kinase et phosphatase des histidine kinases.

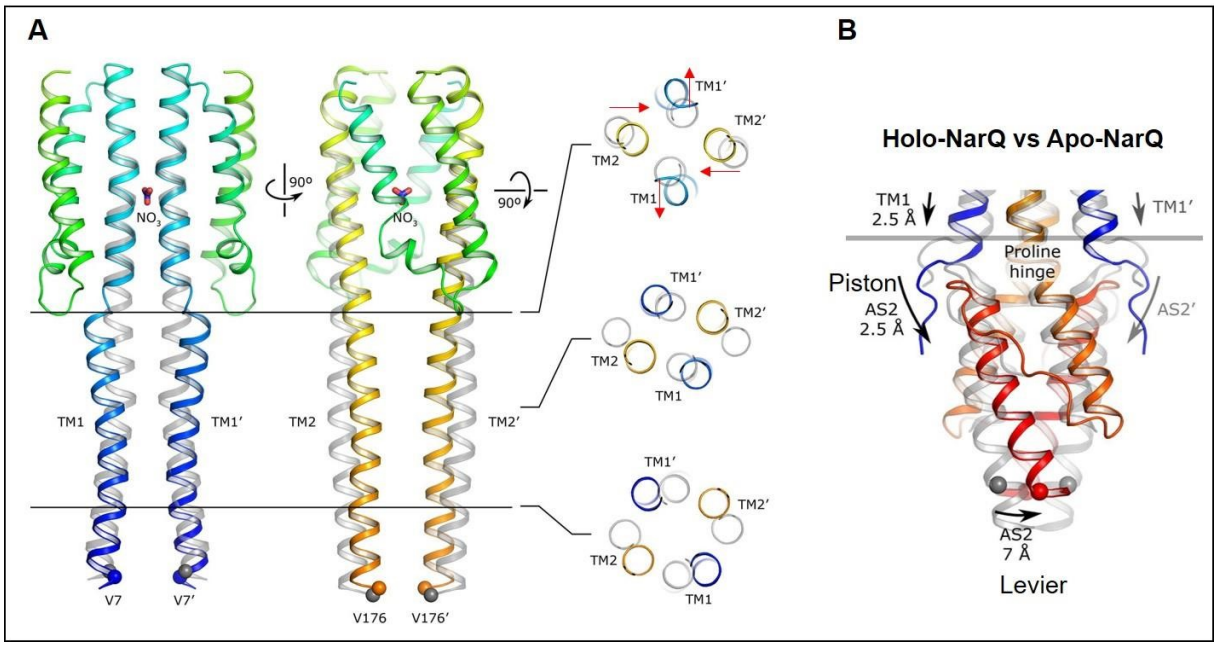


Figure I. 13 : Mouvements conduisant à l'activation de l'activité de l'histidine kinase NarQ.

Comparaison structurale de Holo-NarQ et Apo-NarQ au niveau des domaines transmembranaires (A) et cytoplasmiques (B). Les structures en transparences représentent Apo-NarQ.

L'étude de NarQ permet de conclure que les trois types de mouvements des domaines transmembranaires d'histidine kinase, le cisaillement, le piston et le levier peuvent avoir lieu en même temps lors de la transmission du signal vers le cytoplasme. Ces mouvements rapprochant le domaine CA du domaine DHp et permettant à l'autophosphorylation de l'histidine kinase.

Lors de l'étude de ZraS, nous avons utilisé le logiciel *Jpred4* (Cuff *et al.*, 1998) pour prédire les structures secondaires des différents domaines de la protéine. Sur cette base nous avons pu identifier, au sein du domaine cytoplasmique, les domaines DHp et CA. Le nombre de résidus entre le domaine transmembranaire et le domaine DHp est trop petit pour correspondre à un domaine connecteur de type HAMP ou PAS (Figure I. 14). Cette absence de domaines

connecteurs est plutôt inédite chez les histidine kinases déjà étudiées (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2018).

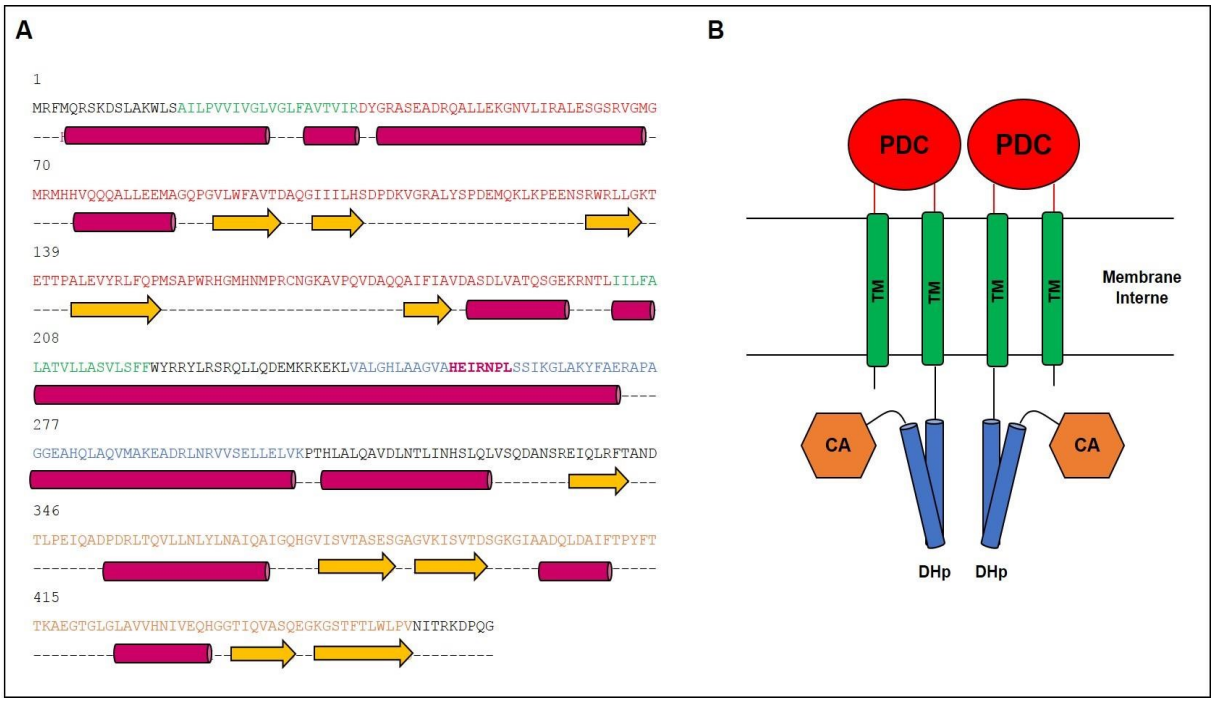


Figure I. 14 : Représentation schématique des domaines composant ZraS.

Séquence en acides aminés de ZraS de *E. coli* (A). Les hélices α sont représentées par les cylindres en magenta et les brins β par les flèches jaunes. Sur la séquence, le rouge représente le domaine périplasmique, le vert les domaines transmembranaires, le bleu le domaine DHp et l'orange le domaine CA. La petite séquence en magenta grise représente le domaine catalytique du domaine DHp. Ces couleurs sont reprises pour la représentation schématique d'un dimère de ZraS (B).

La gestion du zinc chez les bactéries

1. Généralités : Le zinc est important pour la bactérie

Le zinc est un des métaux de transition les plus abondants au sein des bactéries du fait de ses propriétés d'association, de potentialisation et de structuration des protéines (Giedroc & Coleman, 1986; Capdevila *et al.*, 2016). Le zinc, sous forme Zn^{2+}, sert notamment de cofacteur aux différentes classes d'enzymes ou de protéines régulatrices. Plusieurs études ont permis d'évaluer la quantité de zinc dans les bactéries et notamment chez *E. coli*. La quantité totale de zinc contenue dans les cellules a d'abord été déterminée, par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-MS), sur les extraits totaux (Outten, 2001). Ainsi, une culture d'*E. coli* cultivée en milieu minimum contient 2.10^5 atomes de Zn^{2+} par cellule. Rapporté au volume moyen d'une bactérie, cela correspond à une concentration de 200 µM. De manière surprenante, une culture de la même souche cultivée en milieu riche (milieu LB contenant 100 fois plus de zinc que le milieu minimum) contient autant de zinc que lorsqu'elle est cultivée en milieu minimum. La régulation de la quantité intracellulaire de zinc (homéostasie) est donc un processus très important chez les bactéries. La technique d'ICP-AES a été utilisée pour quantifier séparément la quantité de zinc dans le périplasme et dans le cytoplasme de *E. coli* (Hu *et al.*, 2008). Le fractionnement de bactéries cultivées en milieu minimum déplété ou replété avec 100 µM de zinc montre que la concentration de Zn^{2+} dans le cytoplasme ne change pas alors que la concentration dans le périplasme est décuplée. C'est donc le zinc cytoplasmique qui est finement régulé alors que la concentration périplasmique est celle du milieu externe. Des études de métalloprotéomique ont permis d'identifier les protéines qui contiennent ou qui lient le zinc en tant que messager dans le but de réguler des processus biologiques (Sevcenco *et al.*, 2011). Pour cela, une concentration stressante (240 µM), c'est-à-dire une concentration qui induit une réponse transcriptionnelle, d'un isotope du zinc a été introduite dans une culture d'*E. coli.* Les protéines totales ont ensuite été séparées par électrophorèse bidimensionnelle, selon pH et la masse moléculaire (en condition dénaturante), puis analysées par autoradiographie.

L'identification des protéines ayant fixé le plus de Zn^{69m} est effectuée par spectrométrie de masse pour quantifier la distribution relative des isotopes au sein des protéines. Ainsi, trente protéines à zinc ont été identifiées (Figure I. 15) ce qui représente 20 % du nombre de protéines à zinc prédit pour la souche *E. coli* K-12 par la banque de donnée ecocyc

(www.ecocyc.org). La protéine ZraP est celle qui lie le plus de zinc chez *E. coli* (71 %) et sera décrite plus en détail dans le chapitre 4 de l'introduction.

Protéine	Annotation	Distribution relative (%)	Valeur absolue*
ZraP	Zinc resistance-associated protein	71,4	859,74
DnaK	Molecular chaperone	14,79	178,16
Tsf	Translation elongation factor EF-Ts	4,55	54,77
YgeY	Probable deacetylase	1,77	21,31
YcdX	Predicted Zn-binding hydrolase	1,01	12,16
YqhD	Alcohol dehydrogenase	0,96	11,56
AckA	Acetate kinase	0,86	10,35
FbaA	Fructose-biphosphate aldolase II	0,78	9,39
TktA	Transketolase 1	0,71	8,55
UxaC	Uronase isomerase	0,46	5,54
HchA	Chaperone protein	0,33	3,97
YadF	Carbonic anhydrase 2	0,32	3,85
TktB	Transketolase 2	0,31	3,73
YjgB	Predicted hydrolase	0,3	3,61
Dcp	Dipeptidyl Carboxypeptidase II	0,26	3,13
Ppa	Inorganic diphosphatase	0,24	2,89
IleS	Isoleucine-tRNA ligase	0,21	2,53
MsrB	Peptide methionine sulfoxide reductase	0,16	1,93
Def	Peptide deformylase	0,14	1,69
GldA	Glycerol dehydrogenase	0,12	1,44
HisD	Bifunctional histidinal/histidinol dehydrogenase	0,12	1,44
PepD	X-His Dipeptidase	0,06	0,72
ManA	Mannose-6-phosphate isomerase	0,04	0,48
YahK	Probable alcohol dehydrogenase	0,02	0,24
YdgS	Probable pyridoxal kinase	0,02	0,24
YncB	Putative NADP-dependant oxidoreductase	0,02	0,24
DapE	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	0,01	0,12
LpdA	Dihydrolipoamide dehydrogenase	0,01	0,12
RpoA	DNA-Directed RNA polymerase α subunit	0,01	0,12
AlaS	Alanine-tRNA ligase	< 0,01	< 0,01

Figure I. 15 : Distribution relative du zinc parmi les métalloprotéines à zinc chez E. coli.

Liste des métalloprotéines à zinc qui ont liées le plus d'isotope Zn^{69m}. D'autres protéines liant le zinc n'ont pas été identifiées à cause des seuils de détection du spectromètre de masse (0,01 pmol de protéine) et de l'autoradiographie (0,1 pmol de zinc). Les noms des protéines sont en anglais.

2. La bataille entre l'hôte et la bactérie pour le contrôle du zinc

Le zinc étant aussi important pour l'hôte que pour la bactérie pathogène qui l'infecte, une compétition pour le contrôle de cet ion métallique se met en place au niveau des sites d'infection, comme dans les abcès cutanés ou dans l'intestin. Des expériences de dosage par ICP-MS ont montré qu'au niveau des abcès causés par une infection à *Staphylococcus aureus*, la concentration en zinc est bien inférieure à celle des cellules intestinales environnantes (Corbin *et al.*, 2008). Cela suggère qu'il y a une séquestration du zinc par l'hôte au niveau des sites d'interaction entre l'hôte et le pathogène, ce phénomène est plus connu sous le nom d'immunité nutritionnelle. L'une des protéines actrice du confinement du zinc extracellulaire est la calprotectine (CP). Cette protéine qui possède une activité chélatrice des métaux est sécrétée par des cellules de l'immunité innée, les neutrophiles, mais aussi par les cellules épithéliales qui tapissent l'intestin (Sohnle *et al.*, 1991; Clohessy & Golden, 1995). Elle est composée de deux sous unités, S100A8 (sous-unité α) et S100A9 (sous-unité β) qui sont associées en hétérodimère (Hunter & Chazin, 1998) sous forme apo. Une fois sécrétés dans l'espace extracellulaire, les hétérodimères de CP vont lier du Ca^{2+} (présent dans le milieu) ce qui va causer une dimérisation (Figure I. 16 A) en hétérotétramères $\alpha_2\beta_2$ (Strupat *et al.*, 2000; Korndörfer *et al.*, 2007). Chaque hétérodimère contient au total quatre sites de liaison des métaux, deux sites de fixation du Ca^{2+} (basse et haute affinité) et deux sites de liaison des métaux de transition (Zn^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+} et Ni^{2+}) qui se situent à l'interface de chaque monomère (Figure I. 16 B). Le site 1 est composé de trois histidines et d'un acide aspartique (His_3Asp) et le site 2 de six histidines (His_6). Le site His_3Asp a été montré comme étant très spécifique au zinc alors que le site His_6 est plus versatile et peut lier les autres métaux de transition (Zygiel & Nolan, 2018). L'activité de chélation de la CP génère donc un microenvironnement limité en zinc qui est délétère pour les bactéries pathogènes. Toutefois, certains pathogènes comme *staphylococcus aureus*, possèdent des systèmes particuliers tels que le transporteur AdcABC qui associé aux protéines de l'opéron *cntABCDF* permettent la synthèse et la sécrétion de

métallophores et aident la bactérie à rivaliser avec l'effet de la CP (Grim *et al.*, 2017). Il existe donc bien une « bataille » entre l'hôte et la bactérie pour le contrôle du zinc extracellulaire qui conduit à une variation des concentrations en zinc pour la bactérie et demande une régulation fine de l'import dans le cytoplasme qui est très strictement régulé dans le cytoplasme.

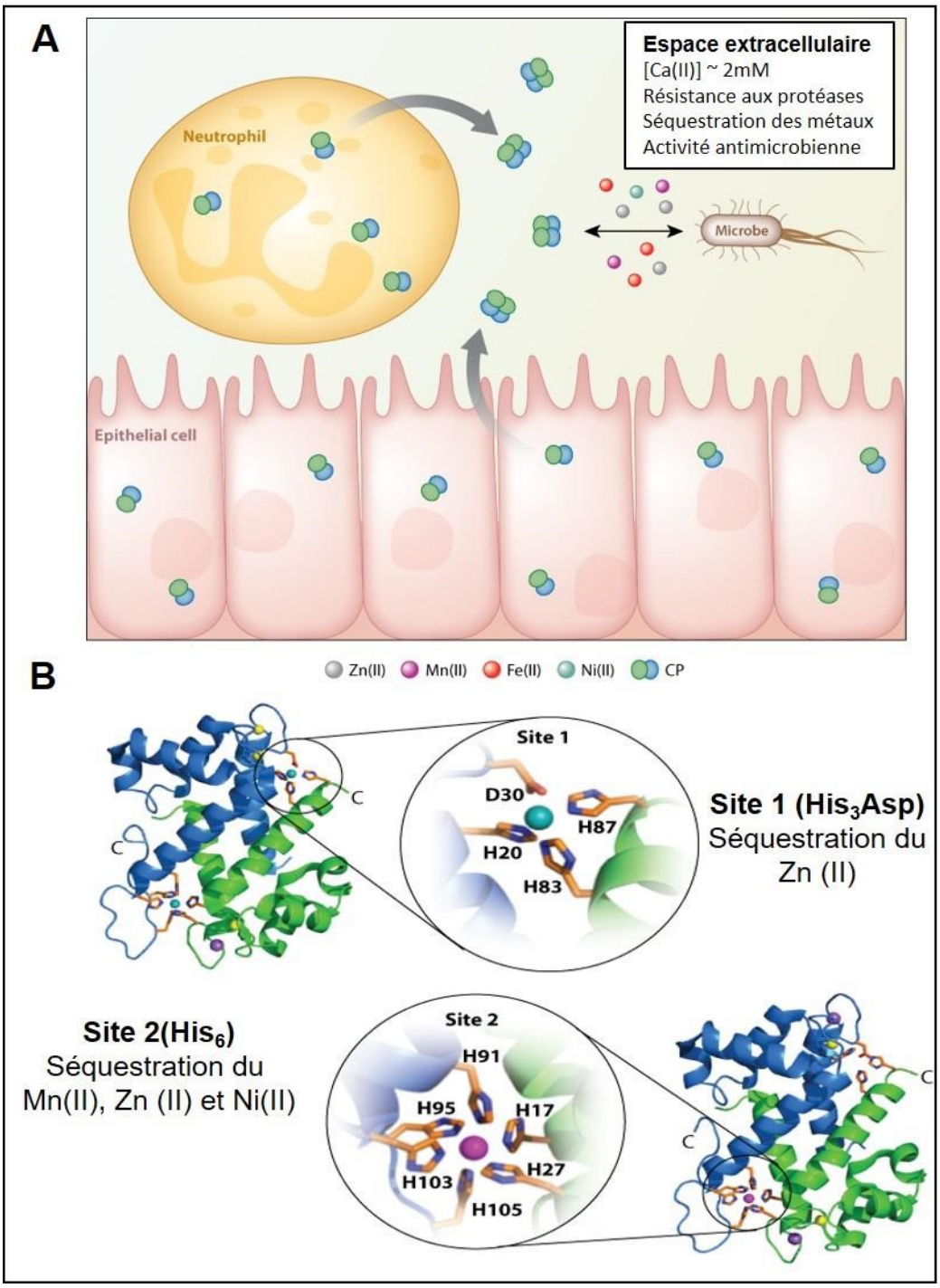


Figure I. 16 : Rôle antibactérien de la calprotectine.

Schéma représentant l'interaction hôte pathogène menant à la sécrétion de calprotectine par les neutrophiles et les cellules épithéliales (A). Structure cristallographique de la calprotectine

humaine liée au nickel (site 1) et au manganèse (site 2). Les structures présentées sont issues de la structure de l'hétérotétramère mais seule la forme hétérodimérique est présentée. La sousunité α est représentée en vert et la sous unité β en bleu (B). Figures issues de Zygiel & Nolan, 2018.

3. Régulation de la concentration cytoplasmique en zinc

La régulation de la concentration du zinc cytoplasmique, chez les bactéries, est orchestrée par deux facteurs de transcription qui fixent du zinc, *Zinc uptake regulator* (Zur) et *Zinc responsive transcriptional regulator* (ZntR). Ces deux protéines régulent la transcription des gènes permettant la synthèse de protéines d'import, d'export ou de mobilisation du zinc (Mikhaylina *et al.*, 2018). Zur est un répresseur transcriptionnel, de la famille des *Ferric uptake regulators* (Fur). C'est une protéine dimérique dont l'activité est zinc dépendante. Elle est liée à la séquence promotrice des gènes qu'elle régule lorsque la concentration cytoplasmique de zinc est suffisante. En effet, si le zinc est en concentration suffisante, il va être coordonné par les sites structuraux et régulateurs de Zur (forme Zur_2Zn_4). Cette forme se lie à l'ADN et empêche la transcription des gènes qu'elle régule (Gabriel *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2011; Chandrangsu *et al.*, 2017). En conditions de carence, le zinc se dissocie des sites régulateurs, ce qui modifie progressivement la conformation de la protéine (formes Zur_2Zn_3 et Zur_2Zn_2) causant sa dissociation de l'ADN et une dérépression de l'expression des gènes réprimés (Figure I. 17 A). Le régulon de Zur comprend des gènes impliqués dans l'import du zinc comme l'opéron *znuABC* et *znuD*, mais aussi des gènes nécessaires à la mobilisation du zinc au niveau des protéines ribosomiques (Shin & Helmann, 2016). La dérépression de Zur va donc majoritairement causer une augmentation de l'import du zinc dans le cytoplasme (Figure I. 17

B) ainsi qu'une mobilisation plus importante du zinc au niveau ribosomial (Shin & Helmann, 2016). Contrairement au répresseur Zur, ZntR est un activateur de la transcription de la même famille que la protéine *Mercuric resistance operon regulatory protein* (MerR), et se lie aux promoteurs de ses gènes cibles en présence d'un excès de zinc (Outten, 2001) permettant une activation de la transcription (Choi & Bird, 2014). ZntR ne serait pas spécifique du zinc car il répond aussi au cadmium et au plomb (Binet & Poole, 2000). Peu d'études ont été réalisées pour identifier le régulon complet mais un gène a été identifié comme étant ZntR dépendant, *zntA*. Ce gène code pour une protéine intégrale de la membrane interne impliquée dans l'export du zinc, du cadmium et du plomb vers le périplasme (Chandrangsu *et al.*, 2017).

Ensemble, les régulateurs transcriptionnels Zur et ZntR sont donc essentiels aux flux du zinc dans le cytoplasme des bactéries (Figure I. 17 B).

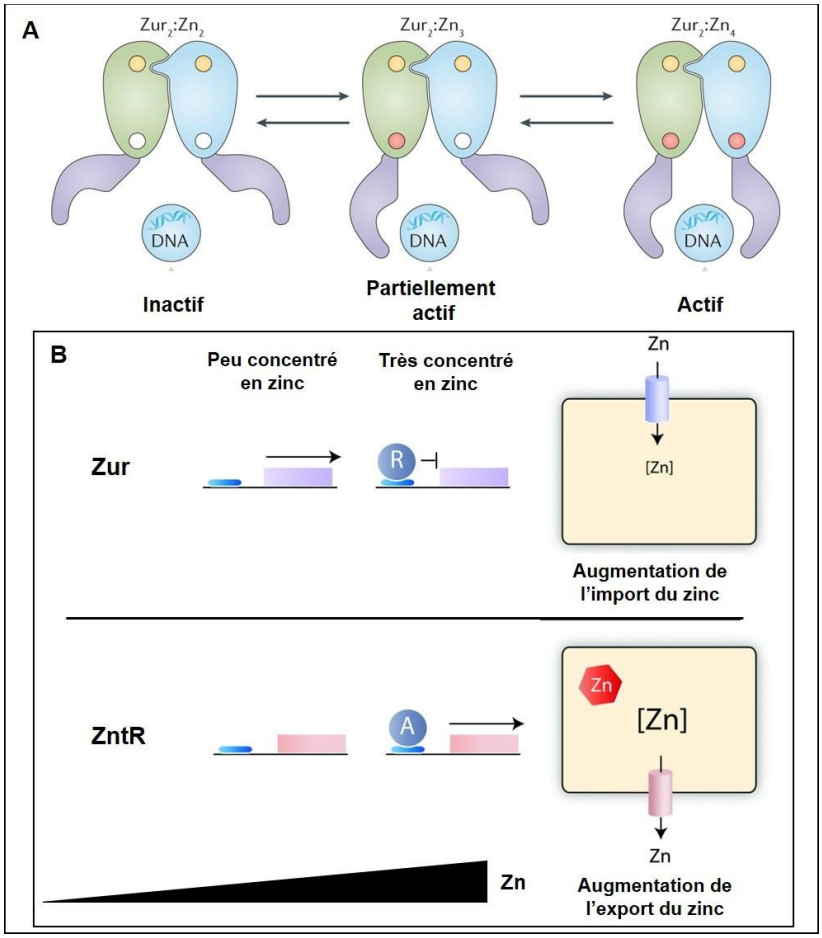


Figure I. 17 : Régulation de la concentration cytoplasmique de zinc.

Régulation de la fixation de Zur sur l'ADN en fonction de la quantité de zinc liée au régulateur transcriptionnel. Figure adaptée de Chandrangsu et al., 2017 (A). Mécanismes et conséquences de la régulation transcriptionnelle dépendante du zinc par Zur et ZntR. Figure adaptée de Choi et al., 2009 (B).

Les mécanismes de transport du zinc à travers les membranes des bactéries à gram-négatif ne sont pas complètement connus mais beaucoup de protéines y participant ont été décrites. Chez certains pathogènes telles que *Neisseria meningitidis*, le zinc est « capturé » par la boucle extracellulaire de la protéine de la membrane externe ZnuD. Ce transporteur permet ensuite le passage du zinc (libre ou possiblement complexé à un petit métallophore) dans le périplasme.
Ce compartiment étant dépourvu d'ATP, l'énergie nécessaire pour permettre l'entrée du zinc par ZnuD provient de la force proton motrice générée par le complexe TonB-ExbB-ExbD cytoplasmique (Calmettes *et al.*, 2015). Dans le périplasme, tout comme pour les complexes

Fe-siderophores, le zinc libre ou chélaté serait reconnu par des *Substrate Binding Protein* (SBP) et dirigé vers des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette) pour l'entrée dans le cytoplasme (Kustusch *et al.*, 2011). Le transporteur de type ABC qui est spécifique du zinc est formé par le complexe ZnuABC (Figure I. 18 à gauche). ZnuA lie le zinc dans le périplasme afin de l'acheminer vers ZnuB, une protéine intégrale de la membrane interne, qui va transporter le zinc dans le cytoplasme grâce à l'énergie produite par hydrolyse de l'ATP réalisée par l'ATPase ZnuC (Gabbianelli *et al.*, 2011). Chez *Salmonella enterica*, le transport du zinc à travers le périplasme est réalisé soit par le complexe ZnuA-ZinT (où ZinT est aussi une protéine liant le zinc) soit par ZnuA seul (Figure I. 18 à gauche, Ilari *et al.*, 2014). Une hypothèse est que le complexe ZnuA-ZinT serait requis pour le transport du zinc chélaté alors que ZnuA seul servirait à transporter le zinc libre (Chandrangsu *et al.*, 2017).

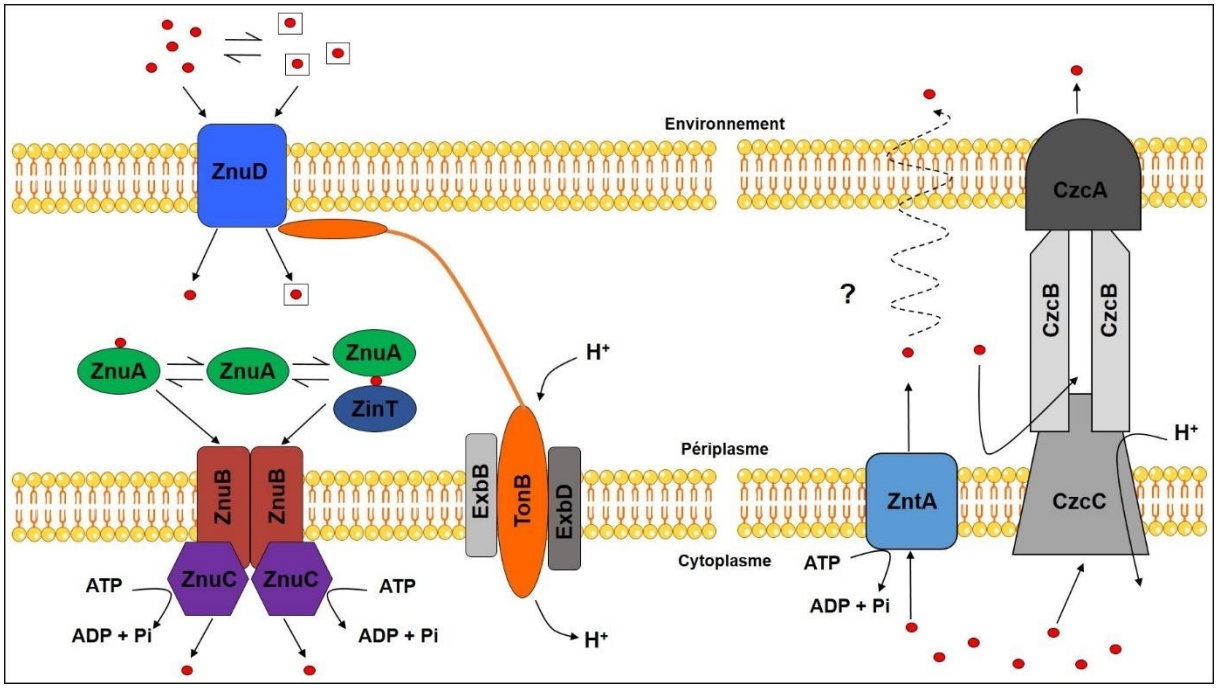


Figure I. 18 : Protéines impliquées dans l'import et l'export du zinc.

Mécanisme d'import du zinc à travers la membrane externe par l'OMP ZnuD. Le zinc est ensuite pris en charge par le système ZnuABC pour être importé dans le cytoplasme (gauche). Transport dans le périplasme du zinc par le transporteur ZntR dépendant de ZntA. Mécanisme d'export du zinc par le système CzcABC utilisé par la bactérie *Cupriavidus metallidurans* (droite). Les points rouges représentent le zinc et les carrés autour illustrent le zinc chélaté ou complexé à une molécule.

L'export du zinc chez les bactéries est encore moins bien décrit dans la littérature que son import et les mécanismes mis en jeu restent sujets à hypothèse. Chez les bactéries à gramnégatif, un des gènes directement régulés par ZntR, *zntA*, code pour une ATPases de type P exportant hors du cytoplasme, de manière active le zinc, le cadmium et le plomb (Sharma *et al.*,

2000; Wang *et al.*, 2012). Une fois dans le périplasme, le mécanisme d'expulsion du zinc vers le milieu extracellulaire n'est pas connu pour *E. coli* (Figure I. 18 à droite). Chez d'autres organismes qui sont résistants à de fortes concentrations de métaux comme *Cupriavidus metallidurans*, l'export du zinc est dû aux gènes de l'opéron *cation efflux system* (*czc*). Cet opéron code pour la protéine de la membrane interne CzcD qui a un rôle homologue à celui de ZntA chez *E. coli* (von Rozycki & Nies, 2009). Les gènes *czcABC* codent pour un transporteur tripartite composé du transporteur d'efflux CzcC au niveau de la membrane interne, de la protéine adaptatrice CzcB dans le périplasme et de la protéine canal de la membrane externe CzcA. Ce type de transporteur est capable d'exporter le zinc cytoplasmique et périplasmique au niveau du milieu externe (Figure I. 18 à droite). Ce transporteur n'est pas spécifique du zinc et permet aussi l'efflux du cadmium et du plomb. Le gène codant pour CzcA est présent chez *E. coli* mais les gènes *czcB* et *czcC* n'ont pas encore été identifiés. Ces données confirment que la concentration cytoplasmique en zinc est finement régulée chez une bactérie telle qu'*E. coli*.

4. Les métallochaperons

Les métaux de transition sont importants pour les bactéries mais si le réservoir de métaux n'est pas contrôlé, des réactions dangereuses (causant par exemple la production d'espèces réactives de l'oxygène) peuvent avoir lieu (Zeer-Wanklyn & Zamble, 2017). Ainsi le zinc, à trop forte concentration a tendance à remplacer les autres cations divalents au sein des métalloprotéines, dérégulant leur activité. De même, le zinc peut se lier de façon aspécifique sur des domaines qui ne sont pas censés lier de métal, modifiant ainsi la fonction cellulaire de protéines (Waldron *et al.*, 2009). La maîtrise du réservoir de métaux passe par un stockage et un guidage des ions métalliques vers leurs métalloprotéines cibles. L'analyse génétique des génomes bactériens a révélé une classe de protéines essentielles pour l'insertion posttraductionnelle de cofacteurs métalliques au sein des métalloprotéines (O'Halloran & Culotta, 2000). Ces protéines ont été nommées « métallochaperons » en référence aux

chaperons moléculaires qui assistent le repliement des protéines. Les métallochaperons diffèrent des protéines de stockage de métaux (bacterioferritines ou métallothionéines) dans le fait qu'ils transportent de manière spécifique le métal vers une apo-métalloprotéine, permettant son activation ou sa maturation (Lacasse & Zamble, 2016; Capdevila *et al.*, 2017).

4.a. Les métallochaperons cytoplasmiques

Parmi les métallochaperons les plus étudiés figurent les métallochaperons à nickel impliqués dans la maturation de l'hydrogénase à nickel-fer ([Ni-Fe]) et de l'uréase de la bactérie pathogène *Helicobacter pylori (H. pylori)*. La protéine *Hydrogenase maturation protein A* (HypA) intervient dans les deux processus mais n'est un métallochaperon que pour la maturation du centre nickel-fer de l'hydrogénase [Ni-Fe] (Lacasse & Zamble, 2016). En effet, dans le cytoplasme la protéine *Hydrogenase maturation protein B* (HypB) lie, sur un site à haute affinité, du Ni^{2+}. L'hydrolyse du GTP par HypB permet le transfert du Ni^{2+} sur HypA qui va pouvoir s'amarrer à l'hydrogénase précoce pour transférer le Ni^{2+} au niveau du centre catalytique (Figure I. 19 A). La liaison et le transport du Ni^{2+} par HypA est zinc dépendante (Johnson *et al.*, 2015). Chez *H. pylori*, HypA a aussi un rôle dans l'apport du nickel au centre catalytique de l'uréase mais ce rôle est plus indirect. L'uréase est la protéine permettant la résistance au stress acide. En catalysant la dégradation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac elle crée une zone ou le pH local est supérieur au pH de l'estomac (Backert *et al.*, 2016). Le Ni^{2+}, qui permet l'activation de l'uréase, est acheminé vers le site catalytique par les protéines accessoires de l'uréase UreEFGH (Musiani *et al.*, 2017). HypA permet le maintien de la coordination du Ni^{2+} sur le dimère de UreE en conditions de stress acide (Hu *et al.*, 2018).

Ainsi, lors du passage de *H. pylori* dans l'estomac, UreE peut amener le nickel au complexe UreGHF qui, par hydrolyse de l'ATP, activera l'apo-uréase (Figure I. 19 B). Dans ce cas, le Ni^{2+} n'est pas transféré par HypA mais plutôt par UreE qui est donc aussi un exemple de métallochaperon cytoplasmique spécifique de l'uréase. L'usage de métallochaperons pour un métal aussi réactif, toxique, et dangereux (pour la cellule) que le nickel est tout à fait intuitif.

D'ailleurs, il existe plus d'études sur des métallochaperons qui transfèrent des métaux de transition peu abondants mais toxiques (cuivre et nickel) que sur des métallochaperons à métaux abondants comme le zinc.

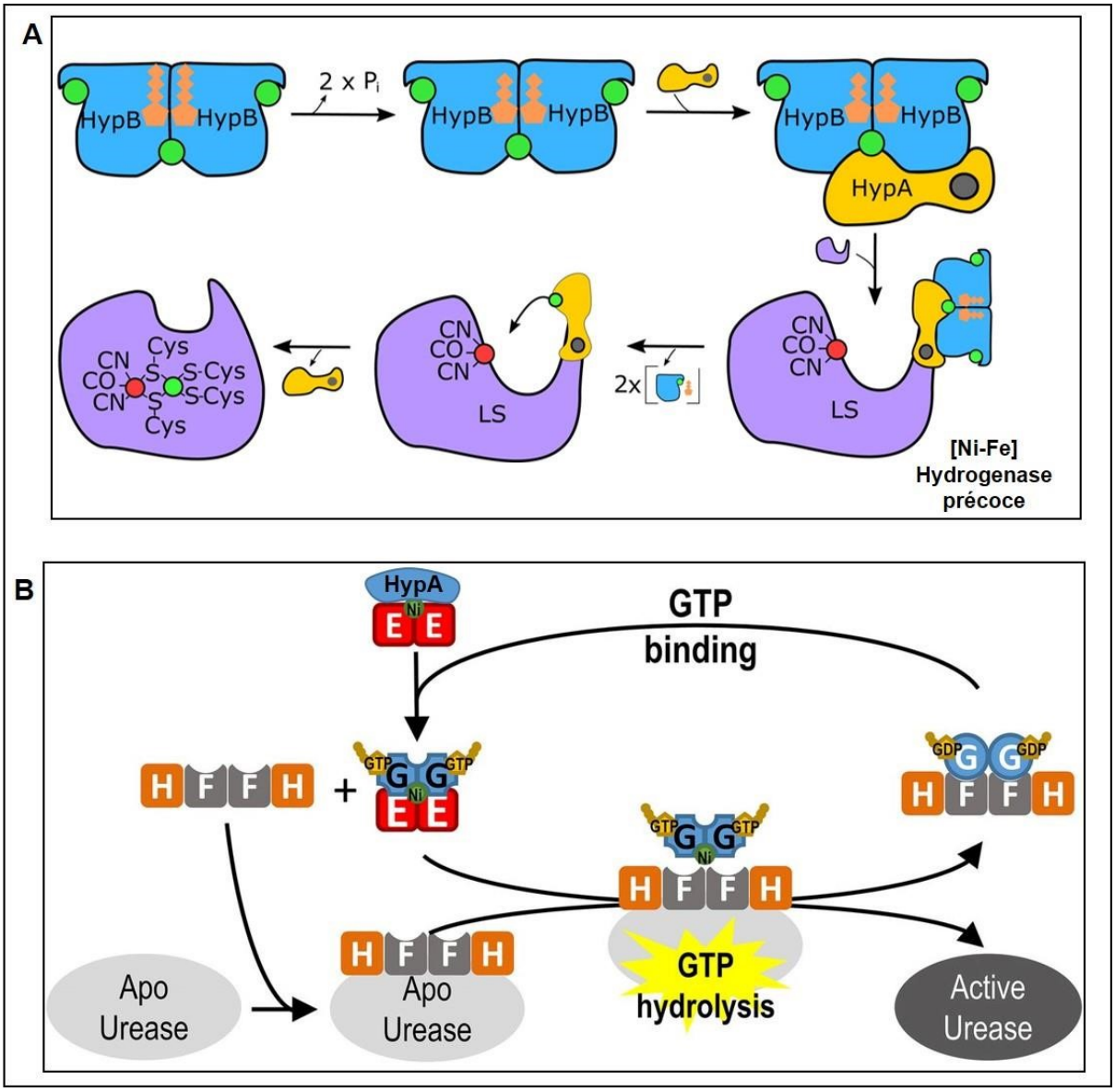


Figure I. 19 : Exemples de mécanismes impliquant des métallochaperons cytoplasmiques.

Transport du nickel de HypA vers le centre catalytique de l'hydrogénase [Ni-Fe] précoce. Le Ni^{2+} est représenté par des points verts et le Fe^{2+} par des points rouges. Le terme LS souligne le fait que HypA s'amarre à la grande sous-unité de l'hydrogénase. Figure adaptée de Lacasse & Zamble, 2016 (A). Transfert du Ni^{2+} par UreE vers le complexe UreGHF d'activation de l'uréase de H. pylori. Figure adaptée de Yuen et al., 2017 (B).

4.b. Les métallochaperons périplasmiques

Dans le périplasme, la concentration en zinc étant plus proche de la concentration extracellulaire que cytoplasmique, l'emploi de métallochaperons à zinc semble plus plausible pour capter et distribuer ce métal au niveau des métalloprotéines cibles, notamment en

conditions de carences ou d'excès de zinc. Chez la bactérie à gram-négatif *Paracoccus denitificans*, en conditions de carence en zinc, l'opéron *aztABC* est surexprimé. Cet opéron code pour les trois composants d'un transporteur ABC (AztA est une ATPase, AztB est une perméase de la membrane interne et AztC une SBP liant le zinc). Un autre gène adjacent à l'opéron, *aztD*, code pour une hypothétique protéine périplasmique dont l'expression est décuplée suite à une carence en zinc. L'étude de cette protéine périplasmique montre qu'il s'agit d'une métalloprotéine fixant du zinc et qui interagit avec la SBP AztC. La confirmation de son rôle de métallochaperon passe par le fait qu'elle transfère le zinc capté à AztC (Handali *et al.*, 2015; Neupane *et al.*, 2017). Ainsi, en carence de zinc périplasmique, AztC transporterait le zinc vers le complexe membranaire pour l'internaliser dans le cytoplasme (Figure I. 20 A). L'activité de la protéine AztD rappelle celle de ZinT en tant que co-SBP du système d'import du zinc ZnuABC (Figure I. 18, page 48). Une recherche d'homologie de séquence au sein des bactéries montre qu'AztD partage 64% d'identité avec la protéine ZinT issue de la bactérie marine *Aureimonas jatrophae* (BlastP, NCBI). Toutefois, il n'a pas été démontré que ZinT transfère le zinc vers ZnuA, ce qui est essentiel à la définition d'un métallochaperon. AztD est un des premiers exemples de métallochaperon à zinc périplasmique même si des chaperons périplasmiques spécifiques d'autres ions métalliques, comme la protéine PccA, avaient été décrits auparavant. PccA est une protéine périplasmique issue de la bactérie *Rhodobacter capsulatus*; elle a été décrite comme favorisant l'activité de la *Cu_B-heme b binuclear center cytochrome C oxidase* (cbb_3-Cco), le dernier accepteur d'électron de la chaine respiratoire (Cobine *et al.*, 2006). Le complexe cbb_3-Cco est formé de quatre protéines CcoN (le centre catalytique), CcoO, CcoP et CcoQ. Les études sur PccA ont montré que ce métallochaperon fixe de préférence le Cu^+ par rapport au Cu^{2+} et interagit (*in vivo* et *in vitro*) avec la protéine membranaire SenC pour transférer le Cu au centre catalytique de CcoN (Figure I. 20 B, Trasnea *et al.*, 2016). Des avancées récentes sur ce système montrent même qu'il y a un échange du Cu^+ entre PccA et SenC confirmant le rôle de métallochaperon à cuivre de PccA (Trasnea *et al.*, 2018).

Les métallochaperons périplasmiques semblent donc être importants pour la cellule lorsqu'il est nécessaire de transporter des métaux vers des transporteurs ou des enzymes mais aucun métallochaperon impliqué dans l'export ou l'apport de métaux vers des systèmes senseurs n'a encore été découvert.

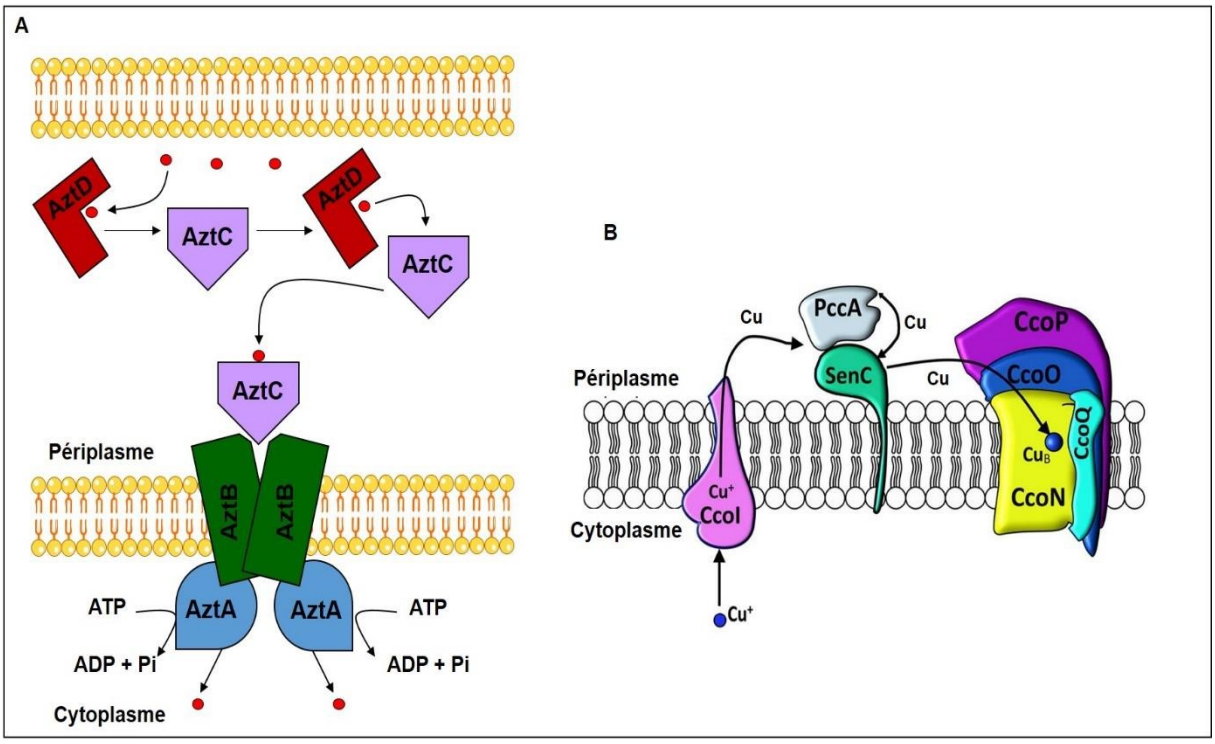


Figure I. 20 : Exemples de mécanismes impliquant des métallochaperons périplasmiques.

Régulation de l'import du zinc à travers le transporteur AztABC par le métallochaperon AztD Les points rouges représentent du zinc (A). Distribution du Cu(I) périplasmique par le métallochaperon à cuivre PccA à SenC pour la formation du site catalytique du cbb_3-Cco. Le cuivre est réduit lors du passage du cytoplasme au périplasme à travers la protéine membranaire CcoI avant d'être captée par PccA. Les points bleus représentent le cuivre. Figure issue de Trasnea et al., 2018 (B).

État des connaissances sur le système Zra

1. Découverte du système Zra

La découverte du système Zra a commencé de façon indirecte par l'identification d'un facteur de transcription de la bactérie *Proteus mirabilis* appelé *Proteus mirabilis transcription regulator* (PMTR). L'expression hétérologue de PMTR chez *E. coli* cause une tolérance accrue à des concentrations inhibitrices de zinc qui est accompagnée par l'accumulation d'une protéine périplasmique de 12 kDa. Ce phénotype a inspiré le nom de la protéine *zinc resistance associated protein* (ZraP) et par la suite un rôle d'éponge à zinc lui a été assigné (Noll *et al.*, 1998). Cette hypothèse s'appuie sur une étude montrant que le zinc lié à ZraP correspond à 71% du zinc lié à des métalloprotéines (Sevcenco *et al.*, 2011). L'expression de *zraP* est régulée par un système à deux composants, d'abord identifié comme HydH et HydG puis renommé ZraS et ZraR. Ce système répond à des fortes concentrations de zinc de plomb et dans une moindre mesure, de cadmium. ZraR et ZraS correspondent respectivement à un régulateur transcriptionnel cytoplasmique σ^{54} dépendant et la protéine senseur histidine kinase associée.

La détermination de la séquence d'ADN reconnue par ZraR a montré qu'il se lie sur une région de l'ADN qui contient les promoteurs de l'opéron *zraSR* et celui de *zraP* (Leonhartsberger *et al.*, 2001).

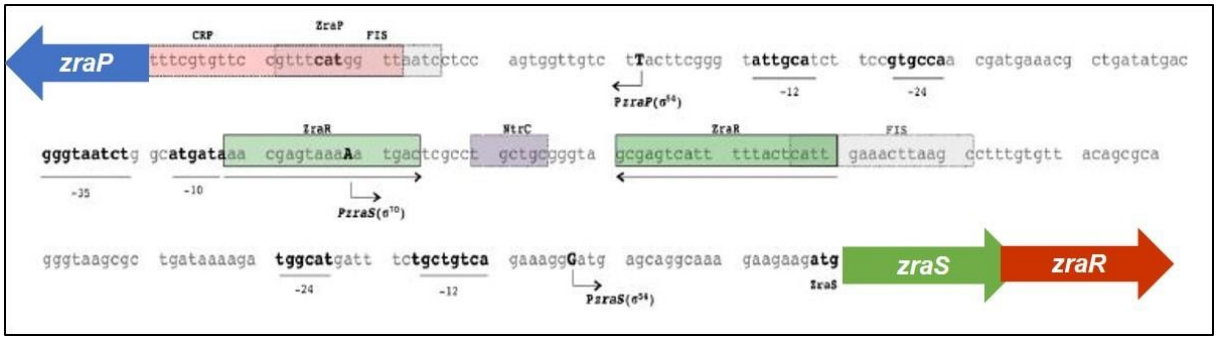


Figure I. 21 : ZraR régule le système à deux composants ZraRS et ZraP.

Représentation de la région intergénique adaptée à partir des données (Prodoric virtual footprint). Les codons d'initiation et de traduction de ZraP et ZraS sont indiqués. Les séquences d'ADN reconnues par ZraR sont encadrées en vert. Les promoteurs de *zraP* (*PzraP*) et *zraS* (*PzraS*) et les sites de fixation des facteurs sigma associés sont représentés en gras. Les sites de fixation prédits à l'aide du serveur prodoric de FIS, NtrC et CRP sont respectivement en gris, violet et rouge.

2. Description des différents composants du système Zra

2.a. Le régulateur transcriptionnel ZraR

La régulation de l'expression des gènes du système Zra est effectuée par le régulateur transcriptionnel ZraR (Leonhartsberger *et al.*, 2001). Cette protéine est décrite comme un activateur de la transcription σ^{54} dépendant. Une fois activé par phosphorylation il se lie à l'ADN ce qui permet le recrutement de l'ADN polymérase-σ^{54} et la transcription (Figure I. 22 A). ZraR est un facteur de transcription de la famille des *bacterial enhancer binding proteins* (bEBP). Ces régulateurs se lient de 80 à 250 paires de bases en amont de leur promoteur cible au niveau d'une séquence activatrice (Figure I. 22 A rectangle jaune). Ce sont des protéines modulaires en général composées de trois domaines : un domaine de régulation de l'activité du régulateur en N-terminal, un domaine central AAA+ responsable de l'hydrolyse de l'ATP indispensable pour la formation du complexe polymérase-σ^{54} et un domaine de liaison de l'ADN en C-terminal qui est composé d'un motif hélice-tour-hélice permettant la reconnaissance de la séquence où se lie le régulateur (Bush & Dixon, 2012). La structure du domaine AAA+ et du domaine de fixation à l'ADN de ZraR (Figure I. 22 B) a été résolue par cristallographie aux rayons X (Sallai & Tucker, 2005). Cette structure révèle que ZraR, comme les autres bEBP s'associe en hexamère, par le domaine AAA+ afin de se lier à l'ADN.

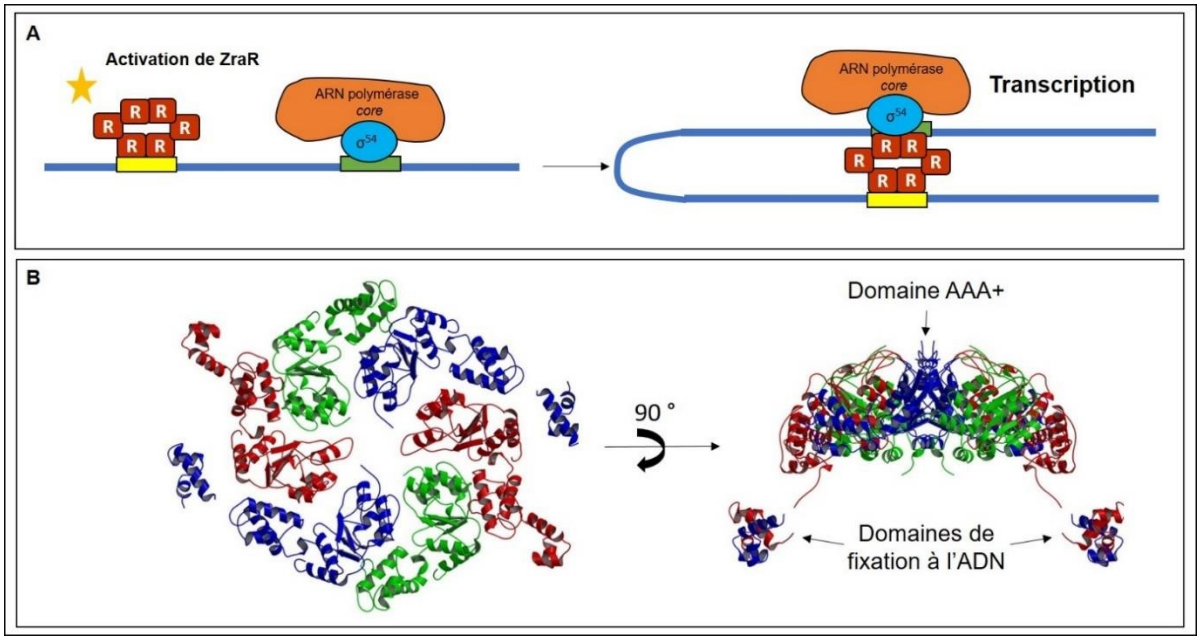


Figure I. 22 : ZraR, un facteur de transcription de la famille des bEBP.

Représentation schématique de l'activation de la transcription par un activateur transcriptionnel σ^{54} dépendant du type de ZraR. Le trait bleu représente l'ADN, les rectangles jaune et bleu indiquent les séquences d'ADN reconnues respectivement par ZraR et l'ARN polymérase-σ^{54}. Les carrés rouges représentent les monomères de ZraR (A). Structure des domaines AAA+ et de fixation à l'ADN de ZraR (B).

2.b. Le senseur histidine kinase ZraS

Les connaissances sur ZraS sont essentiellement liées à son homologie de séquence avec d'autres histidine kinases. En effet, excepté l'identification de ZraS comme étant une protéine intégrale de la membrane interne lors des premières études sur le système Zra, aucun article ne s'est focalisé sur ce composant du système Zra (Leonhartsberger *et al.*, 2001). Nos connaissances sur ZraS se limitent donc au fait que la protéine contient deux domaines transmembranaires et un domaine dans le périplasme d'environ 20 kDa. Il a été montré que ZraS peut être directement activée par la présence de zinc dans le milieu (Petit-Hartlein *et al.*, 2015) ce qui suggère qu'elle possède au moins 1 site de liaison à cet ion métallique au niveau du domaine périplasmique. La liaison du le zinc sur ce domaine qui contient cinq histidines va causer son autophosphorylation au niveau du domaine DHp. Le phosphate serait ensuite transféré à ZraR afin de l'activer par l'activité phosphatase du domaine CA se trouvant en Cter (voir Figure I. 14).

2.c. ZraP

La délétion de *zraP* causant une augmentation de l'activité de ZraR en présence de zinc, ZraP a été proposée comme étant un inhibiteur de l'activation du système Zra à l'instar de CpxP pour le système Cpx.

Comme indiqué précédemment ZraP a très rapidement été identifiée comme étant une métalloprotéine liant le zinc. Des études menées au laboratoire ont montré que ZraP issue de *E. coli* est octamérique et qu'il possède quatre sites de liaison à haute affinité (Petit-Hartlein *et al.*,
2015). Ce résultat suggère que les sites de liaison se situent à l'interface entre deux sous-unités. Par ailleurs, il a été montré que l'histidine H1 est impliquée dans la coordination du zinc, les autres ligands étant probablement les azotes de la chaîne principale.

Plusieurs états oligomériques ont été décrits. La protéine ZraP issue de *Salmonella enterica* a été purifiée sous forme heptamérique alors que l'ajout d'un excès de zinc cause une association oligomérique impliquant quinze monomères (Appia-Ayme *et al.*, 2012). De son côté ZraP de *E. coli* a été purifiée sous forme octamérique sans que l'ajout de zinc ne modifie son état d'oligomérisation. L'étude de variants suggère que l'oligomérisation de ZraP se ferait par tétramérisation de dimères de ZraP au niveau des domaines C-ter composés de boucles désordonnées (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). En effet, le variant ZraPΔCter qui ne contient pas les sept derniers résidus est sous forme dimérique. Par ailleurs, la seule cystéine de ZraP forme, *in vitro*, un pont disulfure. Des études par ultracentrifugations analytique ont montré que la substitution de la cystéine par une alanine conduit à une déstabilisation de l'octamère et à l'apparition de dimères différents. Cela suggère que le pont disulfure est formé entre les sousunités de deux dimères différents, d'autant plus que l'ajout de zinc au variant conduit à un retour à l'état octamérique. Le rôle de cette cystéine *in vivo* reste cependant inconnu. En effet, l'expression du variant dans *E. coli* ne modifie pas la capacité d'inhibition du système Zra par rapport à la forme sauvage. Au contraire, l'expression des variants ZraPH1A (qui lie moins de zinc que le ZraP natif) et ZraPΔCter conduisent à une forte augmentation de l'activité de ZraR qui est comparable à celle de la souche délétée pour *zraP* (Petit-Hartlein *et al.*, 2015).

La structure cristallographique de ZraP issue de *S. enterica* a été résolue (code PDB : 3LAY) par un consortium de génomique structurale mais aucun article n'a été publié. Cette structure montre que le monomère de ZraP est composé de deux hélices α antiparallèles. L'absence des

extrémités en N-ter et en C-ter dans la structure indique qu'elles sont désordonnées. Dans le cristal, ZraP est associée en pentamère de dimères et forme une boule aplatie avec une cavité au centre (Figure I. 23 B). Cette organisation en hélices antiparallèles rappelle celle des protéines chaperons périplasmiques *spheroplast protein y* (Spy) et CpxP (Figure I. 23 A). Comparé à ZraP, seule la boucle désordonnée en C-ter est différente puisqu'elle est chez Spy et CpxP repliée en hélice α. La réelle différence entre ces protéines vient de leur état d'oligomérisation. En effet, Spy et CpxP sont dimériques et forment un « berceau » leur permettant de se lier à leurs protéines cibles (Figure I. 23 B).

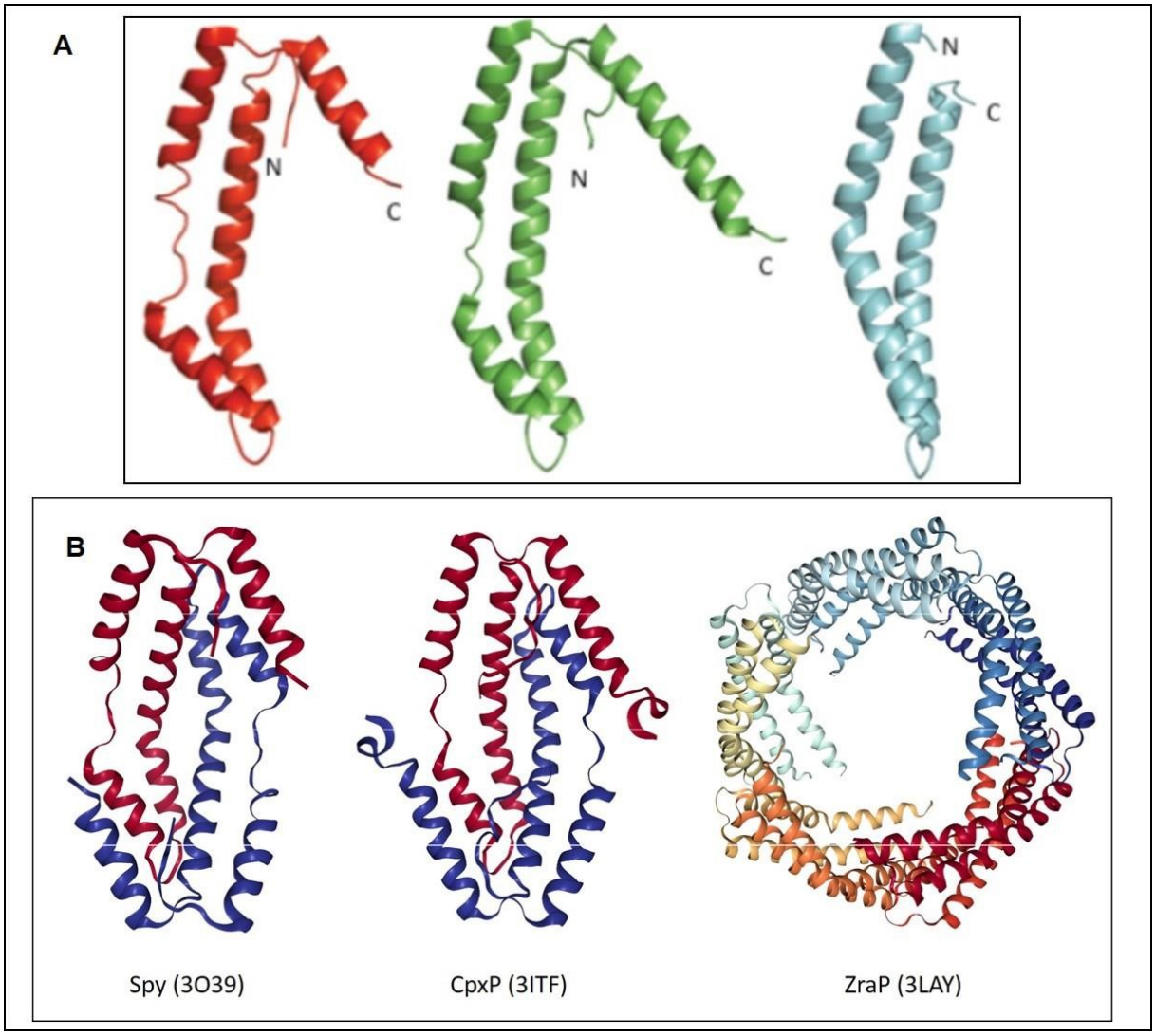


Figure I. 23 : Comparaison des structures des potentiels homologues structuraux Spy, CpxP et ZraP. Les codes PDB sont indiqués entre parenthèses.

Structures cristallographiques des monomères (A) et des oligomères (B) de Spy (3O39 à gauche), CpxP (3ITF au centre) et ZraP (3LAY à droite).

Deux études indépendantes ont montré qu'*in vitro*, ZraP, issu de *S. enterica* ou *E. coli*, est capable de protéger la MDH de la dénaturation thermique. Cette activité est même potentialisée lorsque ZraP est incubé avec du zinc (Appia-Ayme *et al.*, 2012; Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Le fait que ZraP protège la MDH, de la dénaturation suggère un possible rôle chaperon périplasmique, et la rapproche encore de Spy et CpxP. Spy est une des protéines les plus exprimées au sein du périplasme lors d'un stress affectant l'enveloppe bactérienne (Jeong *et al.*, 2017) et le gène *spy* est régulée par le système à deux composants BaeSR. Spy est une des protéines à activité *holdase* dont le mécanisme d'action est le plus étudié. Dans un compartiment sans ATP comme le périplasme, l'activité chaperon passe par une fixation du chaperon à la protéine sensible afin d'empêcher son agrégation. Spy est capable, *in vitro*, de protéger de la dénaturation la MDH mais également de permettre sa renaturation suite à un effet de température ou un stress. Par ailleurs, des études, *in vivo*, ont montré que l'expression de *spy* permet de renaturer une protéine chimère composée d'une β-lactamase fusionnée avec un variant de la protéine Im7 constitutivement mal repliée. La surexpression de *spy* dans une souche produisant cette protéine chimère permet de recouvrir une activité β-lactamase et d'induire une résistance aux β-lactames (Quan *et al.*, 2011). L'activité chaperon de Spy a aussi été montrée avec d'autres protéines du périplasme telles que DsbB qui forme les ponts disulfures de protéines périplasmiques comme PhoA ou encore OmpA (Quan *et al.*, 2011). Spy est donc considérée comme un archétype de protéine chaperon périplasmique (Quan *et al.*, 2014; Koldewey *et al.*, 2016). La protéine CpxP, régulatrice de l'activité du système à deux composants CpxAR est aussi capable d'empêcher la dénaturation thermique de la MDH mais son rôle chaperon semble se limiter à cette activité, son rôle régulateur étant prépondérant (Hunke *et al.*, 2012).

2.d. Rôle du système Zra

Malgré un lien certain entre le système Zra et le zinc, il n'a pas été possible de montrer l'implication de ce système dans la résistance de *E. coli* à des fortes concentrations de zinc. En effet, les mutants délétés individuellement pour les gènes codant pour les protéines du système Zra (*zraP*, *zraS* et *zraS*) ont la même concentration minimale inhibitrice pour le zinc et le cuivre que la souche sauvage (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Ce résultat diffère de la première étude portant sur ZraP qui montrait une directe corrélation entre la croissance avec un excès de zinc et la concentration de ZraP produite (Noll *et al.*, 1998).

Les récentes études montrent que ZraP et CpxP, présentent des activités chaperons *in vitro* au même titre que Spy. Cette activité n'a pas été confirmée *in vivo* mais certaines données indiquent que ZraP et CpxP pourraient participer à la réponse aux stress d'enveloppe. En effet, des expériences de survie à la polymyxine B, un antibiotique perturbant la membrane bactérienne, ont montré que la délétion des gènes *spy*, *cpxP* et *zraP* affecte la survie bactérienne (Appia-Ayme *et al.*, 2012). Le rôle chaperon potentiel de ZraP ainsi que son implication dans la survie au stress antibiotique fait donc penser que le système Zra serait un système à deux composants de réponse aux stress d'enveloppe (ESR) (Figure I. 24 A). Cela a fait l'objet d'une publication, en révision, à laquelle j'ai collaboré et qui est présentée à la fin de la thèse.

But de la thèse :

Les protéines ZraP et ZraR ont été étudiées séparément, par nous et par d'autres, mais aucun travail n'a encore concerné l'étude de la protéine membranaire ZraS et son mécanisme d'activation. Il reste donc encore beaucoup d'interrogations sur l'activation ainsi que la régulation de ce système (Figure I. 24 B). Lors de ma thèse j'ai concentré mes recherches sur le domaine périplasmique de ZraS. Nous avons d'abord voulu comprendre comment le zinc active le système Zra mais aussi par quel moyen la protéine ZraP influe sur cette activation par le zinc d'un point de vue moléculaire. Pour cela, (i) la caractérisation biochimique du domaine périplasmique de ZraS a été effectuée et l'influence du zinc sur ce domaine a été observée. Nous avons aussi tenté de déterminer quels sont les résidus de ce domaine qui permettent la liaison du zinc ; (ii) par une approche *in vivo* et *in vitro*, nous avons voulu avoir une meilleure compréhension du rôle régulateur de ZraP sur le système Zra. Ce travail s'inscrit dans l'objectif de mieux comprendre les différents mécanismes d'activation des différents systèmes de réponse

aux stress d'enveloppe.

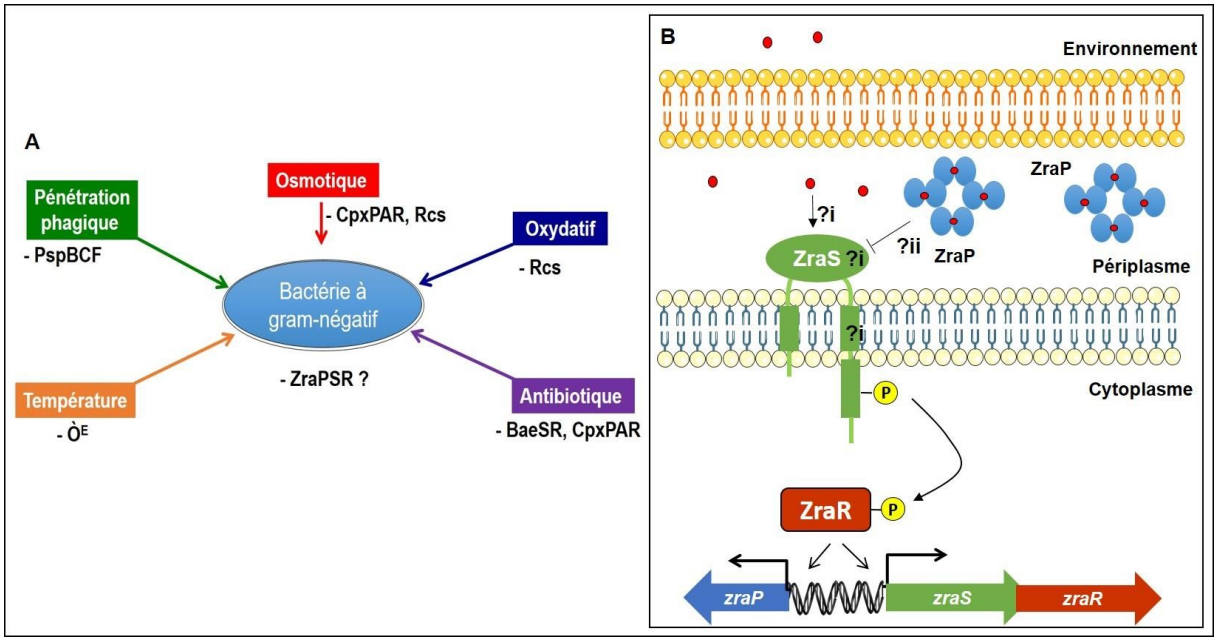


Figure I. 24 : Etat des connaissances sur le système Zra, un probable système de réponse aux stress d'enveloppe.

Schéma montrant le rôle dans la réponse au stress d'enveloppe des cinq principaux systèmes de réponse aux stress d'enveloppe (A). Schéma de l'état des connaissances sur l'activation par le zinc du système Zra. Les points rouges représentent le zinc (B). Les points d'interrogations représentent les deux questions essentielles auxquelles nous avons essayé de répondre lors de ma thèse (i (i?) ; ii (ii ?)).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Liste des figures du matériel et méthodes :

Figure MM. 1 : Protocol de ligation sans ligase. 71

Figure MM. 2 : Schéma récapitulatif du mSPINE. 80

Figure MM. 3 : Schéma récapitulatif du dosage du zinc au PAR. 83

Figure MM. 4 : Principe du dichroïsme circulaire. 86

1. Méthodes de microbiologie

1.a. Souches bactériennes, milieux de culture et plasmides

Les souches utilisées lors de cette étude sont :

- *E. coli* BL21(DE3) : *E. coli* B F-dcm ompT lon hsds
- *E. coli* XL10Gold : endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB $lacI^qZ$ΔM15 Tn10(Tet^R Amy Tn5(Kan^R)]
- *E. coli* DH5α : F– endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK–mK+), λ–
- *E. coli* W3110 : F-mcrAmcrB (rrnD-rrne) 1 λ
- *E. coli* W3110*ΔzraR :* F-mcrAmcrB (rrnD-rrne) 1 λ *ΔzraR*
- *E. coli* W3110*Δzra : P* F-mcrAmcrB (rrnD-rrne) 1 λ *ΔzraP*

Dans la souche DH5α, les gènes *endA1* et *hsdR*, codant pour une endonucléase, ont été mutés permettant ainsi la surproduction et l'accumulation d'ADN plasmidique. L'inactivation du gène *recA1* empêche aussi la recombinaison homologue qui pourrait causer des mutations sur les plasmides introduits. Cette souche est utilisée pour constituer un stock d'ADN plasmidique.

La souche XL10Gold possède les mêmes caractéristiques de multiplication de l'ADN plasmidique mais est mieux adaptée pour la transformation avec des plasmides modifiés par mutagénèse dirigée. Cette souche est délétée pour les gènes *hsdR*, *hsdS*, *mcrA*, *mcrB* et *mcrC* qui dégradent l'ADN non méthylé. Cette souche est intéressante quand il y a très peu de plasmide comme suite à la production de mutants par PCR.

La souche BL21(DE3) est utilisée dans le but de produire une protéine dont le gène a été cloné en aval du promoteur reconnu par l'ADN polymérase du phage T7. Le gène de la polymérase, (codé sur le λDE3) a été introduit dans l'ADN génomique, sous le contrôle du promoteur lacUV5, inductible par l'IPTG. La transcription du gène d'intérêt sur le plasmide est également inductible à l'IPTG. Les souches de *E. coli* ont été cultivées dans du milieu Luria-Bertani (LB) ; la composition pour 1 L est : 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 5

g de NaCl, 20 g d'agar à pH 7. Le cas échéant, l'ampicilline est ajoutée à 100 µg/mL et le chloramphénicol à 34 µg/mL aux milieux de culture.

Les plasmides utilisés dans cette étude sont présentés dans la Table 1.

Plasmides	**Vecteur d'expression**	**Phase ouverte de lecture surexprimée**	**Gène de résistance**	**Source**
pET15b-*zraPm*	pET15b	ZraP mature	Amp_R	(Petit-Hartlein *et al.*, 2015)
pET15b-*zraPΔCter*	pET15b	ZraPΔCter	Amp^R	(Petit-Hartlein *et al.*, 2015)
pET15b-*zraPH1a*	pET15b	ZraPH1A	Amp^R	(Petit-Hartlein *et al.*, 2015)
pET15bzraP*ΔCterC104A*	pET15b	ZraPΔCterC104A	Amp^R	Cette étude
pRT14	pBad18	ZraP complet	Cmr_R	Cette étude
pRT26	pBadM30	ZraP complet	Amp^R	Cette étude
pRT13	pASK-IBA7+	ZraSp	Amp^R	Cette étude
pRT15	pASK-IBA7+	ZraSpH73AH74A	Amp^R	Cette étude
pRT16	pASK-IBA7+	ZraSpH104A	Amp^R	Cette étude
pRT17	pASK-IBA7+	ZraSpH159AH162A	Amp^R	Cette étude
pRT18	pASK-IBA7+	ZraSpH73A	Amp^R	Cette étude
pRT19	pASK-IBA7+	ZraSpH74A	Amp^R	Cette étude
pRT20	pASK-IBA7+	ZraSpH159A	Amp^R	Cette étude
pRT21	pASK-IBA7+	ZraSpH162A	Amp^R	Cette étude
pRT22	pASK-IBA7+	ZraSpH73AH159AH162A	Amp^R	Cette étude
pRT23	pASK-IBA7+	ZraSpH73AH159AH162AC167A	Amp^R	Cette étude
pRT24	pASK-IBA7+	ZraSpC167A	Amp^R	Cette étude
pRT25	pACYCduet	ZraS	Cmr^R	Cette étude
pRT27	pACYCduet	ZraS-strep	Cmr^R	Cette étude

Table 1 : Plasmides utilisés.
Dans les pET15b, le gène zraP a été cloné entre les sites BspHI et XhoI et entre les sites SacI et SalI des pBad18 et pBadM30. Le gène zraSp a été cloné entre les sites BsaI du plasmide pASK-IBA7+. Le gène zraS a été cloné entre les sites SacI et SalI du pACYCduet.

1.b. Conditions de culture et de conservation des souches

Les cultures ont été effectuées à 37°C en milieu LB. Pour assurer une croissance en bonne aération, la culture a été réalisée en milieu liquide dans des erlenmeyers remplis au 1/5ème. Les cultures ont été inoculées au 1/100ème à partir d'une pré-culture cultivée dans des conditions analogues à celles de la culture finale. Pour les croissances sur milieu solide, les boîtes de Pétri ont été incubées une nuit à 37°C en aérobiose. Le nombre de bactéries a été estimé par mesure de la turbidité, exprimée en unité de densité optique à 600 nm ($DO_{600\ nm}$). Une $DO_{600\ nm}$ de 1 correspond à $4{,}5.10^8$ bactéries par mL. Les souches ont été conservées à 4°C sur boîtes de Pétri ou à -80°C en présence de 30% de glycérol.

1.c. Stress bactérien en présence de Polymyxine B

50 mL de LB, supplémenté avec 34 µg/mL de chloramphénicol, ont été inoculés avec des cellules *E.coli* W3110 ou W3110*ΔzraR* contenant le plasmide pRT14 (voir Table 1) comme décrit dans la partie 1.b. La production de ZraPr a été induite en présence de 0,02% d'arabinose inoculé à 1/100ème au début de la culture. Lorsque la culture a atteint une $DO_{600\ nm}$ de 0,4, les cultures ont été traitées ou non traitées avec 2 µg/mL final de polymyxine B puis cultivées à 37°C et 200 rpm durant 1h. Ensuite, les différentes cultures ont été diluées d'un facteur 10, par des dilutions successives, de 10^2 à 10^8 puis des gouttes de 10 µL ont été déposées sur des boîtes de Pétri contenant du LB gélosé. Le nombre de colonies dans les 10 µL a été pris en compte quand la goutte contenait entre 4 et 40 colonies.

2. Méthodes de biologie moléculaire

2.a. Extraction et purification d'ADN plasmidique

Les cellules compétentes *E. coli* DH5α ont été transformées et étalées sur une boîte de Pétri contenant du LB-gélosé supplémenté avec l'antibiotique approprié comme décrit dans la Table 1. Une seule colonie a été inoculée du milieu LB pour une culture sur la nuit à 37°C. Les cellules en phase stationnaire ont été isolées par centrifugation (5 min, 5000 rpm à 4°C) et

le kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel®) a été utilisé pour purifier les plasmides. Les cellules sont resuspendues dans un tampon contenant de la RNase avant d'être soumises à une lyse alcaline, ainsi qu'une précipitation de l'ADN génomique et des protéines par l'acide acétique. L'ADN génomique et les protéines ont alors été éliminés par centrifugation, et le surnageant a été déposé sur une colonne comportant une membrane de silice, permettant une adsorption de l'ADN, en présence d'une forte concentration en sel. Après avoir été lavé à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ADN plasmidique a été élué avec un tampon de faible force ionique (eau ou tampon d'élution du kit : Tris 10 mM, pH 8,5). La concentration de l'ADN plasmidique purifié a été mesurée à partir de l'absorbance à 260 nm. Le plasmide a été alors stocké à –20°C.

2.b. Clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide

Digestion par les enzymes de restriction : Ce sont des enzymes qui reconnaissent des séquences palindromiques particulières d'ADN bicaténaire qu'elles clivent. Ce clivage peut donner des bords francs ou des extrémités cohésives (5' ou 3' débordant). Les enzymes ont été utilisées à raison de 1 à 5 unités (U) par échantillon pour 500 ng d'ADN dans les tampons recommandés par le fournisseur. Les coupures ont été réalisées pendant 30 min à 37°C. Pour éviter que les plasmides se circularisent de nouveau, une déphosphorylation des extrémités digérées a été effectuée par de la phosphatase alcaline selon le protocole défini par le fournisseur (Thermo Fisher Scientific®).

Purification du fragment d'ADN : Le mix contenant les fragments d'ADN digérés partiellement ou totalement ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande correspondant au plasmide digéré a été excisée du gel puis purifiée à l'aide du kit Nucleospin Extract (Macherey-Nagel®). La purification est basée sur l'absorption différentielle de l'ADN sur colonne de silice qui retient l'ADN et permet d'éliminer l'agarose, les sels et les impuretés issues de la séparation par électrophorèse. Le fragment a été élué dans un tampon contenant du Tris-HCL 10 mM pH 8,5.

Ligation : Le fragment d'ADN à insérer et le plasmide ont été digérés par les mêmes enzymes de restriction ou par des enzymes qui génèrent des extrémités compatibles. La ligation a été réalisée à 22°C et s'opère par l'action de 1 unité d'ADN ligase du phage T4 (Invitrogen®) créant une liaison phosphodiester entre les extrémités 5' phosphate et 3' hydroxyle en

présence d'ATP. Afin d'éviter que le vecteur se circularise sur lui-même, sans insérer le gène cible, un ratio de vecteur : insert de 1:3 à 1:10 a été utilisé.

Clonage sans utilisation de ligase : Dans les cas où la ligation était difficile, un autre protocole de clonage a été appliqué (Figure MM. 1). Le gène à cloner a été amplifié par PCR avec aux extrémités 5' du fragment (en amont) et 3' du fragment (en aval) des séquences complémentaires au plasmide receveur (environ 20 pb). Le plasmide receveur a été digéré comme décrit précédemment puis a été mixé avec l'insert à un ratio de 4:1 avant l'ajout de 2,25 unités de T4 DNA polymérase (BIOLABS®). Le mélange réactionnel a été incubé à 25°C pendant 2 minutes et 30 secondes puis placé 10 minutes à 4°C. L'ajout de la T4 DNA polymérase sans ajout de nucléotides permet d'utiliser seulement son activité exonucléasique 3' à 5' permettant de créer des extrémités 5' débordantes sur les deux séquences d'ADN. Ces séquences complémentaires permettent l'hybridation entre l'insert et le plasmide et donc la création d'un plasmide contenant la séquence d'intérêt (Li & Elledge, 2012). Les bactéries compétentes DH5α ont ensuite été transformées avec ces mélanges afin que les systèmes de réparation de l'ADN contenus dans ces bactéries effectuent la ligation.

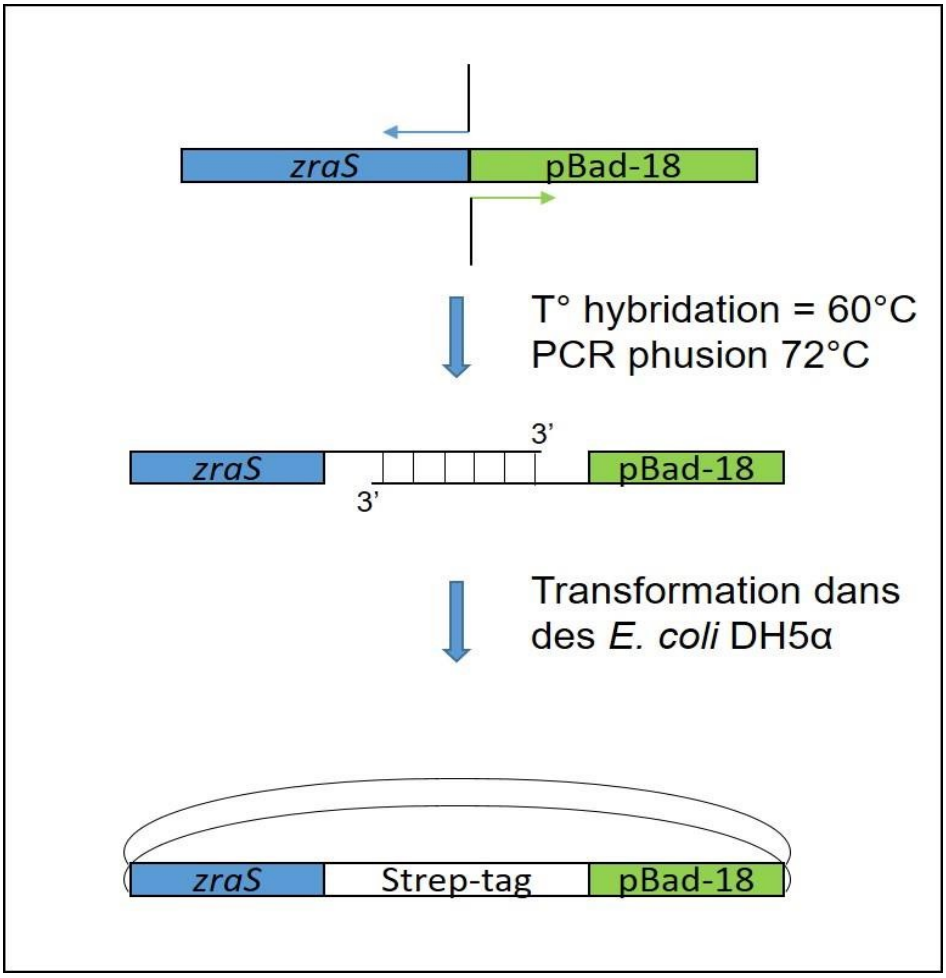


Figure MM. 1 : Protocole de ligation sans ligase.

Les amorces (flèches bleues et vertes) s'hybrident respectivement à la fin de la séquence nucléotidique de zraS (partie bleue) et une partie de la séquence nucléotidique du pBad-18 (partie verte). La partie noire des amorces représente la séquence nucléotidique qui code pour le peptide de l'étiquette strep. Après élimination de l'ADN parental, les séquences codant l'étiquette strep vont s'hybrider rendant la transformation des bactéries possible.

2.c. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR 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 à partir de deux amorces complémentaires de chacun des brins à amplifier.

Mélange des composants pour la PCR :

- 2,5 µL du mélange des oligonucléotides 3' et 5' à 10 µM chacun

- 2 µL de plasmide matrice à environ 5 ng/µL

- 1 µL de dNTP à 10 µM

- 10 µL de tampon Phusion 5X

- 1 µL d'enzyme Phusion

- quantité suffisante pour 50 µL avec de l'eau distillée stérile

Protocole d'amplification de l'ADN :

- Dénaturation : 95°C, 2 min

- Dénaturation courte : 95°C, 50 s, 30 à 35 cycles

- Hybridation : 50 à 65°C, 50 s, 30 à 35 cycles

- Elongation : 72°C, temps dépendant de la taille du plasmide ou du gène à amplifier

(Vitesse de polymérisation de la Phusion : 1000 pb/30 s)

- Elongation finale : 72°C, 5 min

- Conservation : 8°C

Ce protocole a été utilisé pour amplifier les séquences de ZraP, ZraSp et ZraS lors des clonages dans les plasmides pRT14, pRT13, pRT25 et pRT27 (voir Table 2).

Plasmides	Amorces
pRT14	SacI : 5'-ggg**gagctc**gaaggagatataccatgaaacgga-3' SalI : 5'-ccc**gtcgac**agccggatcctcgagtta-3'
pRT13	For : 5'-aaaaaa**ggtctca**gcgcgattatgggcgggcaagcgag-3' Rev : 5'-aaaaaa**ggtctcgtatc**aggtattgcgcttttccccact-3'
pRT25	SacI : 5'-ggg**gagctc**aggcaaagaagaagatgc-3' SalI : 5'-ccc**gtcgac**atattatcgtgcgtcatcc-3'
pRT27	5'-cgtaaggacccacaaggagctagctggagccacccgcagttcgaaaaatgacgcacgataatatgtcg-3'

Table 2 : Liste des amorces utilisées pour les clonages.

Les sites de restrictions des différentes enzymes sont indiqués en gras. Pour le plasmide pRT27, le clonage du strep-tag ayant été effectué sans ligation, la partie en rouge est celle qui s'hybride avec la séquence codante de ZraS et la partie en vert celle qui s'hybride avec le plasmide. La partie en noir représente la séquence codant pour le strep-tag.

2.d. Transformation des bactéries par de l'ADN plasmidique

Une fois les clonages effectués, les plasmides ont été utilisés pour transformer les cellules compétentes utilisées lors de cette étude. Pour cela, environ 50 ng de plasmide obtenu par clonage ont été ajoutés aux cellules. Ce mélange a été incubé au moins 30 minutes dans la glace puis 45 secondes à 42°C. Ce choc thermique a été arrêté par retour du mélange dans la glace durant 2 minutes. 200 µL de milieu LB ont ensuite été ajoutés et le mélange a été incubé 1,5 heures à 37°C à 200 rpm. La suspension cellulaire a enfin été étalée sur un milieu LB gélosé supplémenté en antibiotique (ici en ampicilline pour les variants de ZraSp et ZraP) et a été placée dans une étuve à 37°C toute une nuit.

2.e. Mutagénèse dirigée

Mutation	Amorces
ΔCterC104A	5'-ggctacggcggc**gcc**ggtggtggcgg-3'
H73AH74A	5'-ggatggggatgcgaatg**gccgct**gtaacagcaacaggcgc-3'
H104A	5'-tgcgcagggcatcattattctt**gct**agcgaccccga-3'
H159AH162A	5'-agcgccctggcgg**gct**ggaatg**gcc**aatatgccgcgc-3'
H73A	5'-ggatggggatgcgaatg**gcc**catgtacagcaacagg -3'
H74A	5'-ggggatgcgaatgcac**gct**gtacagcaacaggcg-3'
H159A	5'-gtcagcgccctggcgg**gct**ggaatgcacaatatgc-3'
H162A	5'-tggcggcatggaatg**gcc**aatatgccgcgctg-3'
H73AH159AH162A	5'-ggatggggatgcgaatg**gcc**catgtacagcaacagg -3' 5'-agcgccctggcgg**gct**ggaatg**gcc**aatatgccgcgc-3'
H73AH159AH162AC167A	5'-ggatggggatgcgaatg**gcc**catgtacagcaacagg -3' 5'-agcgccctggcgg**gct**ggaatg**gcc**aatatgccgcgc-3' 5'-gcacaatatgccgcgc**gct**aacggcaaagctgtg-3'
C167A	5'-gcacaatatgccgcgc**gct**aacggcaaagctgtg-3'

Table 3 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de mutagénèse dirigée.

Les codons mutés pour chaque amorce sont indiqués en rouge.

Les mutagénèses ont été réalisées avec le kit « Quickchange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis » (Agilent Technologies®) selon les instructions du fabricant. Une PCR a été effectuée à partir de 100 ng des plasmides pET15b-*zraPΔCter* ou pRT14 et de 100 ng d'amorces contenant le codon muté (Table 3). Le brin d'ADN parental ne contenant pas de mutation a été digéré par 10 unités de *Dpn-1* à 37°C pendant 1 heure. 1 à 3 µL des ADN mutés ont ensuite été introduits dans les cellules de DH5α par choc thermique. Les séquences codantes de ZraP,

ZraSp et ZraS ont été séquencées pour vérifier la présence des substitutions et l'absence de mutations supplémentaires.

3. Méthodes de biochimie

3.a. Purification de ZraSp-strep et de ces variants

Afin d'étudier l'activation périplasmique de ZraS, le domaine périplasmique de ZraS a été cloné, d'abord sans étiquette, dans un vecteur d'expression en vue de purifier la protéine. Le but est de purifier ZraSp sans ajouter d'étiquette de purification qui pourrait modifier la conformation de la protéine, mais aussi de purifier une protéine avec le moins de métal lié possible (sans utiliser une colonne d'affinité métallique comme c'est le cas avec une étiquette polyhistidine). Les premiers essais de purification de ZraSp, avant mon arrivée au laboratoire, ont été effectués par chromatographie par échange d'ions. Toutefois le degré de pureté obtenu ne permettait pas d'avoir une protéine exploitable. De plus, le domaine périplasmique de ZraS étant peu stable, une purification qui implique une modification trop importante de la force ionique en modifiant la concentration de sel du tampon de la protéine peut causer son agrégation. À mon arrivée, nous avons donc décidé de modifier le protocole en ajoutant une étiquette strep à ZraSp, qui n'a pas d'affinité pour les métaux, pour la purifier par affinité sur une résine Strep-Tactin (IBA®).

2 L de LB ont été inoculés au 1/100ème comme décrit dans la partie 1.b. La production des protéines recombinantes a été induite, à une $DO_{600\ nm}$ de 0,8, en présence de 200 ng d'anydrotétracycline (l'expression de protéine par le plasmide pRT13 étant sous l'influence du promoteur pTet inductible à faible quantité de tétracycline) pendant une nuit à 18°C. Les cellules ont été resuspendues dans 40 mL de tampon Strep-S (50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl et un mélange d'inhibiteurs de protéases Complete EDTA-free (Roche®)) puis les cellules ont été lysées par traitement aux ultrasons pendant 2 minutes à 90% d'amplitude (2 secondes de lyse puis 10 secondes de pause). Les protéines solubles ont été isolées par centrifugation à 15000 g durant 45 minutes à 4°C. Le surnageant a été déposé sur une colonne contenant 10 mL de résine Strep-Tactin préalablement équilibre dans du tampon Strep-A (50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl). Le lavage de la résine se fait avec 3 volumes de colonne (VC) de tampon Strep-A et la protéine recombinante a été ensuite éluée avec 2 VC de tampon Strep-B (50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 2,5 mM desthiobiotine) contenant de la

desthiobiotine qui entre en compétition avec la protéine recombinante sur la colonne et permet son élution. Les fractions ont été analysées par SDS-PAGE et celles contenant la protéine d'intérêt ont été rassemblées et injectées sur une colonne de filtration sur gel HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare Life Sciences®) équilibrée dans 2 VC de tampon Strep-A (puisque ZraSp fait théoriquement 20 kDa). Cette étape de séparation en fonction de la masse moléculaire apparente permet de se débarrasser des contaminants de plus haut et plus bas poids moléculaires, et aussi d'avoir une idée de l'état oligomérique des protéines d'intérêt. Les différents pics obtenus par le suivi de l'absorbance à 280 nm ont été analysés par SDS-PAGE avant de réunir les fractions contenant ZraSp-strep pur dessalés. Le tampon a ensuite été changé pour un tampon Strep-C (50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 5% glycérol) par ultrafiltration sur Amicon (Millipore®) équipé d'une membrane avec un seuil de coupure de 10 kDa puis la protéine a été concentrée par la même méthode. La protéine ne pouvant être conservée à 4°C car elle précipite à cette température, elle a été stockée à -20°C. Une fois que le protocole a été validé, à partir de 2 L de cultures, il a été possible de purifier 10 à 15 mg de protéine. Les variants de ZraSp que nous avons étudiés ont été purifiés en suivant le même protocole et les rendements obtenus ont été similaires.

3.b. Purification de ZraP et de ces variants

Tout comme pour ZraSp, le protocole de purification avait été défini avant mon arrivée et impliquait de purifier la protéine sur colonne échangeuse d'anions. Cela permettait de ne pas ajouter d'étiquette de purification à une des extrémités de ZraP, sachant que ces extrémités sont importantes pour l'oligomérisation et la liaison du zinc. Mais, étant donné que ZraP est exprimée dans le cytoplasme des bactéries, en fin de purification, la protéine est contaminée par du fer et une étape de décontamination est nécessaire. Pour augmenter le rendement de purification, nous avons modifié le protocole en remplaçant l'étape de chromatographie échangeuse d'ions par une étape de chromatographie d'affinité sur résine Cu-NTA. En effet, il avait été montré précédemment, dans l'équipe, que ZraP lie fortement le cuivre.

1 L de LB ont été inoculés au 1/100ème comme décrit dans la partie 1.b. La production des protéines recombinantes a été induite, à une $DO_{600\ nm}$ de 0,8, par l'ajout de 1 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 3 h à 37°C. Lorsque le gène de ZraP était cloné dans un plasmide pET15b, l'induction a été réalisée par ajout d'IPTG puisque

l'expression des gènes sur ces plasmides est sous l'influence du promoteur T7. Les cellules ont été resuspendues dans 40 mL de tampon S (50 mM Hepes pH 8,5, 100 mM NaCl et un mélange d'inhibiteurs de protéases Complete EDTA-free (Roche®)) puis les cellules ont été lysées par traitement aux ultrasons pendant 2 minutes à 90% d'amplitude (2 secondes de sonication puis 10 secondes de pause). Les protéines solubles ont été isolées par centrifugation à 15000 g durant 45 minutes à 4°C. Le surnageant a été déposé sur une colonne contenant 5 mL de résine CuNTA sépharose préalablement équilibrée dans du tampon A (50 mM Hepes pH 8,5, 100 mM NaCl). La résine a ensuite été lavée avec 6 VC de tampon A puis 2 VC de tampon A1 (50 mM
Hepes pH 8,5, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazole) avant d'éluer ZraP avec 3 VC de tampon B (50 mM Hepes pH 8,5, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazole). Les fractions ont été analysées par
SDS-PAGE (voir section 3.e) et celles contenant la protéine d'intérêt pure ont été rassemblées et injectées sur une colonne de filtration sur gel HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences®) équilibrée dans 2 VC de tampon A2 (50 mM Hepes pH 8,5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA). Les différents pics obtenus par le suivi de l'absorbance à 280 nm ont été analysés par SDS-PAGE avant de réunir les fractions contenant le protéine ZraP pure dessalée. La protéine a ensuite été concentrée par ultrafiltration sur Amicon (Millipore®) équipé d'une membrane avec un seuil de coupure de 30 kDa dans du tampon A avant de doser la concentration par la méthode de Bradford (voir section 3.d). Ce protocole permet de purifier 40 à 50 mg de ZraP par litre de culture.

3.c. Décontamination en fer de ZraP

L'analyse spectrale en UV/visible de la protéine ZraP purifiée montre un pic à 420 nm représentatif d'une contamination par du fer. Il a donc fallu appliquer un protocole de décontamination en fer. 620 µL de ZraP concentré à 15 mg/mL a été dénaturé en présence de 620 µL de guanidine 8 M puis le mélange a été traité avec 10 mg de dithionite afin de réduire ZraP. 120 µl de 3-(2-Pyridyl)-5,6di(2-furyl)-1,2,4-triazine-5',5''- acide disulfonique (ferrosine) ont été ajoutés pour précipiter le fer contenu dans ZraP, puis le mélange a été incubé sur glace pendant 30 min. Pour se débarrasser du fer et garder seulement ZraP, la mélange a été déposé successivement sur 3 colonnes de dessalage. Un second spectre en UV/visible permet de voir que le fer a été éliminé.

3.d. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage protéique est effectué selon la méthode de Bradford (Biorad) avec du sérum d'albumine bovine comme protéine standard (Bradford, 1976).

3.e. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

Au cours des différentes étapes de préparation de l'échantillon, la composition des fractions protéiques a été suivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Cette technique permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire (Cleveland *et al.*, 1977). De faibles volumes d'échantillons à analyser (15-20 µL) ont été mélangés avec 5 µL de tampon de charge, contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS) et du β-mercaptoéthanol. Ce mélange permet respectivement de charger négativement de manière uniforme les protéines et de réduire les ponts disulfures d'un échantillon protéique. Les échantillons ainsi préparés ont ensuite été chauffés à 95˚C pendant une dizaine de minutes, pour permettre la dénaturation complète des protéines, avant d'être déposés sur le gel de polyacrylamide. La séparation en fonction du poids des molécules s'effectue grâce à la migration de protéines chargées négativement dans un champ électrique au sein d'un gel composé d'une matrice d'acrylamide et de bis-acrylamide. Les protéines ayant un poids moléculaire plus faible migrent plus rapidement. Pour visualiser les bandes de migration sur le gel, du bleu de Coomassie a été utilisé. Ce colorant s'adsorbe aux protéines via les résidus aromatiques et basiques.

3.f. Test d'interaction *in situ* par mSPINE

Afin de tester si ZraS et ZraP interagissent dans le périplasme de *E. coli*, des expériences de membrane *Strep-tagged Protein INteraction Experiment* (mSPINE) ont été effectuées. Cette technique permet de co-purifier des complexes de protéiques, après pontage covalent par du formaldéhyde en condition *in vivo*. Le formaldéhyde étant le plus petit agent pontant (CH_2O), il stabilise l'interaction entre deux protéines suffisamment proches et donc qui interagissent physiquement. Il réagit avec des protéines contenant des groupes nucléophiles tels que des sulfhydriles, des amines, des phénols et des imidazoles. De plus, le formaldéhyde pénètre les membranes et est donc bien adapté à la mise en évidence

d'interaction entre deux protéines dans le périplasme. Cette expérience avait permis de confirmer l'interaction transitoire entre CpxA et CpxP en la stabilisant (Tschauner *et al.*, 2014). Dans le cas présent, nous avons choisi de rajouter l'étiquette de purification sur l'extrémité cytoplasmique de ZraS.

Clonages : Le gène *zraS-strep* (avec l'étiquette strep en C-terminal) a d'abord été cloné dans un plasmide pACYCDuet sous le contrôle d'un promoteur T7, portant un gène résistance au chloramphénicol et *zraP* dans un plasmide pBAD30M, sous le contrôle d'un promoteur pBAD conférant une résistance à l'ampicilline (Figure MM. 2). Afin de co-exprimer les deux protéines, nous avons choisi deux plasmides qui n'ont pas la même origine de réplication.

Production des protéines : Des *E. coli* BL21(DE3) ont été transformées par choc thermique avec ces deux plasmides. Les colonies résistantes à l'ampicilline et au chloramphénicol ont été relancées en milieu LB liquide toute une nuit. 500 ml de LB ont ensuite été inoculés au 1/100ème avec les pré-cultures. ZraP a été induit dès le début de la culture par ajout de 0,02% d'arabinose.

L'expression de ZraS-strep ralentissant la croissance bactérienne l'IPTG (1 mM) n'a été introduit qu'à partir de $DO_{600\ nm}$ = 0,8. Les cellules ont été cultivées à 37 °C et 200 rpm jusqu'à atteindre une $DO_{600\ nm}$ de 1,2. Les bactéries ont ensuite été traitées avec 0,4% de formaldéhyde puis agitées à 37°C et 200 rpm pendant 30 min.

Purification des complexes : Suite au traitement avec le formaldéhyde, les cellules ont étés récupérées et lysées par traitement aux ultrasons (voir section 3.a) puis les membranes ont été isolées par ultracentrifugation pendant 50 min a 100 000 g et les protéines membranaires ont été extraites des membranes par solubilisation dans un tampon contenant de l'Hepes 50 mM pH 7,5 NaCl 100 mM contenant 0.02 % de Triton X-100 (un agent tensioactif non ionique permettant la solubilisation des protéines membranaires). Puis, le contenu membranaire solubilisé a été déposé sur résine StrepTactin® afin de ne récupérer que les complexes contenant ZraS-strep. Dans certains cas, les complexes ont été dissociés par traitement thermique afin de séparer les différents partenaires purifiés. Les protéines ont ensuite été analysées par SDS-PAGE et immunodétection avec des anticorps anti-ZraP (1/2000ème) ou un conjugué StrepTactin-HRP (1/4000ème) reconnaissant l'étiquette strep de ZraS.

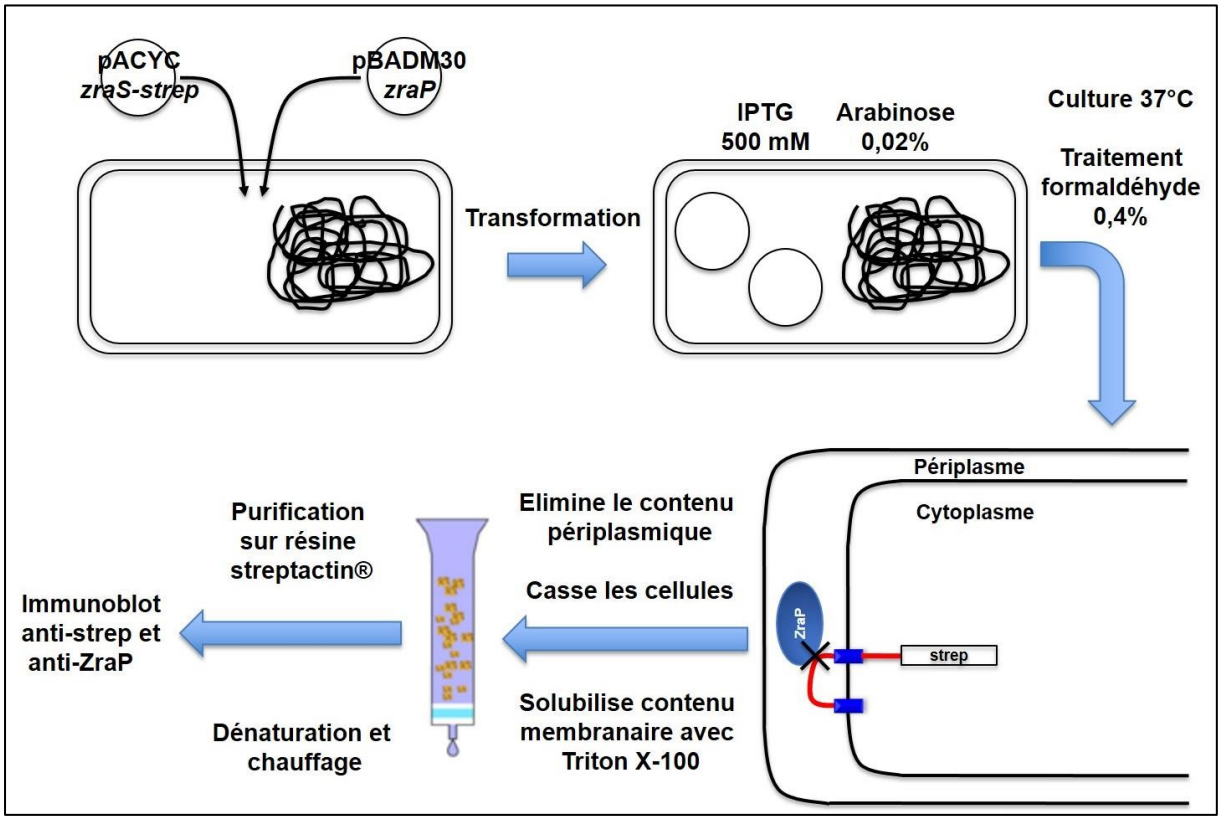


Figure MM. 2 : Schéma récapitulatif du mSPINE.

Une souche d'*E. coli* a été transformée avec les plasmides pACYCDuet-zraS-strep et pBADM30-zraP puis a été induite par ajout d'IPTG et d'arabinose. Les bactéries ont été cultivées à 37°C avant le traitement au formaldéhyde puis collectées. Les protéines membranaires ont été isolées et la solution obtenue a été purifiée sur résine StrepTactin®. Les complexes contenant ZraS-strep pontés ont été analysés par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-ZraP et d'un conjugué StrepTactin-HRP (reconnaissant le strep-tag) dans le but de mettre en évidence le complexe ZraS-ZraP.

3.g. Test d'interaction *in vitro* entre ZraSp et ZraP

Dans le but de décrire plus précisément cette interaction et de tenter de comprendre quels domaines de ZraP permettent l'association avec le domaine périplasmique de ZraS, nous avons effectué des pontages covalents *in vitro*. Notre protocole est inspiré de celui publié dans le livre *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual, 2nd Edition* de Erica A. Golemis et Peter D. Adams (Nadeau & Carlson, 2005). L'agent pontant qui a été utilisé pour nos expériences est le formaldéhyde, étant le plus petit des agents pontant (2 à 3 Å), la possibilité d'avoir des faux positifs *in vitro* est peu probable.

40 µM de ZraSp et 25 µM de ZraP (et les variants ZraPΔCter, ZraPΔCterC104A et ZraPH1A) ont été incubés en présence ou en absence de 0,5% de formaldéhyde pendant 35

minutes à température ambiante. Le pontage covalent a ensuite été stoppé par ajout de tampon laemmli contenant du SDS. Puis, les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE et la présence de complexes a été révélée par immunoblot avec des anticorps anti-ZraP (1/4000ème) et le conjugué StrepTactin-HRP (1/4000ème).

3.h. Immunodétection

Dans le but d'identifier une protéine dans un mélange protéique, des expériences d'immunoblot impliquant l'utilisation d'anticorps ont été réalisées. Une fois séparées sur gel SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Millipore) par un transfert semi sec (Trans-Blot Cell, Biorad). La membrane a été trempée dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 190 mM glycine, 0,1% SDS, 20% éthanol) avant d'être placée du côté anode. Le gel de polyacrylamide a été placé du côté de la cathode. Une feuille de papier buvard et une éponge ont été placées de chaque côté. Le transfert des protéines chargées négativement se fait de la cathode vers l'anode. Pour les protéines de poids moléculaires inférieurs à 70 kDa, la migration a été effectuée à 100 V et 350 mA pendant 35 minutes dans le tampon de transfert. Dans le cas de la mise en évidence des complexes de ZraSZraP, le transfert a été fait à 100 V et 350 mA pendant 90 minutes. La membrane a ensuite été réhydratée par une solution de PBS-Tween (Phosphate de sodium 10 mM, NaCl 140 mM, Tween-20 0,03% (v/v), pH 7,2), saturée 30 minutes dans du PBS-Tween-Lait 5% (m/v). La membrane a été incubée pendant 1 heure en présence d'anticorps primaires anti-ZraP (dilués au 1/5000ème dans du PBS-Tween-Lait 5%) ou de conjugués StrepTactin-HRP (dilués au 1/4000ème dans du PBS-Tween-Lait 5%) ou d'anti-ZraR (dilués au 1/4000ème dans du PBS-Tween-Lait 5%). Après lavage dans du PBS-Tween, la membrane a été incubée pendant 1 heure en présence d'anticorps secondaires anti-lapin-HRP (dilués au 1/4000 dans du PBS-Tween-Lait 5%). Après plusieurs lavages au PBS-Tween, les anticorps s'étant couplés aux protéines d'intérêt ont été détectés grâce au réactif ECL (Clarity western ECL substrate, Biorad). La chimioluminescence émise a été détectée par un *Chemidoc* + (Biorad) puis les bandes d'intérêt ont été quantifiées par le logiciel *Image lab*.

3.i. Rétention de protéine sur résine d'agarose chargée en zinc (Zn-NTA)

Pour tester la fixation du zinc sur ZraS et identifier les histidines importantes pour la coordination du zinc, nous avons réalisé des tests de rétention sur résine chargée en zinc. La colonne est lavée avec des tampons contenant différentes concentrations de NaCl et d'imidazole. L'élution se fait avec un tampon contenant une forte concentration d'imidazole.

1 mL de ZraSp (ou des variants de ZraSp) à 1 mg/mL a été déposé sur 1 mL de résine ZnNTA agarose équilibrée avec un tampon RetA (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM). La résine a ensuite été lavée avec 4 mL de tampon RetA, 4 mL de tampon RetB (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 1M) et 4 mL de tampon RetC (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazole 10 mM).
L'élution a été réalisée avec le tampon RetE (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazole 500 mM) puis toutes les fractions ont été analysées par SDS-PAGE.

4. Méthodes de biophysique

4.a. Dosage de la quantité de zinc liée à ZraSp

Le zinc n'ayant pas de signature spectroscopique, sa fixation sur une protéine n'est pas mesurable par spectrophotométrie UV/visible, nous avons donc choisi de doser le zinc lié à ZraP à l'aide d'un chélateur de métaux divalents chromogène. Afin de doser la quantité de zinc liée par ZraSp, le zinc libéré après dénaturation de la protéine est chélaté par du 4-(2pyridylazo)resorcinol (PAR) dont le spectre UV/visible est modifié en fonction de la quantité de zinc (McCall & Fierke, 2000*a*). Ainsi on peut doser la quantité de zinc que ZraSp avait fixé (Figure MM. 4). Le PAR chélate les métaux sous la forme d'un complexe (2 PAR pour 1 métal). Le PAR en complexe avec du manganèse, du nickel, du zinc et du cadmium a un pic d'absorbance à 500 nm alors qu'il est à 514 nm avec du cobalt ou du cuivre.

Métallation ZraSp : Dans un volume final de 80 µL, 75 µL de ZraSp à 100 µM a été incubé en présence de 2,5 µM d'EGTA à 20 mM puis 2,5 µM de ZnSO4 à 20 mM. L'ajout d'EGTA permet de chélater le zinc qui se lie à ZraSp avec une relativement faible affinité (Kd = 10^{-14}). Le mélange a ensuite été dialysé pendant une nuit à 4°C contre 500 mL de tampon Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM.

Dosage de la quantité de zinc lié : 50 µL de la solution dialysée (contenant la protéine métalée) a été incubée dans 4 M de guanidine-HCl. 40 µM de PAR (solubilisé dans du NaOH puis dilué a 2 mM dans du tampon Hepes 50 mM pH 7,5) ont été solubilisé dans 500 µL de tampon contenant 50 mM d'Hepes pH 7,5 traité au chelex (résine permettant d'éliminer les traces de métaux). Le spectre de référence, du PAR non lié au zinc, a été mesuré entre 250 et 700 nm.

L'absorbance entre 250 et 700 nm a ensuite été mesurée après chaque ajout de 0,5 µM de ZraSp métalée dénaturée dans le tampon guanidine-HCl. Cette expérience est répétée pour obtenir, en moyenne, 15 spectres.

L'analyse des résultats a été faite par détermination de la pente de la droite de la courbe A500 nm = f (concentration de protéine), permettant de déterminer le nombre de moles de zinc fixé par moles de protéine, à partir du coefficient d'absorption molaire du zinc chélaté par le PAR (46 000 M-1 cm-1).

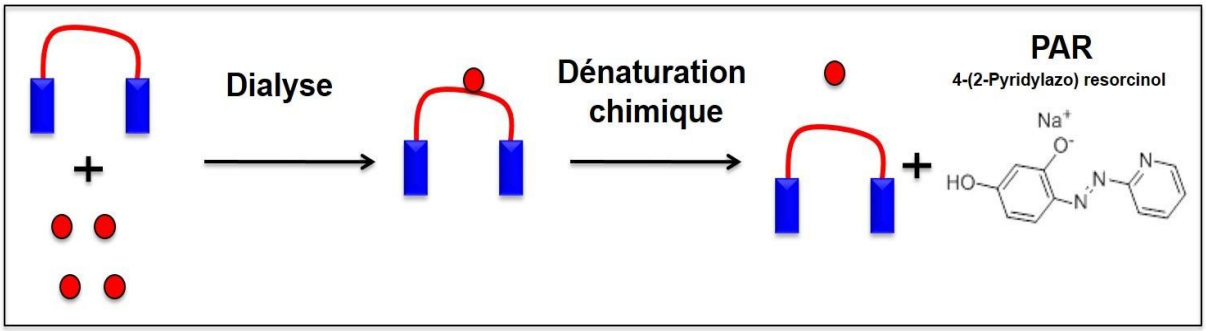


Figure MM. 3 : Schéma récapitulatif du dosage du zinc au PAR.

Suite à la métallation de la protéine avec le zinc, ZraSp a été dénaturée chimiquement avant d'être exposée à une solution contenant du PAR. Lorsqu'il chélate du zinc, l'absorbance du PAR augmente à 500 nm et diminue à 420 nm.

4.b. Suivi de la fluorescence de ZraSp par liaison du zinc

L'émission de fluorescence du tryptophane dans une métalloprotéine peut être modifiée suite à un changement de son environnement, provoqué par un changement conformationnel, ou suite à la fixation d'un ion divalent à proximité. ZraSp contenant des résidus tryptophane proches des potentiels résidus liant le zinc, la coordination du zinc pourrait modifier la conformation de ces résidus. Nous avons donc testé si la liaison du zinc modifie la fluorescence de ces résidus tryptophane. Nous avons également testé si l'ajout de ZraP (sous différents états de métallation) avait une influence sur la fluorescence. Pour cela, nous avons

mesuré le spectre d'émission de fluorescence de ZraSp après excitation à une longueur d'onde de 280 nm après ajout de concentrations croissantes de zinc ou de ZraP.

La fluorescence émise, entre 300 et 400 nm, de 10 µM de ZraSp dans un volume de 450 µL de tampon Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM a été mesurée après excitation à 280 nm. Du $ZnSO_4$ a été ajouté à 1 µM et la fluorescence a été remesurée. Cette manipulation a été effectuée jusqu'à atteindre 25 µM de $ZnSO_4$ dans l'échantillon.
La pente de la droite tracée à partir de l'intensité de fluorescence à 342 nm (maximum de fluorescence) en fonction de la concentration de zinc ou de protéine ajoutée reflète la modification de la fluorescence de ZraSp par l'ajout de zinc ou de ZraP.

4.c. Activité de protection de la malate deshydrogénase (MDH) à la dénaturation thermique

Pour estimer la capacité de ZraP à protéger les protéines de la dénaturation thermique, un test de protection de l'enzyme malate déshydrogénase (MDH) a été effectué. La MDH est connue pour se dénaturer lors d'un traitement thermique à 42°C. Cela se traduit par une augmentation de la dispersion de lumière à 360 nm. Nous avons suivi la dispersion de lumière de la MDH lors de sa dénaturation thermique lorsqu'on ajoute ZraP ou des variants de ZraP.
La déviation de lumière a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Cary Eclipse, Varian) équipé d'un système de modulation de la température réglé à 42°C. La déviation de lumière à 360 nm d'une solution de MDH commerciale diluée à 390 nM dans 200 µL de tampon Hepes pH 8,5 50 mM, NaCl 100 mM froid en présence ou en absence de 12 µM ZraP a été mesurée. Cette expérience a été répétée avec les variants ZraPH1A, ZraPH4A, ZraPΔCter et ZraPΔCterC104A. Les essais avec ZraP métalés ont été effectués avec 0,5 équivalent de zinc. La variation de la déviation de lumière de la MDH seule est comparée à la déviation de la lumière du mélange contenant la MDH et ZraP (ou les variants de ZraP).

4.d. Détermination de la température de demi-dénaturation de ZraSp et des variants

La stabilité du repliement d'un variant peut être évaluée en mesurant la température à laquelle la moitié de la protéine est dénaturée. Ce paramètre, aussi appelé *temperature midpoint* (Tm), peut être mesuré en suivant la variation de la fluorescence des résidus

tryptophane contenus dans une protéine lors d'une dénaturation thermique. Cette analyse a été réalisée par un Prometheus NT.48 (NanoTemper).

La stabilité des variants de ZraSp a donc été mesurée en diluant les protéines dans 20 µL de tampon Hepes pH 7,5 50 mM, NaCl 100 mM à une concentration de 1 mg/mL. Les protéines ont ensuite été transférées dans des capillaires en verre afin d'être insérées dans le Prometheus NT.48. Le protocole de dénaturation a été réglé pour augmenter la température des échantillons en parallèle de 2°C par minutes de 20°C à 90°C. Les fluorescences émises à 330 nm et 350 nm ont été suivies. Le point d'inflexion (déterminant le Tm) peut être calculé en dérivant le ratio des fluorescences à 350/330 nm ou par ajustement non linéaire à l'équation présentée ci-dessous (Consalvi *et al.*, 2000).

$$y = \frac{[(yf + afT) + (yu + auT)\exp\left(\left(\frac{\Delta Hm}{RT}\right) * \frac{(T - Tm)}{Tm}\right)]}{1 + \exp\left(\left(\frac{\Delta Hm}{RT}\right) * \left(\frac{T - Tm}{Tm}\right)\right)}$$

Dans l'equation, *y* correspond au signal observé, *yf* et *yu* correspondent aux interceptions des pre et post-transitions et *af* et *au* sont les pentes des lignes de bases. La *Tm* est la température de demi-dénaturation et *ΔHm* équivaut au changement d'enthalpie lorsque la Tm est atteinte.

4.e. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire permet la caractérisation de la structure secondaire des protéines. Elle est basée sur la différence d'absorption, ou dichroïsme, d'une lumière UV polarisée circulairement à droite et à gauche par une macromolécule (Figure MM. 4). Le signal obtenu, exprimé en mDeg, traduira donc des propriétés géométriques des atomes constituant cette molécule et par extension ses caractéristiques structurales. Ainsi, dans l'UV lointain (180 nm à 250 nm), la chaine polypeptidique génère un dichroïsme dont les fréquences de résonance varient selon l'agencement spatial, c'est-à-dire la structure secondaire de la protéine. Nous avons donc utilisé le dichroïsme circulaire pour déterminer les changements de conformation causés par la métallation de ZraSp par le zinc, mais aussi afin de vérifier le bon repliement des variants de ZraSp.

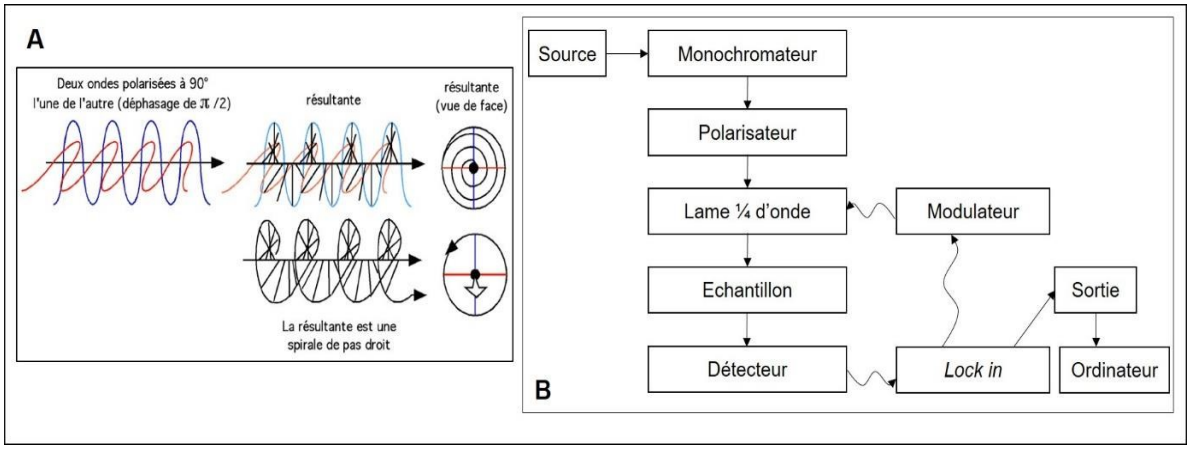


Figure MM. 4 : Principe du dichroïsme circulaire.

La lumière polarisée circulairement est obtenue par passage de deux ondes orthogonales polarisées en phase, de fréquence et amplitude identique dans une lame de quart d'onde (contrainte) dans le plan de propagation d'une des deux ondes. La contrainte induite à la lumière polarisée pour obtenir un déphasage de +/- $\pi/2$ résulte donc en une polarisation circulaire de la lumière (A). Dispositif expérimental (B).

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées dans un tampon NaH_2PO_4 20 mM pH 7,5 ne contenant pas de chlore (le chlore affectant la sensibilité du spectropolarimètre). ZraSp et les variants étudiés ont été métalés en suivant le protocole de la partie 4.a puis dilués au 1/10ème dans du tampon NaH_2PO_4 pour obtenir un volume final de 300 µL. Les échantillons ont ensuite été placés dans une cuve de trajet optique de 1 mm et l'ellipticité a été mesurée entre 250 nm et 200 nm tous les 1 nm avec un temps d'acquisition moyen de 2 s par palier. Pour minimiser le rapport signal/bruit, 15 acquisitions successives ont été réalisées. Nous avons par ailleurs vérifié que l'ellipticité du tampon NaH_2PO_4 était négligeable par rapport à celles des échantillons. Les spectres obtenus ont été normalisés par la concentration protéique et le signal de dichroïsme circulaire a été exprimé en différence de $\Delta\varepsilon$.

L'évaluation des structures secondaires a été réalisée par déconvolution des spectres à l'aide du serveur en ligne BeStSell qui permet de comparer les spectres obtenus avec des spectres théoriques déterminés à partir de structures cristallographiques résolues issues de la PDB. Ainsi, la courbe expérimentale est comparée à une courbe théorique dont le pourcentage d'hélices α, de brins β et de domaines non structurés est déterminé.

RÉSULTATS

Mise en évidence de l'interaction entre ZraS et ZraP

Liste des figures de la partie:

Figure 1. 1 : Immunoblot avec un conjugué StrepTactin-HRP 92

Figure 1. 2 : Mise en évidence de l'interaction *in situ* entre ZraP et ZraS. 95

Comme indiqué dans la partie matériels et méthodes, nous avons d'abord voulu mettre en évidence une interaction entre ZraS et ZraP dans le périplasme. Pour cela nous avons utilisé une technique appelée le mSPINE qui nous permet de purifier des complexes protéiques après pontage covalent dans la bactérie. Ainsi on se rapproche le plus possible des conditions d'interaction native des protéines.

Expériences contrôles :

Dans un premier temps, des expériences contrôles ont été réalisées, pour vérifier l'absence de réaction croisée entre la StrepTactin-HRP, utilisée pour révéler ZraS, et ZraP. Pour cela, des cellules ayant exprimé ZraP à partir du plasmide pBad30M ont été lysées et analysées par immunoblot, après isolement de la fraction membranaire. Comme espéré, les résultats présentés sur la Figure 1. 1 ne montrent pas de bande correspondant à la taille attendue de ZraP (12 kDa) par contre on peut observer de très fines bandes (à 20 kDa), dont la position suggère qu'il s'agit d'une biotin acyl carrier (BCCP), connue pour réagir avec la StrepTactin® (Strep-tag detection in Western blots, IBA-lifescience®). L'expérience inverse a été réalisée avec des cellules ayant exprimé ZraS, à partir du plasmide pACYCDuet-zraS-strep. L'immunoblot après immunomarquage avec des anticorps anti-ZraP ne présente aucune bande (données non montrées), confirmant qu'il n'y a pas non plus de réaction croisée entre ZraS et les anticorps anti-ZraP.

Dans une deuxième série d'expériences contrôles, la présence de complexes pontés par le formaldéhyde a été mise en évidence après isolement de la fraction membranaire, dans des cellules n'ayant exprimé que ZraS ou ZraP. En absence d'agent pontant, après expression de ZraS, on observe la présence d'une bande à 50 kDa, compatible avec la taille attendue de ZraSstrep (Figure 1. 1 pistes 5 et 6). Le traitement au formaldéhyde des cellules conduit à l'apparition d'une fine bande qui correspond à un complexe protéique de plus de à 200 kDa (Figure 1. 1 piste 7), alors qu'il n'y a pas de formes monomériques visibles à 50 kDa. Après chauffage à 95°C des échantillons, pour rompre les ponts covalents formés par le formaldéhyde, on n'observe plus la bande de haut poids moléculaire mais on retrouve une bande de monomères. Ce résultat montre que le complexe de haut poids moléculaire contenait du ZraSstrep.

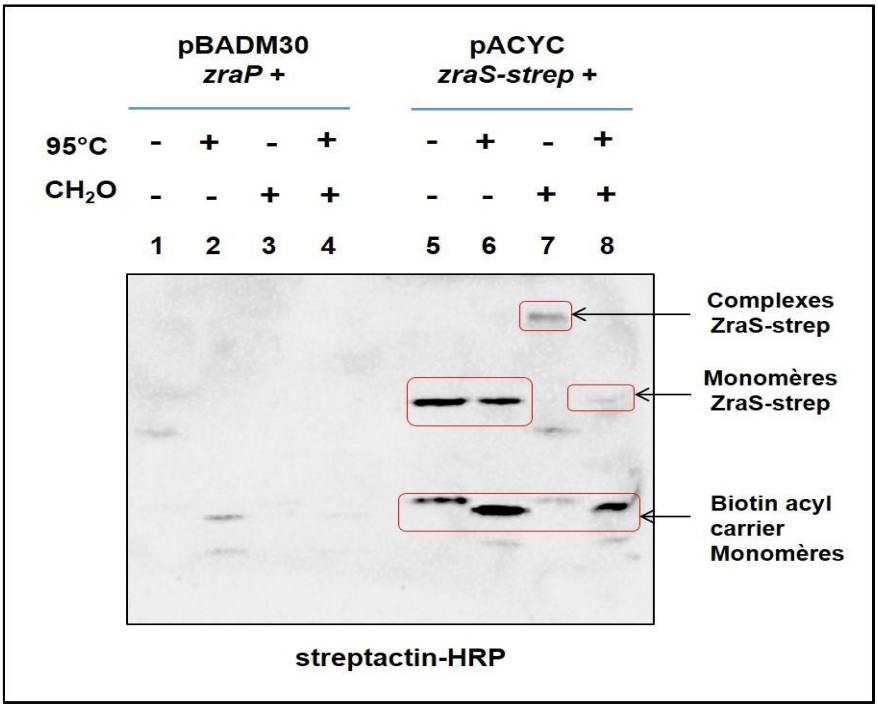


Figure 1. 1 : Immunoblot avec un conjugué StrepTactin-HRP.

Détection de réaction croisée entre les protéines membranaires de cellules ayant exprimé ZraP et le conjugué StrepTactin-HRP. Détection de complexes de ZraS pontés par du formaldéhyde. Les protéines membranaires ont été extraites à partir BL21(DE3). ZraS-strep a été exprimée à partir d'un plasmide pBadM30, par ajout d'arabinose, ZraP a été exprimée à partir d'un pACYC, par ajout d'IPTG. On n'observe pas de réaction croisée et seule la surproduction de ZraS-strep en présence de formaldéhyde conduit à la formation de complexes détectables avec un conjugué StrepTactin-HRP (puit 7) ces complexes sont dissociés par l'augmentation de la température (puit 8). Sans formaldéhyde, on ne détecte que ZraS-strep (puits 5 et 6).

Les deux protéines ont ensuite été coproduites dans des cellules BL21(DE3), par ajout d'arabinose et d'IPTG, avant traitement par le formaldéhyde. Après lyse cellulaire, la fraction membranaire (Figure 1. 2 A puits 1 à 4) a été séparée des contenus périplasmiques et cytoplasmiques (Figure 1. 2 A puits 5 et 6), et les protéines ont été solubilisées avec du triton X100. Une partie des protéines membranaires a été purifiée sur résine StrepTactin® (Figure 1. 2 A puits 7 et 8), le reste a été conservé sous forme d'extraits bruts.

Dans le puits contenant la fraction membranaire non purifiée et traitée au formaldéhyde, on voit une traînée de haut poids moléculaire qui réagit avec la StrepTactin-HRP (Figure 1. 2 puit 1).

La rupture des ponts covalents par chauffage, conduit à l'apparition de la bande de monomère à 50 kDa (Figure 1. 2 puit 2). Bande qui est retrouvée dans les extraits membranaires non-traités au formaldéhyde (Figure 1. 2 A puits 3 et 4).

Après la purification des protéines membranaires sur colonne StrepTactin®, on observe toujours la traînée de haut poids moléculaire et la libération de ZraS-strep monomérique après chauffage (Figure 1. 2 A puits 7 et 8).
Il est à noter qu'avec les extraits composés des contenus cytoplasmiques et périplasmiques, après pontage, on observe une traînée de haut poids moléculaire qui présente une intensité plus importante que dans le cas de la fraction membranaire. On peut aussi voir la présence de bandes à approximativement 20 et 40 kDa représentatives de BCCP de *E. coli* (Figure 1. 2 A, puits 5 et 6). Chez *E. coli*, le BCCP intervient dans la voie de synthèse des acides gras (Cronan, 2001) et le traitement au formaldéhyde a dû stabiliser ce phénomène qui a été révélé de manière aspécifique avec le conjugué StrepTactin-HRP ayant reconnu le motif biotine. On remarque ainsi que les contenus périplasmiques et cytoplasmiques contiennent des complexes reconnus par le conjugué StrepTactin-HRP, et donc que l'étape de fractionnement et purification des protéines sur résine StrepTactin® est nécessaire pour se débarrasser d'une importante partie des complexes que forme le BCCP avec les protéines cytoplasmiques mais on en retrouve tout de même notamment après chauffage des échantillons (Figure 1. 2 A puit 8).

Mise en évidence de complexes entre ZraP et ZraS :

Après cette mise au point de l'expérience de mSPINE qui a validé la capacité à visualiser des complexes protéiques contenant ZraS, dans des cellules ayant exprimé ZraS et ZraP, nous avons voulu déterminer si ZraP se trouvait parmi les protéines complexées à ZraS. Les extraits purifiés sur colonne StrepTactin® ont donc été déposés sur deux gels SDS-PAGE, à la même concentration, avant d'être analysés pas immuno-blot avec l'anticorps anti-ZraP et le conjugué StrepTactin-HRP. On retrouve sur les deux immuno-blots, dans la condition traitée au formaldéhyde, une bande de haut poids moléculaire qui migre à la même position (Figure 1. 2 B et C). Cela indique que le complexe de haut poids moléculaire contient à la fois du ZraS et du ZraP et démontre la capacité d'interaction des deux protéines *in vivo*. La traînée est plus étalée sur l'immuno-blot révélé avec les anticorps anti-ZraP, ZraP étant un octamère, il peut s'agir de formes partiellement pontées. Après chauffage, sur l'immunoblot révélé avec

les anticorps anti-ZraP, on observe une bande de 25 kDa, qui correspond à la masse de dimères de

ZraP (Figure 1. 2 C puits 2 et 4), alors que la bande de haut moléculaire n'est plus visible. Cette bande de dimères de ZraP est régulièrement observée en gel SDS-PAGE avec de la protéine purifiée, ce qui suggère que le dimère et très stable, même en absence d'agent pontant. Il aurait sans doute fallu chauffer les échantillons plus longtemps pour pouvoir voir seulement les monomères de ZraP.

Grace à ces expériences, nous avons montré qu'en pontant les protéines avec du formaldéhyde dans le périplasme de *E. coli* il a été possible de mettre en évidence une interaction physique entre ZraP et ZraS. Une des critiques qui pourrait être faite sur cette expérience est qu'on montre bien que ZraP interagit avec ZraS mais il n'y a aucun moyen de prouver que c'est bien le ZraP mature périplasmique qui interagit avec le domaine périplasmique de ZraS. ZraP étant une protéine périplasmique, elle est d'abord synthétisée sous forme non-mature, portant une séquence signal de transport vers le périplasme. Il est possible que lors de la synthèse de ZraP dans le cytoplasme, du ZraP non-mature interagisse avec le domaine cytoplasmique de ZraS causant la formation d'un complexe observable par immunodétection. De plus, la séquence signal étant petite, la différence de taille de ZraP mature et non-mature n'est que de 3 kDa. Il est donc difficile de faire la différence entre ces deux tailles dans le complexe sur un gel d'immunoblot. Toutefois certains éléments théoriques nous font penser que cette dernière hypothèse n'est pas valide. La voie par laquelle une protéine est transloquée vers le périplasme peut être identifiée en observant la séquence signal. Par exemple, la séquence d'adressage de ZraP au périplasme est typique des protéines exportées par la voie Sec. Cette voie de transport des protéines du cytoplasme au périplasme implique l'action d'une protéine chaperon, SecB qui va se lier à une protéine nouvellement synthétisée dans le cytoplasme (empêchant le repliement de la protéine). La traduction terminée, le ribosome se dissocie et le complexe SecB – pré-protéine interagit avec le translocon SecYEG. L'hydrolyse d'ATP par SecA et la force proton motrice apportent l'énergie nécessaire à la translocation de la protéine à travers la membrane. Une fois transmise, la protéine se replie dans le périplasme (Tsirigotaki *et al.*, 2017). Lors de la synthèse de ZraP dans le cytoplasme, la protéine devrait être non repliée et liée à SecB jusqu'à sa translocation vers le périplasme. ZraP ne peut donc pas interagir avec le domaine cytoplasmique de ZraS. Un moyen efficace de confirmer que du ZraP mature se fixe sur ZraSp est de faire des tests d'interaction *in vitro* avec les deux protéines purifiées.

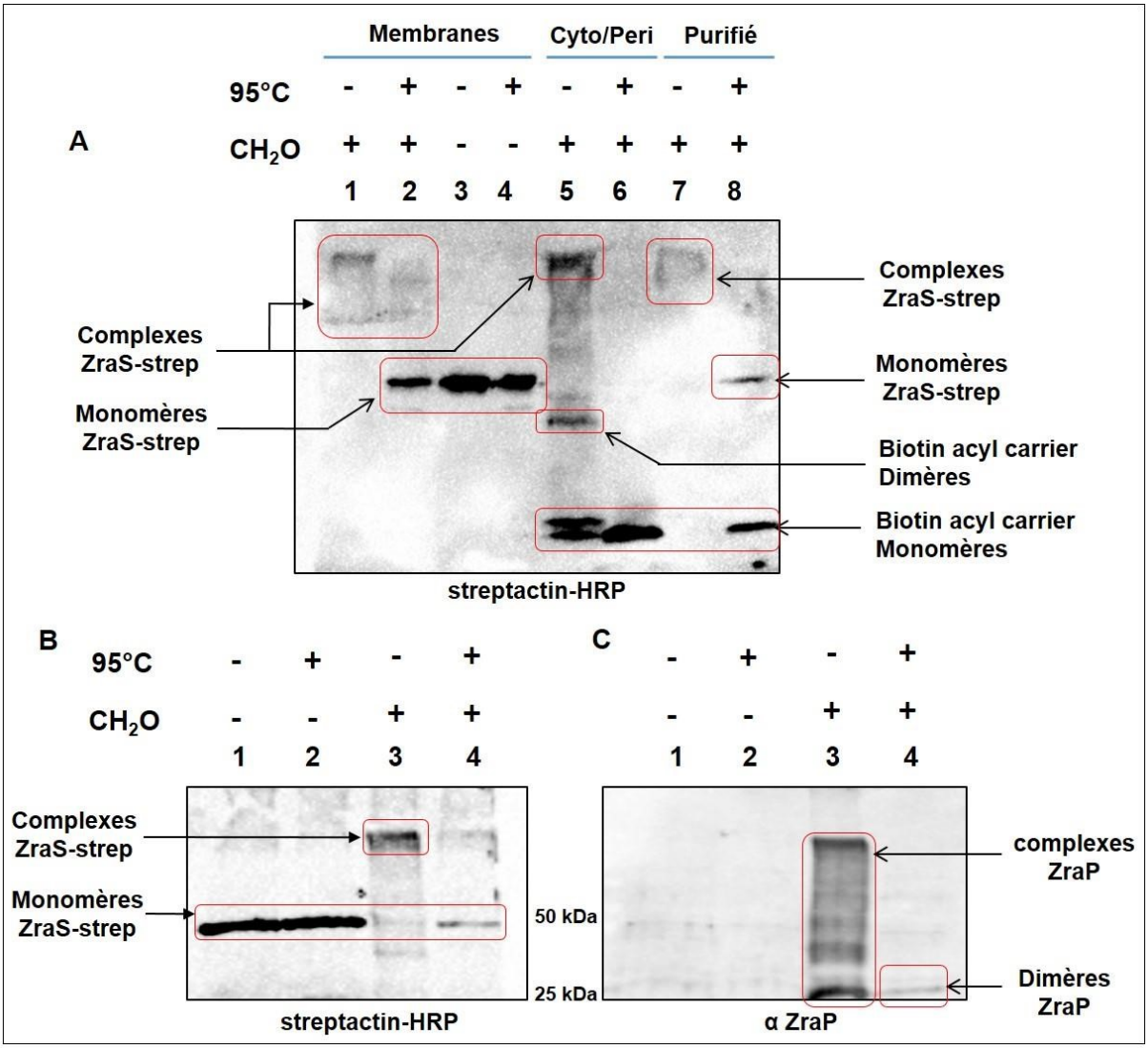


Figure 1. 2 : Mise en évidence de l'interaction *in situ* entre ZraP et ZraS.

Des cellules surproduisant ZraP et ZraS-strep ont été traitées au formaldéhyde avant d'être collectées et lysées. Les contenus membranaires (Puits 1 à 4), périplasmiques et cytoplasmiques (Puits 5 et 6) ont été séparés par ultracentrifugation. Les protéines membranaires ont été solubilisées avec du Triton 100-X avant d'être purifiées sur résine StrepTactin® (Puits 7 et 8). La présence de complexes contenant une étiquette strep a été déterminée par immuno-blot à l'aide d'un conjugué StrepTactin couplé à du HRP (A). Les bandes de bas poids moléculaire détectées dans les puits 5, 6 et 8 sont dues à la reconnaissance des biotin acyl carrier de *E. coli* par le conjugué StrepTactin-HRP. Les échantillons purifiés sur résine StrepTactin ont été dilués afin de déposer la même concentration de complexes sur le gel SDS-PAGE à analyser par immuno-blot anti-strep (B) ou anti-ZraP (C).

Caractérisation biochimique du domaine périplasmique de ZraS (ZraSp)

Liste des figures de la partie :

Figure 2. 1 : Bilan de la purification de ZraSp.. 100

Figure 2. 2 : Analyse de l'état d'oligomérisation de ZraSp aprèse purification, par analyse SEC-MALS. 101

Figure 2. 3 : 250 premiers acides aminés de ZraS. 102

Figure 2. 4: Capacité de liaison de ZraSp et des variants a une résine Zn-NTA 103

Figure 2. 5 : Evolution spectrale du PAR après ajout de ZraSp traité au zinc. 105

Figure 2. 6 : Détermination du nombre de sites de liaison du zinc de ZraSp. 106

Figure 2. 7 : Détermination des températures de demi-dénaturation de ZraSp et des variants. 107

Figure 2. 8 : Effets des substitutions d'acides aminés sur le repliement de ZraSp. 110

Après avoir mis en évidence l'interaction entre ZraS et ZraP, nous avons voulu caractériser biochimiquement ZraS et plus particulièrement le domaine périplasmique qui interagit avec ZraP. Nous ne nous sommes pas intéressés à ZraP car cette protéine avait déjà été grandement caractérisée dans le laboratoire et fait l'objet d'une publication.

Le zinc étant considéré comme la molécule activatrice naturelle du système Zra, et le système pouvant s'activer en absence de *zraP*, l'activation implique probablement une fixation du zinc sur le domaine périplasmique de ZraS. Le mode de fixation du zinc sur ZraS et notamment les résidus ligands n'étant pas connus, cela a été l'objet de mes travaux dès le début de la thèse. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec le domaine périplasmique (ZraSp), pour pouvoir réaliser les études en solution avec de la protéine purifiée.

1. Purification de ZraSp

La protéine ZraS possède deux domaines transmembranaires qui entourent un domaine périplasmique de 167 résidus, responsable de la détection du signal activateur du système Zra (Figure 2 .3).

La séquence codant pour le domaine périplasmique (ZraSp) a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique de *E. coli*. Puis, ce fragment a été cloné dans un plasmide permettant la surproduction de ZraSp avec une étiquette strep en N-terminal (pASK-IBA7^{+}). La protéine recombinante a ensuite été produite chez *E. coli* (BL21 (DE3)) avant d'être purifiée en deux étapes, une étape de chromatographie d'affinité sur colonne de résine Strep-Tactin® et une étape de filtration sur gel sur résine Sephadex SDX 75 ® (Figure 2. 1 B).

On peut voir, sur la Figure 2. 1 A, qu'après passage de l'extrait brut sur la colonne de chromatographie d'affinité, ZraSp est présente dans les fractions d'élution, où elle constitue la protéine majoritaire, même s'il reste quelques contaminants de plus hauts poids moléculaires.

La seconde étape de purification par chromatographie d'exclusion permet de se débarrasser de ces contaminants, ils sont élués avant ZraSp (Figure 2. 1 B, pic 1) qui est retrouvé dans deux pics différents correspondant à des volumes d'élution de 58 et 73 mL (Figure 2. 1 B, pic 2 et 3). Les protéines contenues dans les deux pics migrent, sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices, à la taille attendue pour ZraSp (autour de 20 kDa). Il semble donc qu'après purification, ZraSp existe sous deux états oligomériques distincts.

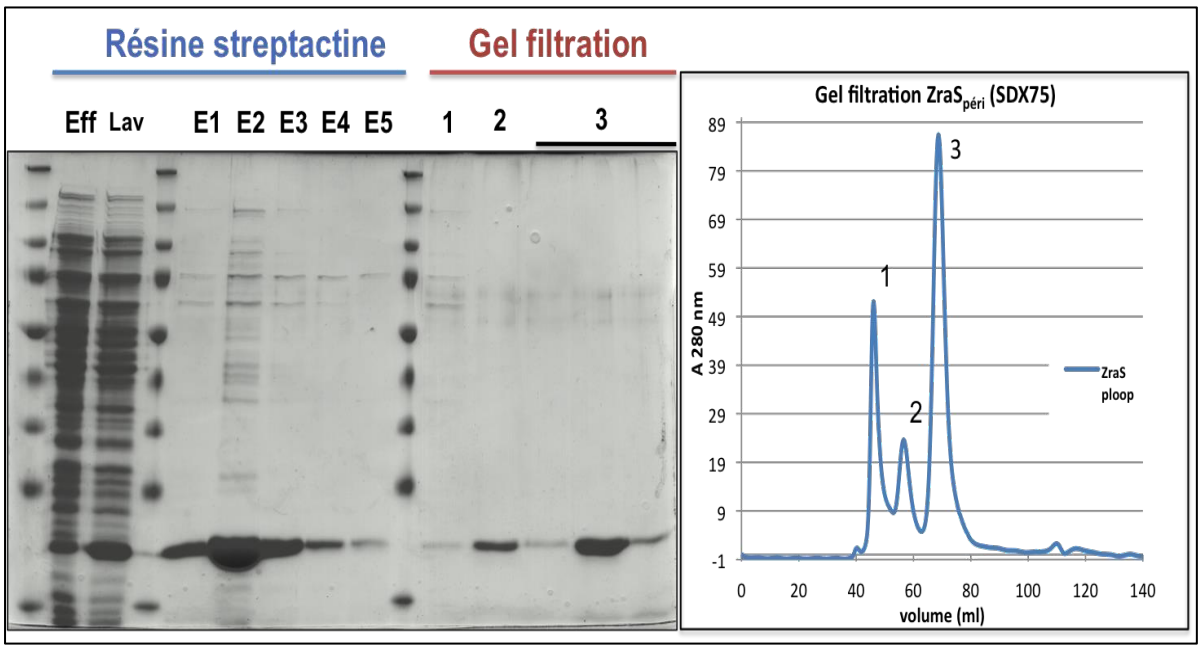


Figure 2. 1 : ***Bilan de la purification de ZraSp. (A) Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes bilan de la purification de ZraSp.***

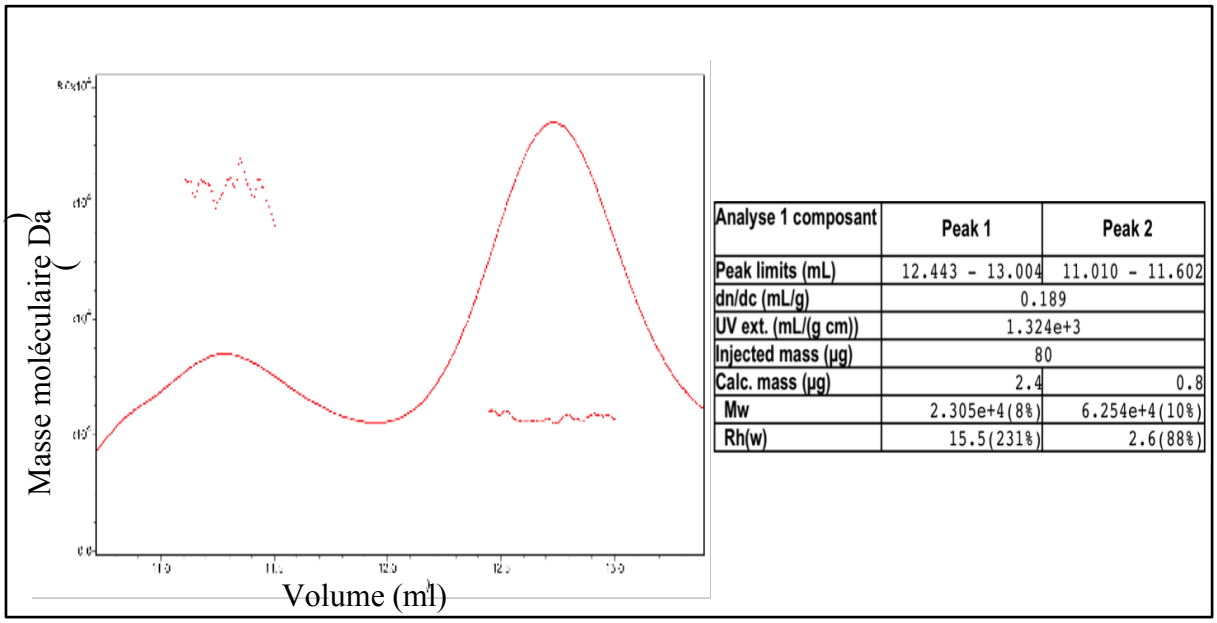
ZraSp est d'abord purifiée sur résine StrepTactin® (à gauche) en 3 étapes : Dépôt (puits Eff) Lavage (puits lav) Elution (puits E1, E2, E3, E4 et E5). L'échantillon sorti de la colonne StrepTactin est débarrassé des derniers contaminants et de la D-desthiobiotine par chromatographie d'exclusion (à droite) sur colonne sephadex SDX 75 (puits 1, 2 et 3 correspondant aux pics 1, 2 et 3). La bande représentative de ZraSp se trouve entre les bandes de 15 et 25 kDa du marqueur de taille utilisé.

2. Détermination de l'état oligomérique de ZraSp

Afin de caractériser la structure quaternaire de la protéine dans les deux fractions de filtration sur gel, nous avons analysé le contenu des deux pics réunis, par SEC-MALS. La Figure 2. 2 montre que l'échantillon contient deux populations distinctes, une majoritaire (75 % de l'échantillon) correspondant à une protéine homogène de 23 kDa, indicatif d'une forme monomérique et une minoritaire, qui contient un mélange de formes plus hétérogènes, dont la majorité présente une masse de 62 kDa (25 % de l'échantillon) et qui correspond à des trimères de ZraSp.

Après purification, le domaine périplasmique de ZraS est donc majoritairement retrouvé sous forme monomérique. Il est communément admis que les senseurs histidine kinase des systèmes à deux composants sont des dimères, cependant la purification des domaines périplasmiques isolés conduit le plus souvent, comme c'est le cas avec ZraSp, à des formes

monomériques (Cheung & Hendrickson, 2010), ce qui suggère que le dimère est principalement stabilisé par les domaines transmembranaires.



Analyse 1 composant	Peak 1	Peak 2
Peak limits (mL)	12.443 - 13.004	11.010 - 11.602
dn/dc (mL/g)	0.189	
UV ext. (mL/(g cm))	1.324e+3	
Injected mass (µg)	80	
Calc. mass (µg)	2.4	0.8
Mw	2.305e+4(8%)	6.254e+4(10%)
Rh(w)	15.5(231%)	2.6(88%)

Figure 2. 2 : Analyse de l'état d'oligomérisation de ZraSp après purification, par analyse SEC-MALS.

Un échantillon issu des deux pics de ZraSp obtenus après filtration sur gel sur superdex 75 analytique a été analysé par SEC-MALS. Le calcul du rayon d'hydratation des protéines (calculé à partir de la diffusion de lumière) permet de déterminer la masse molaire des populations de ZraSp. Les pointillés au-dessus et en dessous des pics de gels filtration montrent l'homogénéité de la masse moléculaire des protéines contenues dans chaque pic. Les mesures ont été effectuées sur la plateforme AUC-PAOL de l'Institut de Biologie Structurale.

3. Identification des sites de fixation du zinc sur le domaine périplasmique de ZraS.

En observant la séquence des 250 premiers acides aminés (parmi 465 résidus composant ZraS) qui composent ZraS (Figure 2. 3), on s'aperçoit que son domaine périplasmique (en rouge) contient cinq résidus histidine (H73, H74, H104, H159 et H162) et un résidu cystéine (C167), résidus très fréquemment retrouvés comme ligands des métaux divalents dans les métalloprotéines.

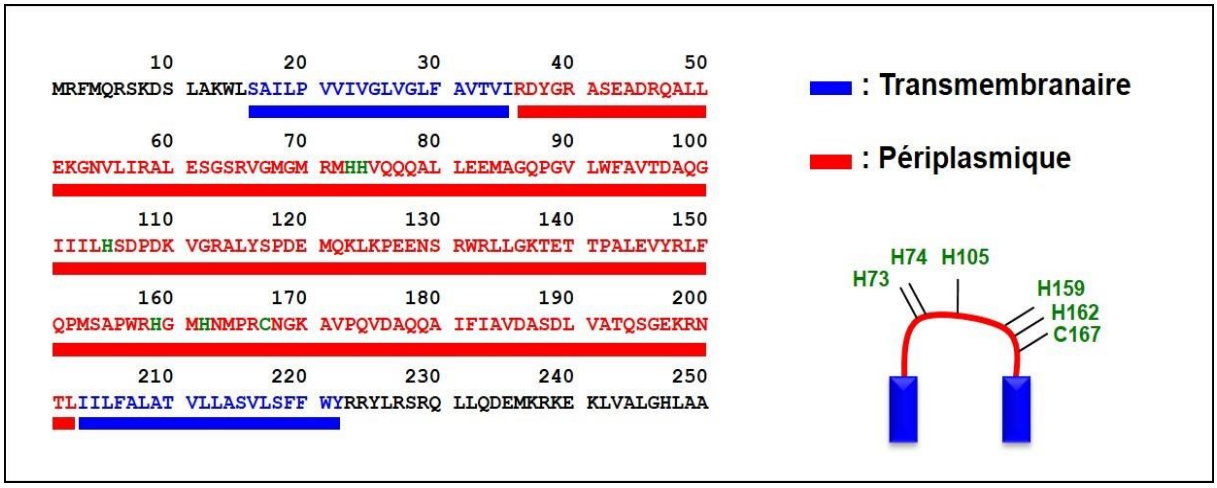


Figure 2. 3 : 250 premiers acides aminés de ZraS.

La séquence de ZraS est ici indiquée avec en rouge la délimitation du domaine périplasmique et en bleu les domaines transmembranaires. Les domaines transmembranaires ont été prédits grâce à des programmes de prédiction tel que Jpred. Les résidus qui pourraient participer à la liaison du zinc sont surlignés en vert.

Afin de tester la capacité de la protéine à lier le zinc, des expériences de fixation sur résine NTA chargée en zinc (Zn-NTA) ont d'abord été menées (Figure 2. 4 A). ZraSp a été déposée sur colonne Zn-NTA puis la résine a été lavée avec différents tampons (Figure 2. 4 légende). Comme contrôle négatif, ZraSp a été déposée sur une résine chargée en cadmium (Cd-NTA), métal non activateur du système. Le contenu des différentes fractions a ensuite été analysé sur gel SDS-PAGE. Sur la Figure 2. 4 A, on constate que ZraSp reste liée à la résine Zn-NTA lors du dépôt et ne commence à être éluée qu'après lavage avec 10 mM d'imidazole. La même expérience menée avec la résine Cd-NTA (Figure 2. 4 B) montre que ZraSp commence à être éluée dès le début des lavages avec un tampon sans imidazole. On confirme donc que le domaine périplasmique de ZraS lie le zinc mais pas le cadmium.

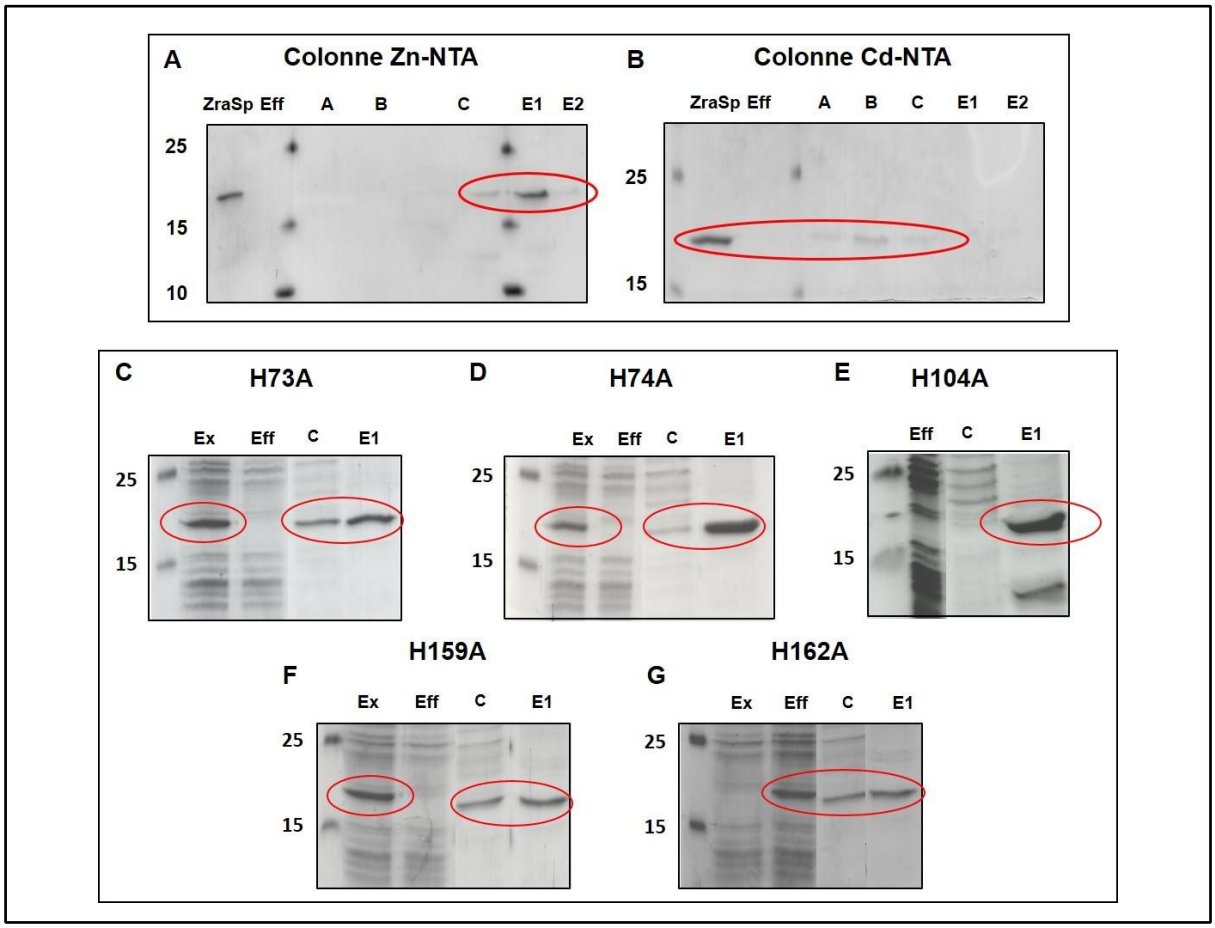


Figure 2. 4: Capacité de liaison de ZraSp et des variants a une résine Zn-NTA.

ZraSp, après purification, a été chargée sur une résine Zn-NTA ou Cd-NTA (Eff) puis la résine a été lavée avec du tampon A (Hepes pH 7,5 50 mM, NaCl 10 mM), B (Hepes pH 7,5 50 mM, 100 mM NaCl) et C (Hepes pH 7,5 50 mM, NaCl100 mM, Imidazole 10 mM). La protéine a ensuite été éluée avec du tampon contenant 500 mM d'imidazole (A et B). Des extraits cytoplasmiques contenant les variants H73A, H74A, H104A, H159A ou H162A surproduits ont été déposés sur résine Zn-NTA (C à F). La capacité de ces variants à être retenus sur la résine a été mesurée avec les mêmes tampons que pour les figures A et B.

4. Identification des résidus impliqués dans la coordination du zinc

Dans le but d'identifier les résidus clés qui interviennent dans la coordination du zinc, les résidus histidine et cystéine présents dans la séquence de ZraSp ont été individuellement substitués par des résidus alanine. Les variants ont été surproduits chez de *E. coli* BL21(DE3) et les extraits cytoplasmiques déposés sur résine Zn-NTA. Comme dans l'expérience précédente, la résine a ensuite été lavée avec différents tampons contenant ou non de l'imidazole (Figure 2. 4 C à F). Les résultats montrent que la substitution des résidus histidine 73, 159 et 162 modifie la fixation de ZraSp sur le zinc, par rapport à la forme sauvage,

puisque les variants sont élués dès l'étape de lavage avec le tampon contenant 10 mM d'imidazole. Les variants H74A et H104A sont élués seulement après lavage avec le tampon contenant 500 mM d'imidazole. On en conclut donc que la liaison avec le zinc de ZraS n'est pas affectée par l'absence des histidines H74 et H104 et donc qu'elles ne participeraient pas à la coordination du zinc de ZraSp. Grâce à ce premier criblage nous avons mis en évidence certains variants intéressants qui sont altérés dans leur capacité à lier le zinc. Le nombre de zinc fixé par les variants a ensuite été déterminé par la méthode du PAR (McCall & Fierke, 2000*b*).

Le zinc est un métal qui n'est pas détectable par spectrophotométrie UV/visible. Nous avons donc utilisé le 4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR), un chélateur chromogène dont le spectre d'absorption dans l'UV et le visible est modifié, lorsqu'il chélate un métal divalent.

Le protocole de métallation décrit pour ZraP nécessite d'ajouter au moins 100 fois plus de zinc que de protéine (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Les premiers essais de métallation avec ZraSp, ont montré une agrégation (indiquée par l'apparition d'un précipité blanc) de la protéine suite à l'ajout du zinc en excès. Une hypothèse étant que cette agrégation pouvait être due à la fixation du zinc sur des sites de liaison de basse affinité à la surface de la protéine, l'échantillon a été pré-incubé avec de l'EGTA avant d'être traité avec une concentration de zinc 6 fois en excès. Dans ces conditions, aucun phénomène d'agrégation n'a été observé. Le zinc non lié à la protéine (zinc libre et chélaté à l'EGTA) a ensuite été éliminé par dialyse. Enfin, la protéine a été dénaturée avec du chlorure de guanidium afin de libérer le zinc resté lié et permettre son association avec le PAR.

L'évolution spectrale du PAR suite à l'ajout progressif de la protéine métalée et dénaturée met en évidence une augmentation linéaire de l'absorbance à 500 nm (Figure 2. 5). Le calcul de la pente de la droite, permet de calculer le nombre de moles de zinc fixées par mole de protéine, après division par le coefficient d'absorption molaire du PAR chélaté au zinc (Σ_M = 46 000 M^{-1} cm^{-1}). Le calcul montre que le domaine périplasmique de ZraS fixe en moyenne 0,8 mole de zinc par mole de protéine, ce qui est proche de 1.

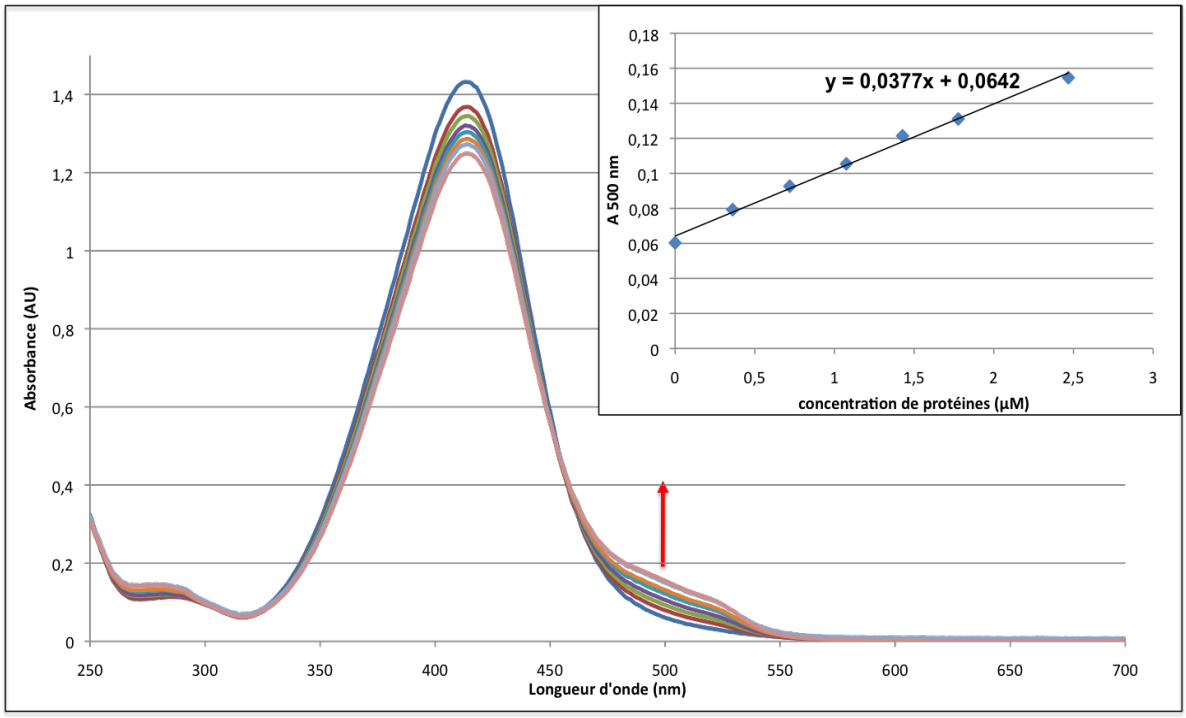


Figure 2. 5 : Evolution spectrale du PAR après ajout de ZraSp traitée au zinc.

40 µM de PAR ont été exposés à des quantités croissantes de ZraSp après métallation en présence d'EGTA, dialyse et dénaturation. Le spectre d'absorbance a été mesuré entre 250 nm et 700 nm après chaque ajout de protéine. L'absorbance à 500 nm, en fonction de la concentration de protéines ajoutée, a été tracée pour en déterminer la quantité moyenne de zinc lié par ZraSp.

Le nombre de sites de liaison du zinc a ensuite été déterminé sur les variants H73A, H74A, H159A, H162A et C167A, après leur purification. Il est à noter que les profils d'élution obtenus lors de l'étape de purification sur colonne de filtration sur gel étaient semblables à celui de la protéine sauvage, ce qui indique que les variants sont sous forme monomérique. Les résultats de métallation montrent que les variants H73A, H159A, H162A et C167A fixent respectivement 0,56, 0,29, 0,28 et 0,43 moles de zinc par mole de protéine (Figure 2. 6), ce qui est significativement moindre que pour la forme non mutée. Les écarts mesurés ne sont pas supérieurs à 0.05. Ces résidus seraient donc importants pour la fixation du zinc sur ZraS et donc pour la détection du métal par le système Zra. De façon surprenante, le double variant H159AH162A lie plus de zinc que les simples variants H159A et H162A. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'en substituant ces résidus histidine par des résidus alanine d'autres groupements, seraient devenus plus accessible au zinc.

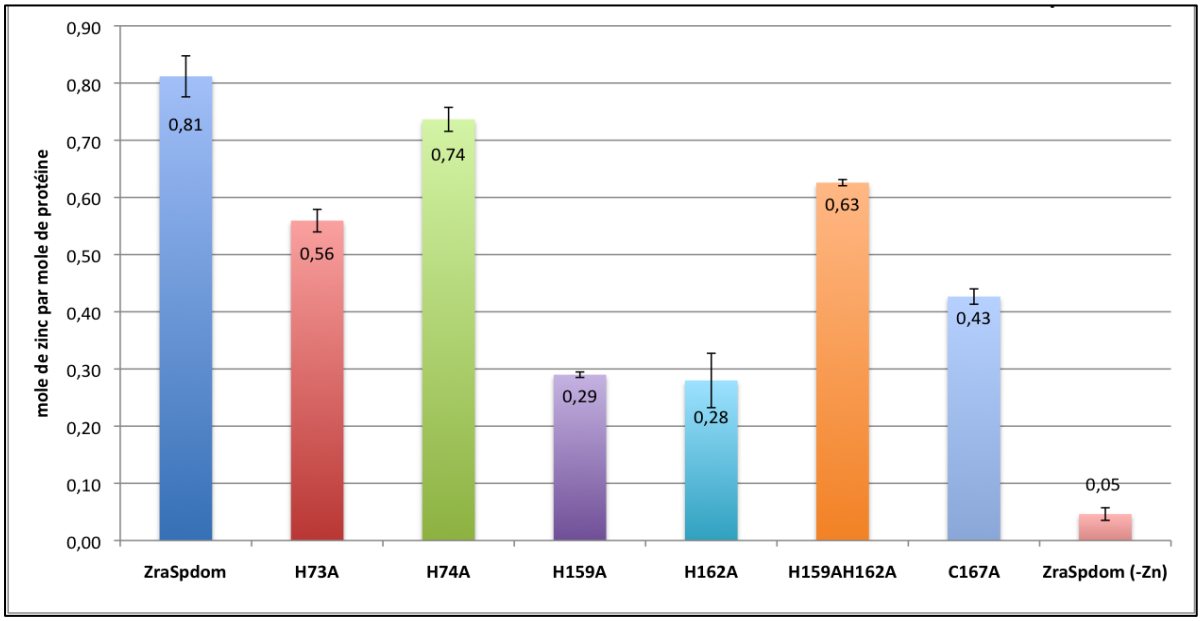


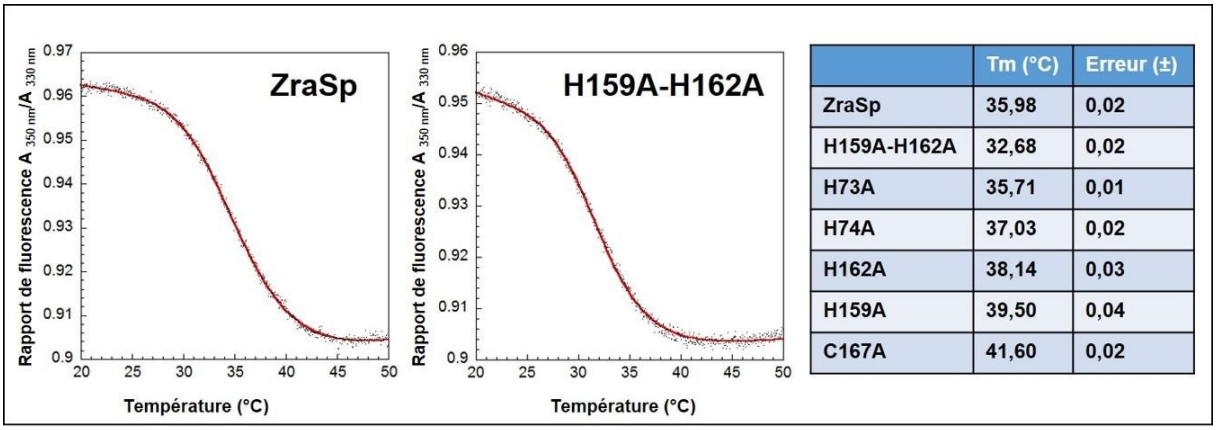
Figure 2. 6 : Détermination du nombre de sites de liaison du zinc de ZraSp.

Différents variants de ZraSp ont été purifiés puis métalés avec du zinc en présence d'EGTA. Le PAR a été exposé à des quantités croissantes de ces variants métalés, dialysés puis dénaturés et les spectres d'absorbances ont été mesuré entre 250 nm et 700 nm à chaque ajout de protéine. ZraSp (-Zn) correspond à de la protéine non métalée.

5. Stabilité thermique de ZraSp et des variants

Afin de comprendre pourquoi le variant H159AH162A lie plus de zinc, nous avons étudié la stabilité thermique de ZraSp ainsi que des variants purifiés. Pour cela, nous avons utilisé les propriétés de la fluorescence des tryptophanes qui, en fonction de l'état de dénaturation de la protéine, sont plus ou moins exposés au solvant. Ainsi, ZraSp a été incubé à 20°C puis la température a été augmentée de 2°C toute les minutes jusqu'à 90°C. La fluorescence des résidus tryptophanes de ZraSp est suivie lors de cette expérience à deux longueurs d'onde, 350 et 320 nm (Nanotemper Prometheus ®). Les résultats montrent qu'elle diminue en fonction de l'augmentation de la température. La courbe de dénaturation a été ajustée à une courbe obtenue à partir d'une régression non-linéaire (Matériels et Méthodes : Détermination de la température de demi-dénaturation de ZraSp et des variants). Ceci nous a permis de calculer précisément la température de demi-dénaturation (Tm) de ZraSp qui est de 35,98°C (Figure 2. 7). Nous avons fait la même expérience avec les variants de ZraSp et les résultats montrent que le H159AH162A a une Tm de 32,68°C ce qui est significativement

inférieure à celle de ZraSp. Cela indique que ce variant a probablement un repliement différent de celui de ZraSp puisqu'il se dénature à une température plus faible. On remarque aussi que la variant C167A est plus thermostable que ZraSp. D'autre part, le variant H73A présente la même Tm que ZraSp native et les variants H74A, H162A et H159A ont une Tm légèrement plus élevée. On peut donc conclure que sauf pour H73, le repliement de ZraSp semble affecté par la substitution des histidines en alanines et que le variant H159AH162A semble être moins replié que ZraSp. Cela pourrait expliquer qu'il lie plus de zinc que les simples variants H159A et H162A (Figure 2.
7).



	Tm (°C)	Erreur (±)
ZraSp	35,98	0,02
H159A-H162A	32,68	0,02
H73A	35,71	0,01
H74A	37,03	0,02
H162A	38,14	0,03
H159A	39,50	0,04
C167A	41,60	0,02

Figure 2. 7 : Détermination des températures de demi-dénaturation de ZraSp et des variants.

Les différentes protéines ont été diluées à 1 mg/mL avant l'analyse par le Nanotemper. La dénaturation thermique a été faite en augmentant la température des échantillons de 2 °C par minute. L'analyse s'est faite de 20°C à 90°C et la fluorescence émise des résidus tryptophane est mesurée pendant toute la durée de l'expérience à 350 et 330 nm.

6. Etude du repliement de ZraSp et des variants

Pour avoir une idée du repliement adopté par ZraSp, nous avons effectué des expériences de dichroïsme circulaire dans l'U.V. lointain. Dans un premier temps nous avons déterminé l'effet de la fixation du zinc sur la structure secondaire de ZraSp. Pour cela, des échantillons de ZraSp apo ou lié au zinc (voir le protocole de mesure de la quantité de zinc lié à ZraSp) ont été dilués dans un tampon phosphate sans chlore (NaP 50 mM, pH 7,5).

L'ellipticité de ces protéines a ensuite été mesurée entre 250 nm et 200 nm (Figure 2. 8). Ce tampon a été choisi car le chlore peut affecter les mesures de CD.

Les résultats montrent, pour ZraSp, un spectre avec des valeurs d'ellipticité négatives présentant 2 pics à 222 nm et 207 nm (Figure 2. 8 A). En dichroïsme circulaire, les protéines contenant seulement des hélices α présentent des spectres avec des ellipticités négatives, entre 250 et 200 nm, et deux pics à 222 nm et 208 nm (Figure 2. 8 B). Les protéines seulement composées de feuillets β montrent des ellipticités négatives avec un seul pic à 218 nm. Il a été montré que la modification du pourcentage d'hélices-α peut mener soit à une augmentation de la valeur de l'ellipticité à 222 nm soit à un décalage de ce pic à 218 nm (Abriata, 2011). ZraSp non liée au zinc présente donc une ellipticité typique de protéines ayant un repliement majoritaire en hélices α.

Avec l'échantillon contenant ZraSp incubé avec du zinc on observe un spectre avec la même forme mais des valeurs d'ellipticité plus élevées. Pour tenter de caractériser les modifications conformationnelles suite à la liaison du zinc sur ZraSp, les spectres de dichroïsme circulaire obtenus ont été comparés à des spectres mesurés avec des protéines dont la structure cristallographique a été résolue (serveur BeStSel). La déconvolution des spectres expérimentaux sur la base de ceux générés pour les protéines dont la structure est connue nous donne une idée du pourcentage d'hélices α, de brins β et de parties non structurées (King & Johnson, 1999). Ainsi, on note que ZraSp contient 31% d'hélices α, 13% de brins β et 39% de parties non-structurées (Figure 2. 9 A), les hélices α sont donc bien majoritaires par rapport aux brins β. Ce résultat est en adéquation avec la prédiction de structure secondaire réalisée à partir de la séquence par le logiciel *Jpred*. En présence de zinc, le repliement de ZraSp est modifié et est composé de 21% d'hélices α, 12% de brins β et 48% de parties non-structurées. La liaison du zinc sur ZraSp fait donc fortement diminuer le pourcentage d'hélices α, qui se sont déstructurées suite à la métallation, mais ne modifie pas le nombre de brins β.

La même expérience a été réalisée avec les variants de ZraSp qui présentent un défaut de liaison du zinc. L'analyse des spectres de dichroïsme circulaire montre une différence d'ellipticité entre les variants H73A, H74A, H159A et H162A (Figure 2. 9A). Les variants H74A, H159A et H162A ont un pourcentage d'hélices α de 25% à 18%, ce qui est inférieur à celui de ZraSp. Le seul variant qui adopte un repliement semblable à ZraSp est le H73A, ce qui est cohérent avec les résultats de mesure de Tm identique pour les deux formes. Etonnamment, suite à la liaison du zinc, l'ellipticité de tous les variants devient semblable puisque leur pourcentage d'hélices α est d'approximativement 20% (Figure 2. 9 B).

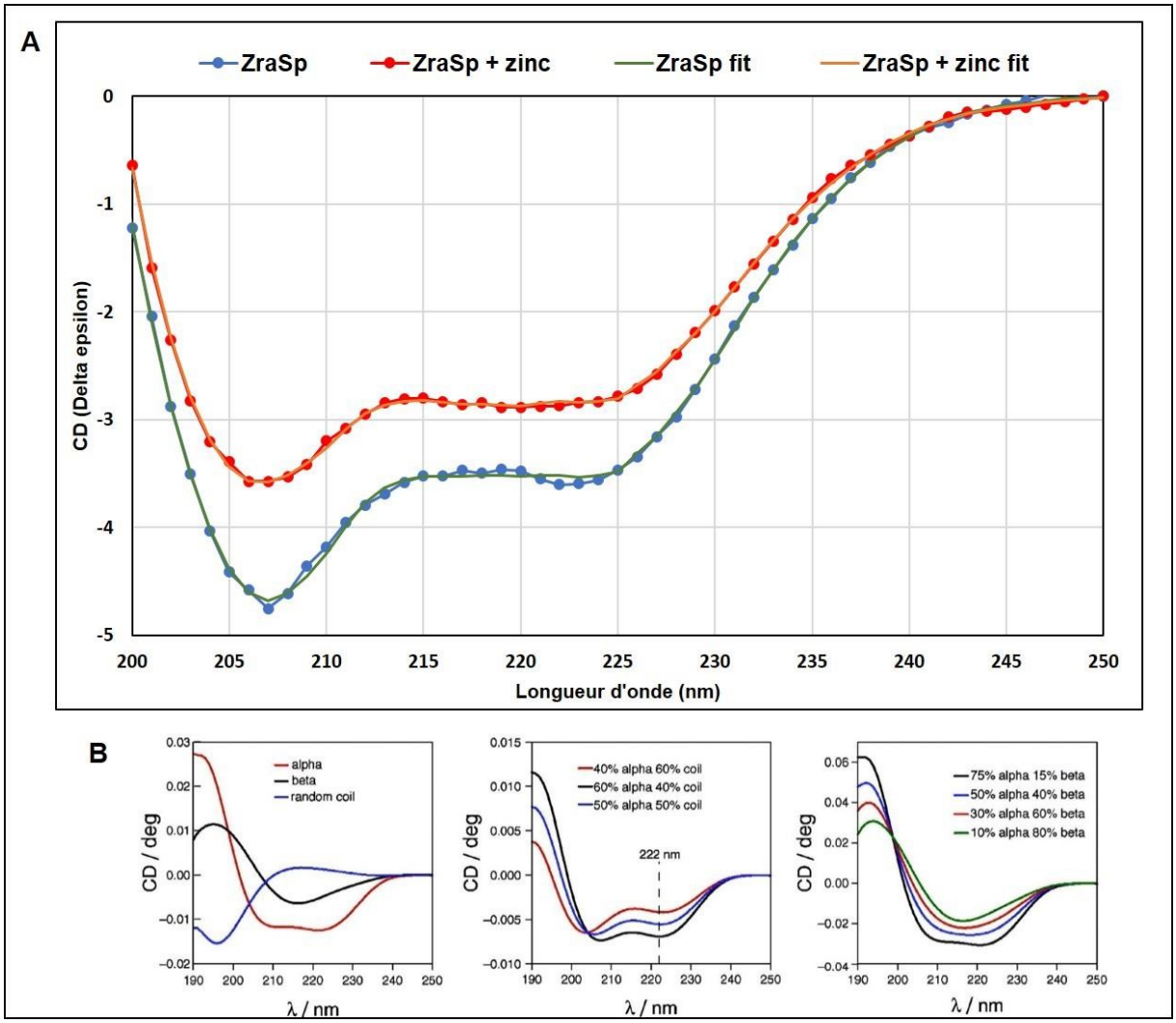
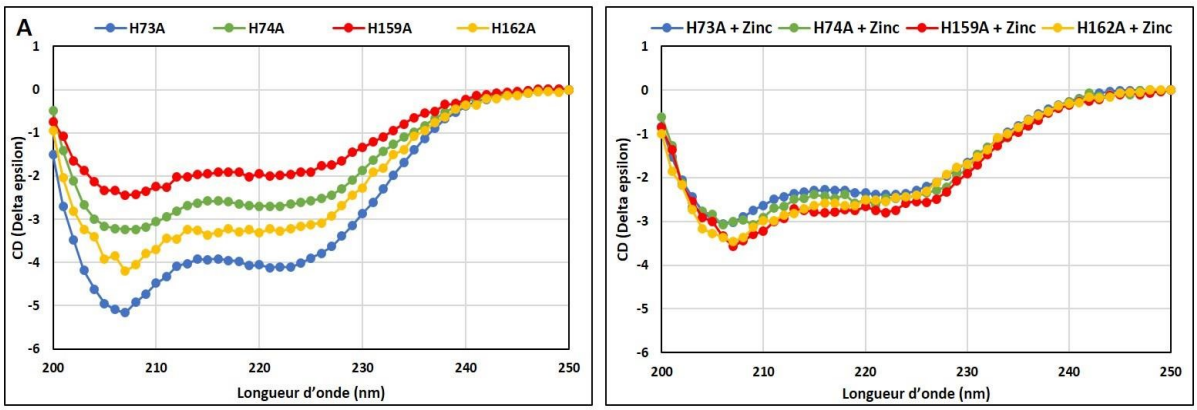


Figure 2. 8 : Etude de l'effet de la métallation sur la structure secondaire de ZraSp par dichroïsme circulaire.

Spectre de dichroïsme circulaire de ZraSp traitée ou non-traitée avec du zinc, dans l'UV lointain
(200 – 250 nm). L'axe des abscisses est exprimé en différence de coefficient d'extinction molaire (A). Simulation de courbes de dichroïsme circulaire exprimée en deg (Abriata, 2011). Les différentes courbes montrent l'évolution des spectres suite à une modification de structure secondaire causant une diminution du pourcentage d'hélices α (B).

Ces résultats indiquent que les substitutions des histidines 74, 159 et 162 ont légèrement modifié la conformation des variants. Ainsi, on peut penser que ces résidus jouent un rôle dans le repliement de ZraSp. Etonnamment, la substitution des histidines, dont nous avons montré l'implication dans la liaison du zinc, ne modifie pas l'ellipticité des variants métalés par rapport à la forme sauvage. Il semblerait que même en l'absence des ligands montrés

comme très impliqués dans la métallation (expériences sur IMAC et dosages des sites au PAR), la même modification de la structure secondaire est observée.



B

	ZraSp	ZraSp + Zn	H73A	H73A + Zn	H74A	H74A + Zn	H159A	H159A + Zn	H162A	H162A + Zn
Hélices-α	31,3	22,4	34,8	21,5	24,5	18,4	18,8	19,8	24,4	22,3
Brins-β	13,3	11,9	16,7	13,9	10,4	17,5	21,1	13,4	14,1	17,9
Boucles désordonné	39,1	48,3	39,1	44,8	45,5	45,6	42,9	46,1	42,8	41,7
RMSD	0,0361	0,022	0,0484	0,0303	0,0386	0,0734	0,0392	0,0508	0,0504	0,0681

Figure 2. 9 : Effets des substitutions d'acides aminés sur le repliement de ZraSp.

Spectres de dichroïsme circulaire des simples variants de ZraSp traités ou non-traités avec du zinc, dans l'UV lointain (200 – 250 nm) L'axe des abscisses est exprimé en différence de coefficient d'extinction molaire (A). Calcul des pourcentages de structures secondaires à partir des spectres de dichroïsme circulaire déconvolués à l'aide du serveur en ligne *BeStSel* (B). Le *root mean square deviation* (RMSD) traduit de la différence entre la courbe expérimentale et la courbe théorique issue de la déconvolution.

Les variants de ZraSp sont donc structurés mais les spectres de dichroïsme circulaire étant différents, cela suggère que les variants n'ont pas le même repliement que la protéine ZraSp native. Ainsi, si la substitution des histidines modifie la conformation globale de la protéine, cela pourrait aussi affecter la capacité de la protéine à fixer le zinc sans pour autant que ces résidus soient directement impliqués dans la fixation du zinc. À cette étape, nous ne pouvons donc pas assurer que les résidus H159, H162 et C167 sont réellement les ligands du zinc. De même, de façon surprenante le variant H73A a été montré comme liant moins de zinc que la forme native alors que les données de mesure de la Tm et de dichroïsme circulaire semblent indiquer qu'il présente une conformation sous forme apo ou métalé très proche de la forme sauvage.

Effets du zinc sur l'interaction entre ZraS et ZraP

Liste des figures de la partie :

Figure 3. 1 : Effet du TPEN sur la formation de complexes contenant la protéine ZraS-strep. 114

Figure 3. 2 : Le TPEN affecte la formation des complexes ZraS-ZraP. 115

Figure 3. 3 : Purification de ZraP. 117

Figure 3. 4 : Contrôles du test d'interaction *in vitro* entre ZraSp et ZraP. 119

Figure 3. 5 : Interaction de ZraSp avec ZraP *in vitro* en présence de formaldéhyde. 120

Figure 3. 6 : La métallation de ZraP potentialise l'interaction avec ZraSp *in vitro*. 122

Figure 3. 7 : Détermination de la fixation du zinc de ZinT par fluorométrie. 123

Figure 3. 8 : Séquences d'acides aminés de ZraSp et ZraP. .....

124 Figure 3. 9 : Etude de la fluorescence émise par ZraSp en fonction de la concentration croissante en zinc. 125

Figure 3. 10 : Etude de la fluorescence émise par ZraSp en fonction des différents niveaux de métallation de ZraP. 127

Nous avons montré que ZraS et ZraP interagissent dans le périplasme (Résultats : Mise en évidence de l'interaction entre ZraS et ZraP), dans des conditions où il n'y a pas de zinc ajouté au milieu de culture. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la concentration du zinc, molécule activatrice du système Zra (Résultats : Caractérisation biochimique de ZraSp), sur cette interaction.

1. Effet du Zinc sur l'interaction entre ZraS et ZraP *in situ*

Dans les expériences de mSPINE décrites précédemment (Figure 1. 2), les bactéries étaient mises en culture dans du milieu *Lysogeny Broth* (LB), qui contient environ 10 µM de zinc, comme montré par des mesures de spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-MS) (Outten, 2001). Afin de caractériser l'effet du zinc sur l'interaction entre ZraP et ZraS, nous avons modifié cette concentration par ajout d'un chélateur ou par ajout de sulfate de zinc. Comme chélateur nous avons choisi le N, N, N', N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) car il présente une forte spécificité pour le zinc et peut traverser les membranes et ainsi atteindre le périplasme.

Il a été montré, dans la littérature, que l'ajout de 5 µM de TPEN au milieu de la phase exponentielle de croissance conduit à de fortes modifications au niveau de la transcription des gènes chez *E. coli* (Sigdel *et al.*, 2006). Nous avons donc choisi de travailler avec une concentration significativement plus faible, 1,5 µM qui est une concentration inférieure à celle du zinc dans le LB mais qui permet de réduire la concentration de zinc dans l'environnement sans toutefois trop affecter le métabolisme bactérien par des effets secondaires.
Les cellules exprimant ZraP et ZraS ont été mises en culture dans du milieu LB complémenté ou non en TPEN (Figure 3. 1). Après ajout du formaldéhyde, les complexes contenant ZraS ont été purifiés sur résine strepactin® et analysés, à une même concentration d'extrait, par immunoblot anti-strep. Les résultats montrent qu'en présence ou en absence de TPEN, des complexes de haut poids moléculaire sont formés, ce qui suggère que le TPEN n'empêche pas la formation de complexes contenant ZraS (Figure 3. 1 puits 1 et 2).

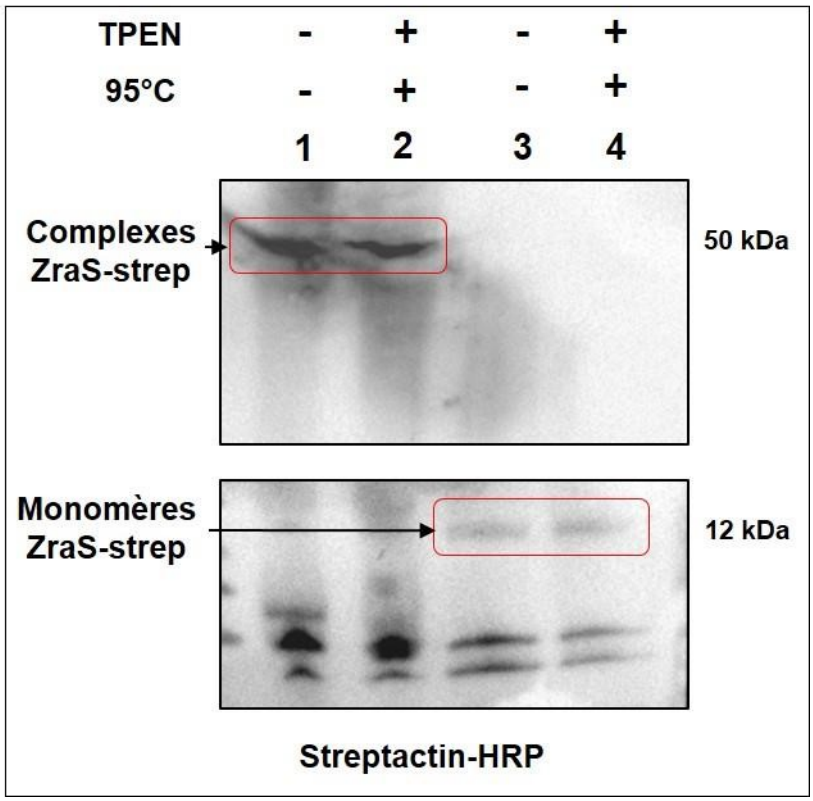


Figure 3. 1 : Effet du TPEN sur la formation de complexes contenant la protéine ZraSstrep.

Les protéines membranaires des bactéries surproduisant ZraS-strep et ZraP, en présence de TPEN, ont été solubilisées et purifiées sur résine StrepTactin® avant analyse par immunoblot avec le conjugué StrepTactin-HRP. Dans la partie haute du gel on observe la formation de complexes contenant ZraS-strep qui sont dissociables après dénaturation thermique.

Dans l'expérience décrite précédemment, la coexistence des deux protéines dans le complexe de haut poids moléculaire avait permis de conclure à une interaction entre ZraP et ZraS. Cependant, la quantification de ZraP lié à ZraS dans le complexe est difficile notamment du fait de l'étalement de la bande. Nous avons donc choisi d'analyser les résultats après dissociation de ZraP du complexe. Cela consiste donc à déterminer la quantité de ZraP qui a été co-purifiée avec ZraS (Figure 3. 2 A). Sur l'immunoblot présenté en Figure 3. 2, on peut observer qu'une partie de la protéine ZraP est co-purifiée avec la protéine ZraS-strep mais sans pontage covalent (Figure 3. 2 A puits 1 et 3). En effet, en absence de formaldéhyde et après immunomarquage avec des anticorps anti-ZraP, on retrouve une bande correspondant à du ZraP sous forme monomère. Nous avions auparavant vérifié que ZraP ne se lie pas à la résine StrepTactin lors d'expériences de co-purfication entre le domaine périplasmique de ZraS

(ZraSp) et ZraP (données non montrées). Dans la condition « pontée », la mesure de l'intensité relative des bandes de ZraP monomère dans le puits « après chauffage » (Figure 3. 2 A puits 2 et 4 et Figure 3. 2 B) montre qu'il y a environ deux fois plus de protéines ZraP co-purifiées avec ZraS dans les cellules cultivées en milieu LB, que dans les cellules cultivées en milieu complémenté par du TPEN. Ainsi, la réduction de la concentration de zinc libre dans le périplasme a réduit la formation du complexe ZraP-ZraS-strep suggérant ainsi une implication de cet ion métallique dans l'interaction entre les deux partenaires.

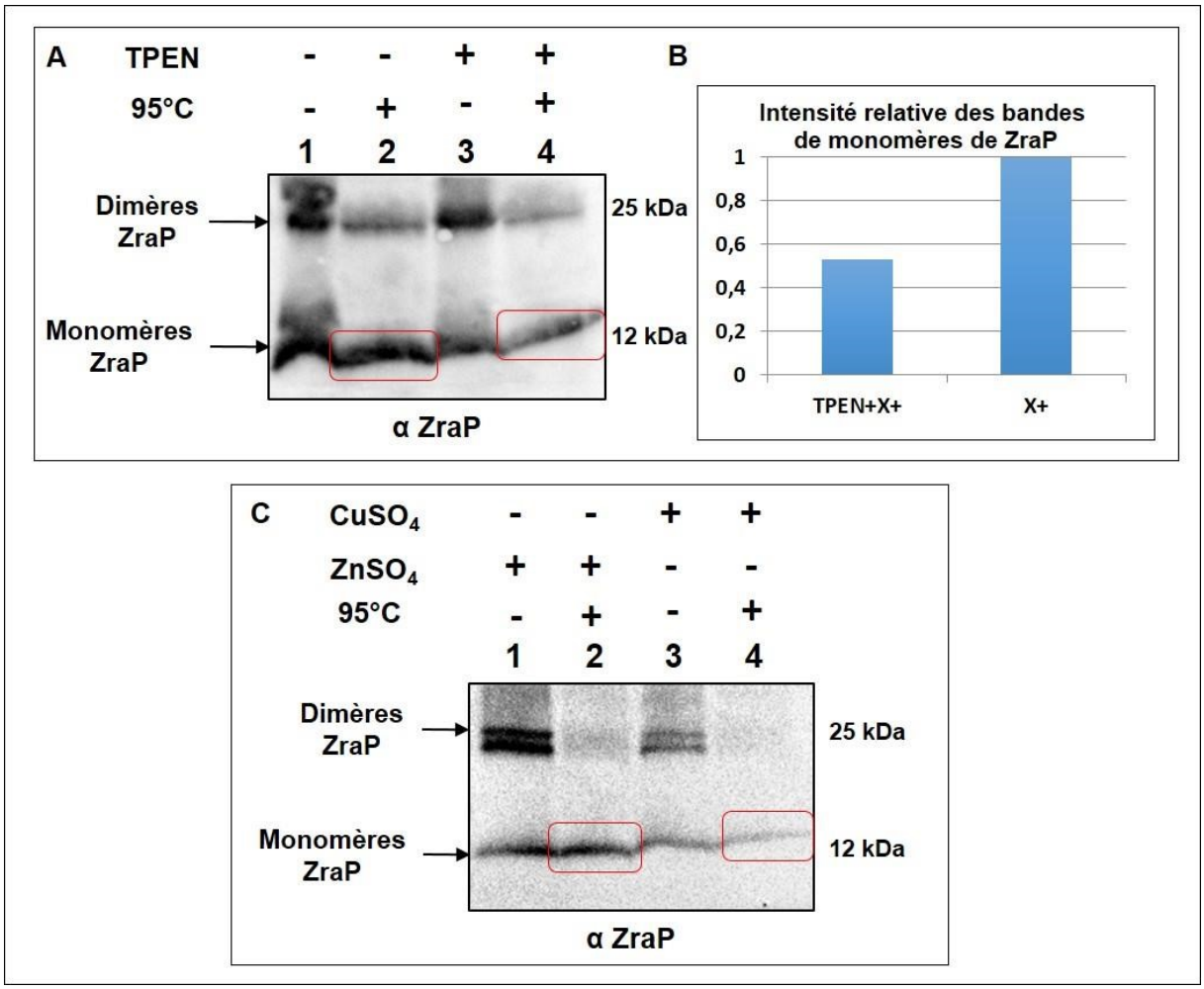


Figure 3. 2 Détermination de la formation des complexes ZraS-ZraP en présence ou en absence de TPEN.

Les extraits de protéines membranaires purifiées, obtenus après mSPINE en présence de LB (A puits 1 et 2), de 1,5 µM de TPEN (A puits 3 et 4), de 500 µM de zinc (C puits 1 et 2) ou de 500 µM de cuivre (C puits 3 et 4) ont été analysés par immunoblot anti-ZraP. L'intensité relative des bandes correspondant aux monomères de ZraP, après dénaturation thermique, a été mesurée à l'aide du programme ImageLab® (B).

Pour confirmer cet effet du zinc sur l'interaction entre ZraP et ZraS, des expériences de mSPINE ont été réalisées avec ajout de sulfate de zinc dans le milieu LB. Du sulfate de cuivre a été utilisé comme contrôle de spécificité du zinc. En effet, des résultats préliminaires ont montré que le Cu^{2+} n'est pas activateur du système Zra mais se lie à ZraS et ZraP (Petit-Hartlein *et al.*, 2015).

Les résultats montrent que les complexes formés en présence de zinc contiennent plus de ZraP co-purifiée avec ZraS que ceux purifiés en présence de cuivre. (Figure 3. 2 C puits 2 et 4). Ces résultats confirment que les protéines ZraP et ZraS interagissent dans le périplasme et cette interaction est spécifiquement potentialisée par le zinc.

Afin de décrire plus précisément cette interaction, nous avons engagé des études de pontage *in vitro* avec ZraP et le domaine périplasmique de ZraS.

2. Interaction entre ZraS et ZraP *in vitro*

2.a. Purification de ZraP

Ayant déjà purifié le domaine périplasmique de ZraS (Résultats : Purification de ZraSp), pour pouvoir faire les essais de pontage covalent entre ZraSp et ZraP, il a été nécessaire de purifier ZraP. Le plasmide pET-15b contenant la séquence codant pour ZraP, sans la séquence d'adressage au périplasme, a été utilisé pour transformer des *E. coli* BL21(DE3). En effet, le protocole de production de ZraP mis au point avant mon arrivée dans le laboratoire préconisait de produire ZraP à partir du cytoplasme (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Le protocole de purification a été modifié par rapport à celui publié, notamment pour augmenter le rendement (et aussi pour réduire le nombre d'étapes). Ce protocole s'appuie sur la forte affinité de ZraP pour le cuivre. La protéine recombinante a donc été purifiée en deux étapes, une étape de chromatographie d'affinité sur colonne de résine Cu-NTA et une étape de filtration sur gel sur résine Sephadex SDX 200 ® (Figure 3. 3).

La Figure 3. 3 A montre l'analyse des fractions d'élution issues de la colonne d'affinité, par SDS-PAGE. On note que l'extrait est très chargé en ZraP et présente des contaminants. Le profil d'élution de la chromatographie d'exclusion présente deux pics (Figure 3. 3 B). Le premier pic contient des contaminants de haut poids moléculaire et le second contient ZraP. Après purification la bande représentative de ZraP à environ 12 kDa est incontestablement

majoritaire, cependant d'autres bandes sont visibles sur le gel SDS-PAGE qui peuvent correspondre à des contaminants ou à des formes oligomériques de ZraP (monomères, dimères, tétramères) qui n'auraient pas été dissociées malgré les conditions dénaturantes. Dans une dernière étape, afin d'éliminer d'éventuelles traces de cuivre lié à ZraP, de l'EDTA a été ajouté et la solution a été dialysée afin de se débarrasser du cuivre qui aurait pu se lier à ZraP.

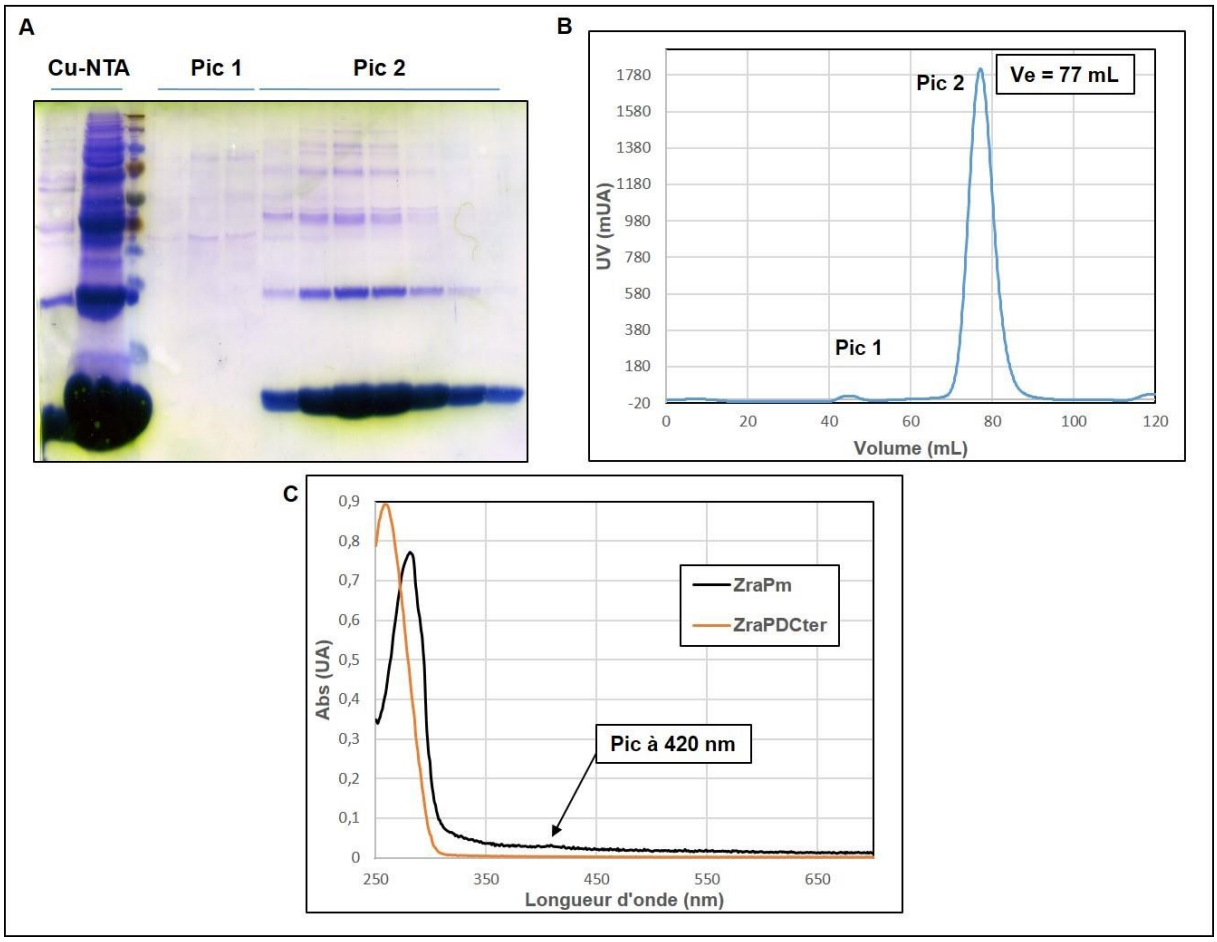


Figure 3. 3 : Suivi de la purification de ZraP.

Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes : ZraP est d'abord purifiée sur colonne CuNTA avant (A) une étape de chromatographie d'exclusion sur colonne sephadex SDX 200(B).
Le volume d'élution (Ve) de 77 mL est comparable avec la forme octamérique attendue pour ZraP. La mesure par UV/visible du spectre de ZraP montre un pic, non présent chez le variant ZraPΔCter, à 420 nm qui démontre une contamination de la protéine par le fer(C).

L'analyse spectrale de ZraP à cette étape montre la présence d'un petit un pic autour de 420 nm (Figure 3. 3 C) significatif d'une contamination au fer probablement due à la

surproduction cytoplasmique de la protéine (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Afin d'éliminer ce fer contaminant, la protéine ZraP a été dénaturée avec du chlorure de guanidine 4M, puis le fer libéré a été réduit par du dithionite et complexé avec de la ferrozine. La protéine ZraP pure a ensuite été récupérée après une colonne de dessalage. Cette étape a aussi permis de se débarrasser des derniers contaminants présents.

Le même protocole a été appliqué pour la purification des variants ZraPΔCter, ZraPΔCterC104A et ZraPH1A. En effet, l'interaction entre ces variants et ZraSp est intéressante à analyser car le variant H1A ne contient plus l'histidine 1 qui est le site de fixation préférentiel du zinc sur ZraP (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). De même le domaine C-terminal et le résidu C104 sont importants pour l'oligomérisation en octamère de ZraP. Ainsi on pourra tester l'influence de l'état d'oligomérisation de ZraP ou si la liaison du zinc sur le résidu H1 affecte l'interaction avec ZraSp.

2.b. Pontages covalents *in vitro* entre ZraSp et ZraP

Expériences contrôles :

Afin de vérifier la capacité du formaldéhyde à ponter les protéines purifiées, ZraSp (Figure 3. 4 puits 3 et 6) et ZraP seules (Figure 3. 4 puits 2 et 5) ont été pontées avec du formaldéhyde durant 35 min à 20°C. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide pour être analysés par immunoblot.

Avec ZraSp, suite au traitement au formaldéhyde, l'immunoblot anti-strep montre une bande d'approximativement 20 kDa compatible avec la taille de ZraSp mais on remarque aussi l'apparition d'une bande de 40 kDa indicative de la formation d'un dimère de ZraSp (Figure 3.

4 puit 3). Les formes dimères n'avaient pas été observées par gel filtration probablement à cause de la faible concentration de protéines lors de cette étape de purification. Sur l'immunoblot anti-

ZraP, la migration sur le gel dénaturant ayant affecté l'oligomérisation de ZraP, on observe une trainée typique des différents états oligomériques de ZraP (du monomère à l'octamère) (Figure

3. 4 puit 4 et 5). L'incubation de ZraP et ZraSp sans traitement au formaldéhyde ne permet pas la révélation de complexes (Figure 3. 4 puits 1 et 4).

Lors des expériences suivantes, ZraSp a été incubée avec ZraP native ou différents variants de ZraP (ZraP et ses variants étant à la même concentration molaire) avant le traitement au formaldéhyde. Dans une des conditions, les protéines ZraSp et ZraP ont aussi été incubées en présence de zinc avant le traitement au formaldéhyde.

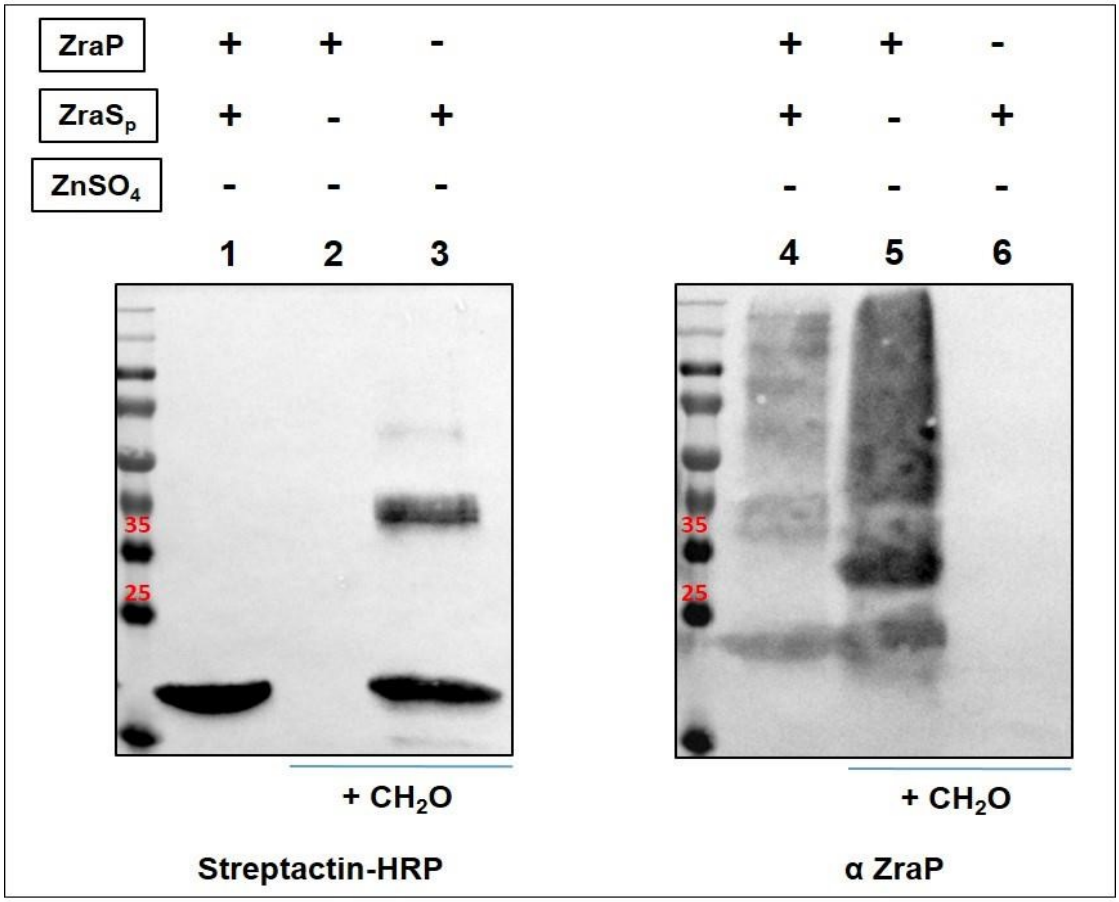


Figure 3. 4 : Contrôles du test d'interaction *in vitro* entre ZraSp et ZraP.

25 µM de ZraP octamérique et 50 µM de ZraSp ont été incubés ensemble (Puits 1 et 4), ZraP seul en présence de 0.5 % de formaldéhyde (Puits 2 et 5) ou ZraSp seul en présence de 0.5 % de formaldéhyde (Puits 3 et 6). Les mélanges ont ensuite été analysés par immunodétection avec le conjugué StrepTactin-HRP (Puits 1 à 3) ou avec l'anticorps anti-ZraP (Puits 4 à 6).

L'immunodétection anti-strep montre l'apparition d'une trainée au-delà de 50 kDa en plus de la bande caractéristique du monomère de ZraSp (Figure 3. 5 puits 1 à 4). Etonnamment, on

voit aussi l'apparition d'une bande intense de 30 kDa lorsque ZraSp est incubée en présence de ZraP

WT, ZraPΔCter et ZraPΔCterC104A (Figure 3. 5 puits 1, 2 et 4). L'intensité de cette bande varie, et est plus intense avec ZraP qu'avec ZraPΔCter et ZraPΔCterC104A. Sur l'immunoblot anti-ZraP on retrouve cette bande de 30 kDa. Ainsi on peut en déduire qu'il s'agit de l'association entre un monomère de ZraSp (20 kDa) et un monomère de ZraP (12 kDa), tout autre type d'association ne conduirait pas à une masse molaire de 30 kDa. Ce résultat confirme donc que même *in vitro*, ZraP interagit avec ZraSp en présence de formaldéhyde. Il est à noter que, si on compare l'intensité de la bande de 30 kDa avec ZraP native en présence ou en absence de zinc (Figure 3. 5 puits 9 et 10), on n'observe pas de différence claire.

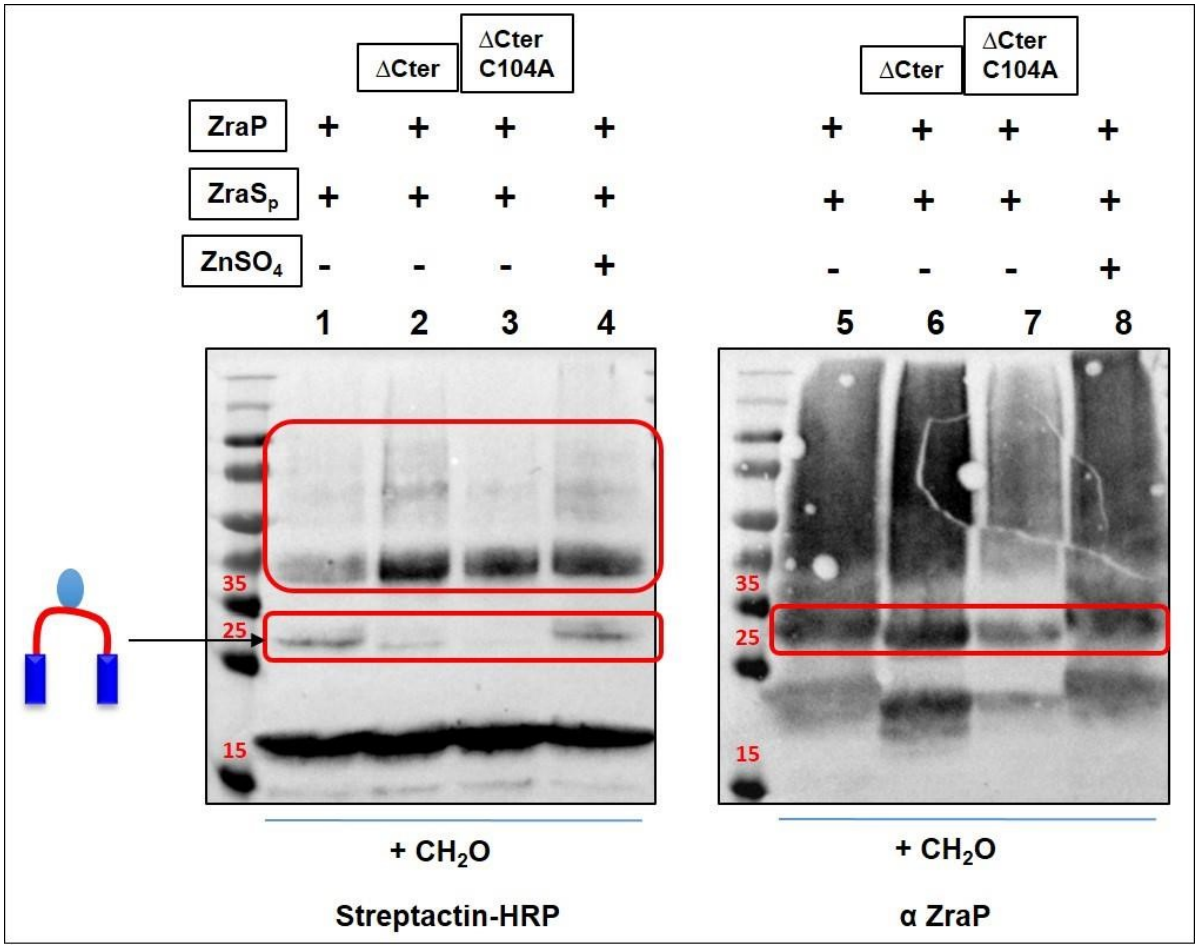


Figure 3. 5 : Mise en évidence de l'interaction de ZraSp avec ZraP *in vitro* en présence de formaldéhyde.

50 µM de ZraSp ont été incubés avec 25 µM de ZraP (Puits 1 et 5), 25 µM de ZraPΔCter (Puits 2 et 6), 25 µM de ZraPΔCterC104A (Puits 3 et 7) ou 25 µM de ZraP et 40 µM de

ZnSO4 (Puits 4 et 8). Le zinc est ajouté en dernier pour éviter la dénaturation de ZraSp. Les échantillons ont ensuite été traités avec 0,5% de formaldéhyde avant de détecter la présence de complexes formés par immunoblot anti-ZraP et anti-strep. Les échantillons contenant ZraSp incubés avec ZraP en présence ou en absence de zinc ont été déposés sur le même gel (puits 9 et 10) et analysés par immunoblot anti-strep. La petite illustration à gauche de la figure représente un monomère de ZraP (boule bleue) en association avec un monomère de ZraSp (boucle rouge).

Le variant ZraPΔCter a été décrit comme formant un dimère *in vitro*, alors que la forme sauvage est octamérique. D'autre part, le résidu C104 de ZraP est impliqué dans la formation d'un pont disulfure. Ces différences par rapport à ZraP native peuvent expliquer la faible affinité observée de ces variants pour ZraSp (Figure 3. 5 puits 2 et 3). Contrairement à ce qu'on a pu observer *in situ*, l'ajout de zinc ne semble pas permettre une meilleure interaction entre ZraSp et ZraP. En effet, aux concentrations de zinc ajoutées par rapport aux quantités de ZraP utilisées, la bande correspondant au complexe ZraSp-ZraP ne semble pas plus intense en présence de zinc par rapport à la condition sans zinc (Figure 3. 5 puits 1 et 4). Cependant, dans cette expérience la quantité de zinc ajoutée était très faible (ratio molaire de 1 : 1 par rapport à la concentration de

ZraSp), ceci dans le but d'empêcher la précipitation de ZraSp causée par l'ajout d'un trop grand excès de $ZnSO_4$, comme il a été observé lors des expériences de métallation de ZraSp (Figure

2. 5).

ZraSp a donc été incubée en présence de ZraP, ZraPΔCter ou ZraPH1A avant l'ajout d'un fort excès de $ZnSO_4$ (20 fois la concentration de ZraSp) et du formaldéhyde. Les échantillons ont ensuite été analysés par immunoblot puis la présence des complexes contenant ZraSp et ZraP a été révélée, comme dans l'expérience précédente, respectivement avec le conjugué StrepTactinHRP et un anticorps anti-ZraP.

Sur l'immunoblot anti-strep on voit encore la présence d'une bande de 30 kDa représentative de la formation de complexes entre un monomère de ZraSp et un monomère de ZraP (Figure 3. 6 puits 1,3,4 et 5). La comparaison des conditions où ZraSp et ZraP sont incubées en présence (Figure 3. 6 puits 1) ou en absence (Figure 3. 6 puits 2) de cet excès de zinc confirme qu'une telle concentration en zinc améliore l'affinité de ZraP pour ZraSp. Lors de ces expériences, étant donné que nous sommes en présence d'une concentration de zinc capable de précipiter ZraSp, nous avons fait particulièrement attention à l'absence d'apparition de

précipités avant et après le traitement au formaldéhyde. L'ajout de ZraP avant l'ajout du zinc semble dans ce cas empêcher la précipitation de ZraSp. L'immunoblot anti-ZraP n'est pas montré mais nous sert, ici encore, à vérifier la présence de ZraP dans l'extrait ainsi que sa co-localisation au niveau de la bande correspondant à 30 kDa.

L'intensité relative de la bande représentative du complexe a été analysée avec le programme ImageLab® (Figure 3. 6 histogramme). On voit que, en excès de zinc, l'intensité de la bande représentant le complexe est deux fois plus intense pour la forme sauvage que pour les variants.

Cela montre que la protéine ZraSp a plus d'affinité pour ZraP que pour les variants ZraPΔCter et ZraPH1A. Cette expérience a permis de montrer que la liaison du zinc par ZraP semble modifier son affinité pour ZraSp.

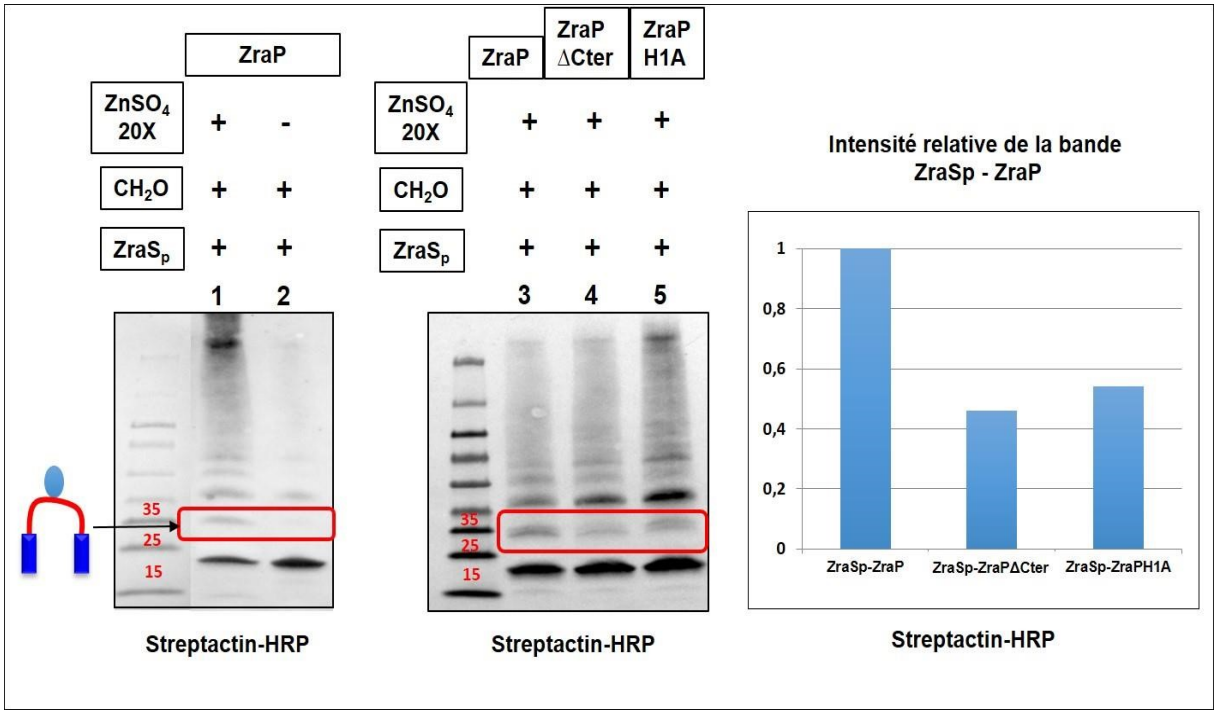


Figure 3. 6 : Détermination de l'effet de la métallation sur l'interaction avec ZraSp *in vitro*. 50 µM de ZraSp ont été incubés avec 25 µM de ZraP (Puits 1 et 4), 25 µM de ZraPΔCter (Puits 2 et 5), 25 µM de ZraPH1A (Puit 5), en présence et en absence de 1 mM de $ZnSO_4$. Les échantillons ont ensuite été traités avec 0,5% de formaldéhyde avant de détecter la présence de complexes formés par immunoblot anti-ZraP et anti-strep. L'intensité relative des bandes correspondant aux complexes ZraSp-ZraP a été analysée à l'aide du programme ImageLab®.

3. Mécanisme d'activation du système Zra

3.a. Modification de la fluorescence intrinsèque de ZraSp par le zinc

Pour tenter d'observer le transfert de zinc entre ZraP et ZraSp, nous nous sommes inspirés du travail de Ilari A et collaborateurs publié en 2014 (Ilari *et al.*, 2014) qui étudiaient une autre protéine périplasmique liant le zinc, ZinT. Dans cette étude, les auteurs ont voulu démontrer que ZinT fixe le zinc. La structure résolue de ZinT leur a montré que le tryptophane 173 (Figure 3. 7 A) se trouve proche du site de fixation du zinc. Ils ont donc mesuré, après excitation à 280 nm, l'intensité de la fluorescence émise par les résidus tryptophane de ZinT en fonction de la concentration de zinc ajouté. Ils ont observé une augmentation de la fluorescence émise à la longueur d'onde de 342 nm en fonction de l'ajout de zinc (Figure 3. 7 B). Ceci est lié à la fixation du zinc qui modifie la fluorescence du résidu W173. Nous avons donc tenté d'utiliser cette propriété du tryptophane pour mettre en évidence un transfert du zinc de ZraP vers ZraSp.

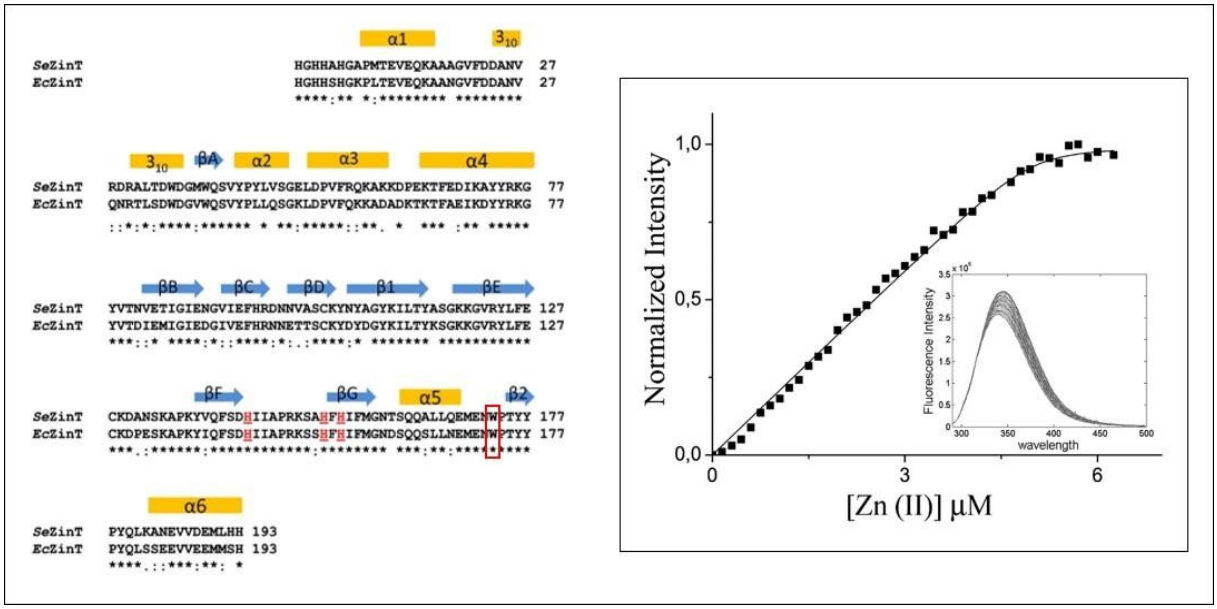


Figure 3. 7 : Suivi de la fixation du zinc de ZinT par spectrofluorométrie.

Séquence d'acides aminés de ZinT issues de *Salmonella enterica* (SeZinT) et *Escherichia coli* (EcZintT). Le résidu tryptophane 173 est entouré en rouge (A). Emission de fluorescence de ZinT après excitation à 280 nm en fonction de la concentration de zinc ajouté (extrait de Ilari et al., 2014). On peut voir que la liaison du zinc cause une modification de la fluorescence émise par ZinT. Celle-ci atteint un plateau lorsque ZinT a fixé la quantité maximale de zinc liée (B).

Les séquences de ZraSp et ZraP, contiennent trois résidus tryptophane et ZraSp contient un tryptophane supplémentaire sur l'étiquette strep (Figure 3. 8). Le résidu W8 sur la séquence de ZraP et le résidu W157 sur ZraSp sont situés sur des domaines prédits comme désordonnés et proches des sites attendus de fixation du zinc de ZraP et ZraSp ce qui suggérerait que l'expérience réalisée sur ZinT pourrait être appliquée à ZraP et ZraSp. Nous avons donc d'abord étudié l'effet de l'ajout de zinc sur la fluorescence émise par ZraSp et ZraP après excitation à 280 nm.

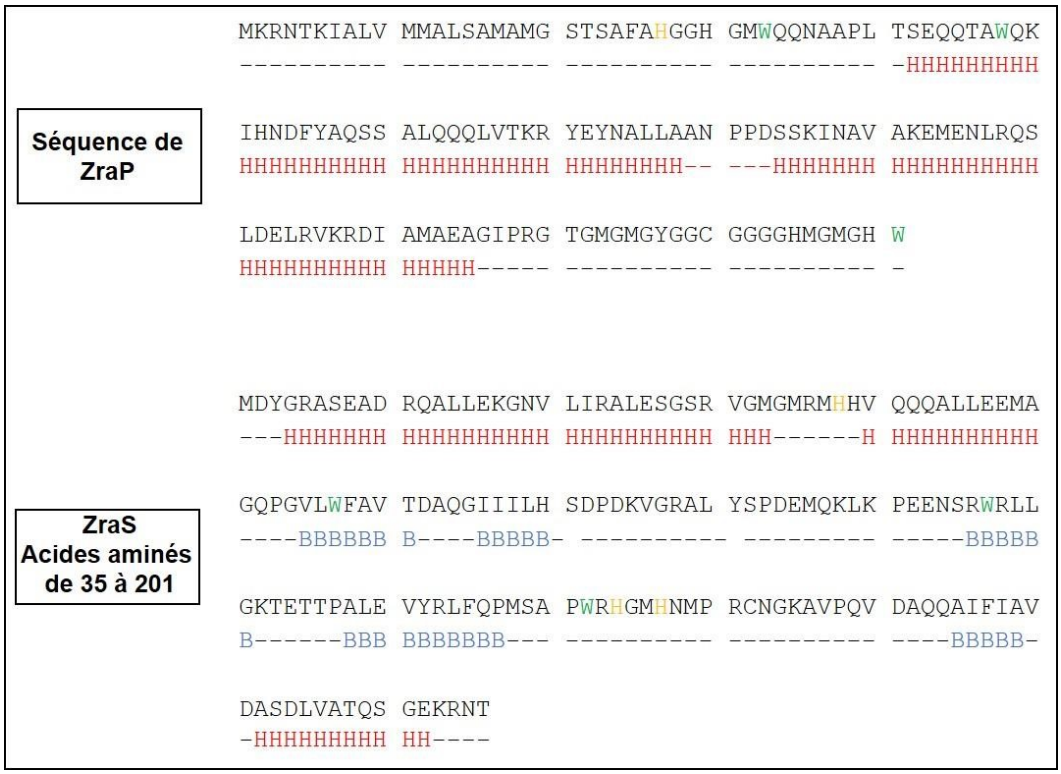


Figure 3. 8 : Séquences en acides aminés de ZraSp et ZraP.

Les résidus tryptophane présents sur les séquences (en ne comptant pas les tryptophanes présents au sein des étiquettes strep) ont été marqués en vert et les résidus supposés permettant la coordination du zinc en jaune. Les structures secondaires de ZraP et ZraSp ont été prédites par le logiciel *Jpred*. Les hélices α ont été marquées en rouge et les brins β en bleu.

La fluorescence émise par 10 µM de ZraSp après excitation à 280 nm a été mesurée entre 300 nm et 450 nm. Le spectre d'émission présente un pic maximum autour de 340 nm dont l'intensité diminue progressivement lors de l'ajout progressif de zinc (Figure 3. 9 A). Cela peut s'expliquer par le fait que la liaison du zinc à ZraSp cause un *quenching* de la fluorescence émise (comme il est décrit dans la publication de Butkus *et al.*, 2016) Le graphe

de l'évolution de la fluorescence émise à 342 nm en fonction de la concentration de zinc ajoutée représente une droite avec une pente de 1,33 μM^{-1} (Figure 3. 9 B). La même expérience a été réalisée avec une concentration de 5 µM de ZraP. De la même façon, la fluorescence intrinsèque émise par

ZraP augmente à 342 nm en fonction de l'ajout de zinc mais avec une pente de 0.09 μM^{-1} (Figure 3. 9 B) ce qui est 14 fois inférieur à celle de ZraSp. On en conclut donc que la fluorescence intrinsèque de ZraP n'est pas significativement modifiée par la liaison du zinc. La liaison du zinc agissant seulement sur la fluorescence des résidus tryptophane de ZraSp, cela nous donne un outil pour mettre en évidence un éventuel transfert de zinc entre ZraP et ZraSp.

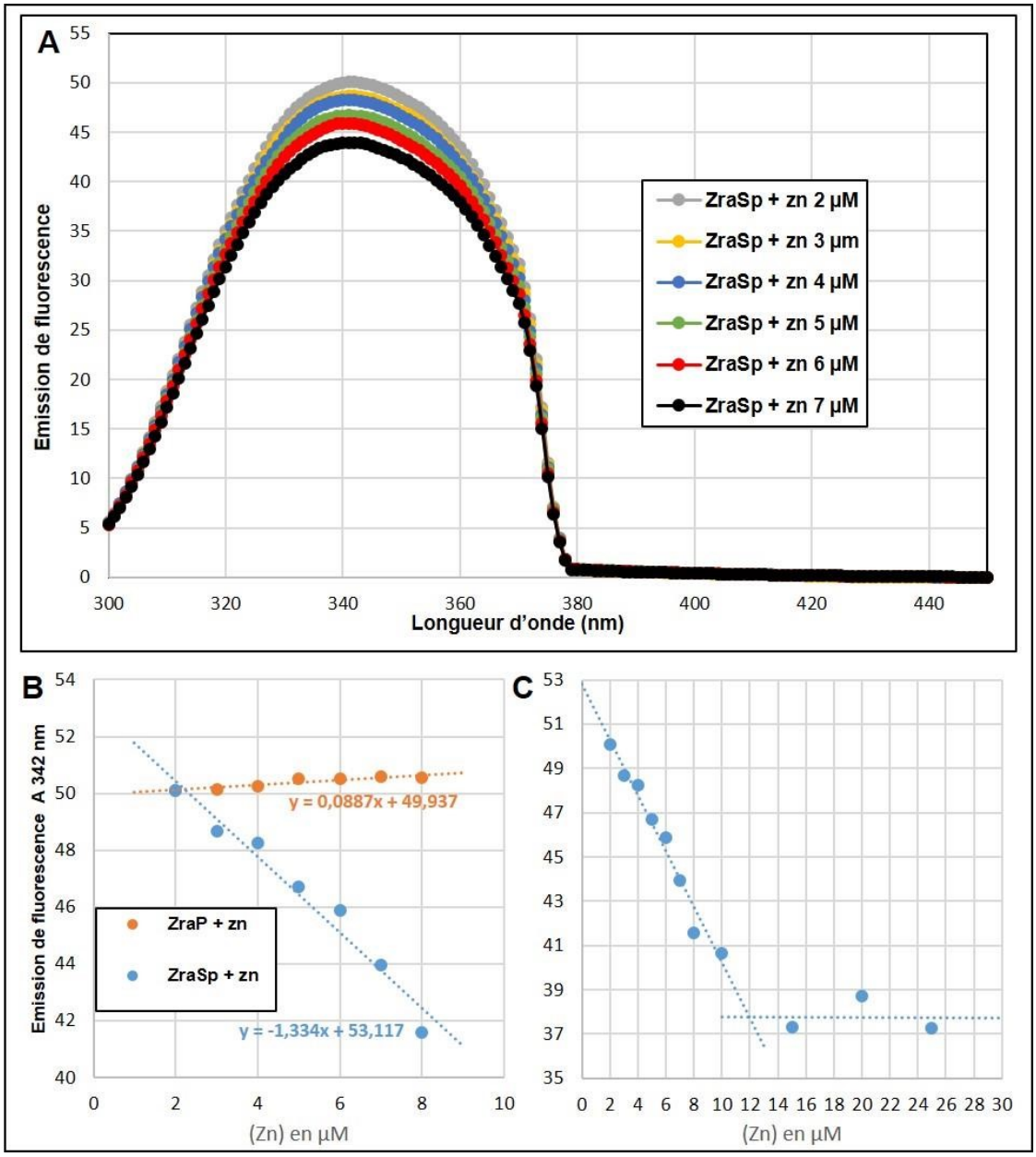


Figure 3. 9 : Effet de l'ajout du zinc sur la fluorescence de ZraSp.

10 µM de ZraSp ou 5 µM de ZraP ont été incubés avec des concentrations croissantes de zinc (de 0 à 7 µM). Après chaque ajout, la fluorescence émise par la protéine, après excitation à 280 nm, est mesurée entre 300 nm et 450 nm (A). Les courbes décrivant la variation de l'émission de fluorescence à 342 nm en fonction de la concentration de zinc ajouté ont été tracées pour ZraSp (B et C) et ZraP (B).

Les propriétés de *quenching* de la fluorescence par le zinc sur ZraSp ont été utilisées pour titrer le zinc comme cela avait été réalisé pour ZinT. La Figure 3. 9 C, présente l'émission de la fluorescence à 342 nm de 10 µM de ZraSp en fonction de l'ajout de zinc. De 0 à 10 µM de zinc ajouté, la fluorescence émise à 342 nm diminue puis se stabilise autour de 12 µM. La rupture de pente se produisant pour un ratio de 1 indique que ZraSp lie approximativement 1 mol de zinc par mol de protéine. Cette valeur est tout à fait comparable à celle obtenue avec le test de quantification du zinc à l'aide du PAR (Figure 2. 6 du Identification des résidus impliqués dans la coordination du zinc). La même expérience a été réalisée avec les variants de ZraSp mais sans succès, les protéines précipitant au cours du temps.

3.b. Influence de la métallation de ZraP sur son interaction avec ZraSp

Afin de mettre en évidence un éventuel transfert de zinc entre ZraP et ZraS, la forme native de ZraP et le variant ZraPΔCter ont été incubés avec du sulfate de zinc. Comme contrôle d'une forme apo, ZraP a été traitée par de l'EDTA en excès. Les échantillons ont ensuite été dialysés pour ne garder que le zinc lié aux protéines et éliminer l'EDTA.

La fluorescence émise par 10 µM de ZraSp après excitation à 280 nm a été mesurée entre 300 nm et 380 nm après des ajouts successifs de ZraP, métalé ou apo, ou du variant ZraPΔCter métalé avec du zinc. Dans tous les cas, sauf avec ZraPΔCter, l'incubation de ZraSp avec 3 µM de protéine fait diminuer la fluorescence émise (Figure 3. 10 A). Toutefois, on observe que la fluorescence relative diminue plus avec ZraP pré-incubée avec du zinc qu'avec ZraP ou ZraP pré-incubée avec de l'EDTA. Les pentes des droites décrivant l'évolution de la fluorescence émise à 342 nm en fonction de la concentration de ZraP + zinc, ZraP, ZraP + EDTA, MDH et ZraPΔCter -zinc sont respectivement de -4,94, -4,60, -4,18, -1,77 et 1,46 μM^{-1}.

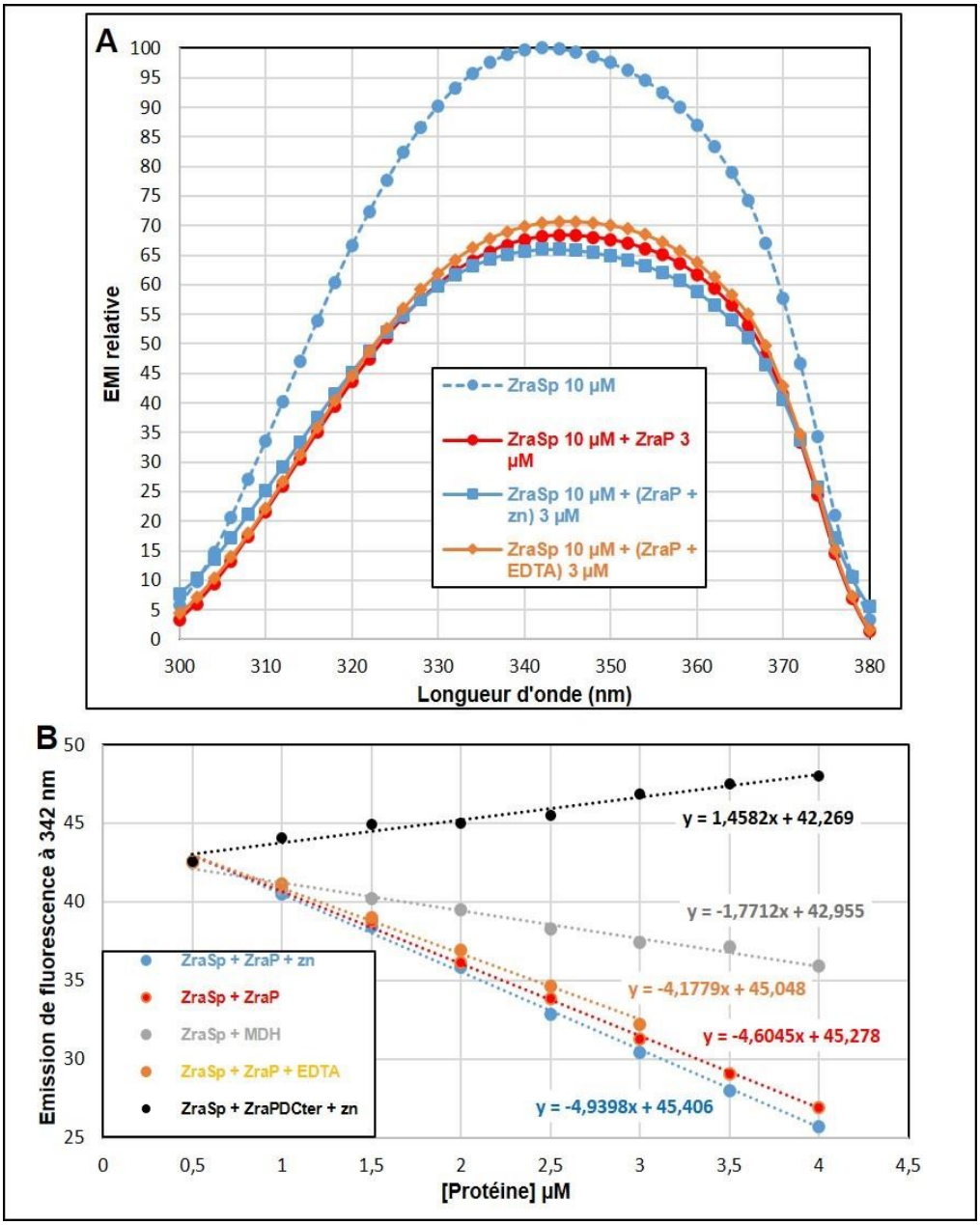


Figure 3. 10 : Effet de l'ajout de ZraP sur la fluorescence de ZraSp.

10 µM de ZraSp ont été incubés seuls, avec 3 µM de ZraP, 3 µM de ZraP traitée avec du zinc ou 3 µM de ZraP traitée à l'EDTA et dialysé. Le spectre de fluorescence émise après excitation à 280 nm a été mesuré entre 300 et 380 nm (A). 10 µM de ZraSp ont été incubés avec des concentrations croissantes de ZraP, ZraP avec du zinc, ZraPΔCter métalé avec du zinc, ZraP traitée à l'EDTA (de 0 à 5 µM). Le contrôle négatif a été fait avec des concentrations croissantes de MDH. Après chaque ajout, le maximum de fluorescence émis par la protéine, après excitation à 280 nm, est mesuré. Les courbes décrivant la variation de l'émission de fluorescence de ZraSp à 342 nm en fonction de la concentration de protéine ajoutée ont été tracées (B).

La MDH n'ayant aucun lien avec le système Zra, on peut considérer qu'une pente inférieure à 1,77 est significative d'une interaction non spécifique avec ZraSp. La valeur absolue de la pente obtenue avec ZraPΔCter-zinc étant proche de celle obtenue avec la MDH, on peut considérer que la variation de fluorescence n'est pas significative. Par contre, les pentes mesurées montrent que la dynamique des résidus tryptophane de ZraSp est plus rapide en présence de ZraP incubé avec du zinc qu'avec du ZraP ou alors du ZraP incubée avec de l'EDTA.

Dans les conditions utilisées pour la métallation de ZraP, sans incubation avec de l'EGTA, on attend une occupation des sites à haute et basse affinité. ZraPΔCter, qui est supposé ne pas contenir les sites à basse affinité devrait contenir du zinc seulement dans les sites à haute affinité. Enfin, ZraP incubée avec de l'EDTA est attendue sous forme nom métalée.

Cela suggère que ZraP a plus d'affinité pour ZraSp lorsque les sites de fixation du zinc à haute et basse affinité sont chargés. Cela impliquerait que l'activation du système Zra se ferait lorsque
ZraP amène le zinc à ZraS. Cette expérience seule ne permet toutefois pas de démontrer qu'un transfert de zinc à lieu entre ZraP et ZraSp. En effet, même si le changement de la fluorescence intrinsèque de ZraP est très négligeable par rapport à celle de ZraSp lors de l'ajout du zinc, on ne peut pas savoir si c'est l'interaction de ZraP avec ZraSp ou le transfert du zinc de ZraP à
ZraSp que l'on observe.

Rôle de la protéine accessoire ZraP

Liste des figures de la partie :

Figure 4. 1 : Effets de ZraP sur la dénaturation chimique de la MDH. 132

Figure 4. 2 : Stabilité thermique des variants H1A et H4A. 133

Figure 4. 3 : Activité chaperon des variants H1A et H4A. 135

Figure 4. 4 : Effets de 2 concentrations de polymyxine B sur la survie des souches sauvages et *ΔzraR*. 136

Figure 4. 5 : Activité de chaperon périplasmique de ZraP. 138

Figure 4. 6 : Effets du zinc et de la polymyxine B sur la croissance bactérienne. 139

Figure 4. 7 : Impact de la sur activation du système Zra par le zinc. 141

Dans la partie sur l'effet du zinc sur l'interaction entre ZraS et ZraP, nous avons étudié le rôle de régulateur ZraP pour le système Zra, et montré qu'il est très probablement médié par une interaction entre ZraP et le domaine périplasmique de ZraS, cette interaction étant favorisée par la présence de zinc. La protéine ZraP a aussi été proposée comme une possible protéine chaperon périplasmique, sur la base de sa forte homologie structurale avec le chaperon périplasmique Spy (Appia-Ayme *et al.*, 2012). Cela a été confirmé par une étude, menée précédemment dans le laboratoire, qui a mis en évidence, *in vitro*, la capacité de ZraP à protéger la malate deshydrogénase (MDH), une protéine modèle, de la dénaturation thermique. Cette activité est plus importante en présence zinc (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Dans le cadre de ma thèse, j'ai poursuivi ce travail.

1. Activité de chaperon périplasmique de ZraP

1.a. ZraP protège la malate déshydrogénase de la dénaturation chimique

L'étude précédente avait mis en évidence un rôle chaperon de ZraP dans le cas d'une dénaturation thermique (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). J'ai testé cette activité dans le cas d'une dénaturation chimique. Pour ce test, 5 M d'urée ont été ajoutés à 390 nM de MDH commerciale en présence ou en absence de ZraP. La déviation de lumière à 360 nm par cet échantillon a été mesurée pendant 1000 s (16 min 40 s) à l'aide d'un spectrofluorimètre. Les résultats montrent qu'en présence d'urée, la déviation de lumière de la MDH augmente rapidement avec le temps jusqu'à atteindre une valeur relative de 210 unités de fluorescence à la fin de la mesure (Figure 4. 1), ce qui est le signe d'une dénaturation de la protéine. En présence de ZraP, la déviation de lumière à 360 nm n'augmente pas et reste tout au long de l'expérience à une valeur proche de

1.

Cette expérience montre que ZraP empêche la dénaturation chimique de la MDH comme elle le faisait sur la dénaturation thermique. Il a été montré que cette activité est plus efficace en présence de zinc (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Sachant que le zinc se lie sur les histidines H1 et H4 de ZraP, nous avons voulu comprendre l'importance de ces résidus pour l'activité chaperon de cette protéine.

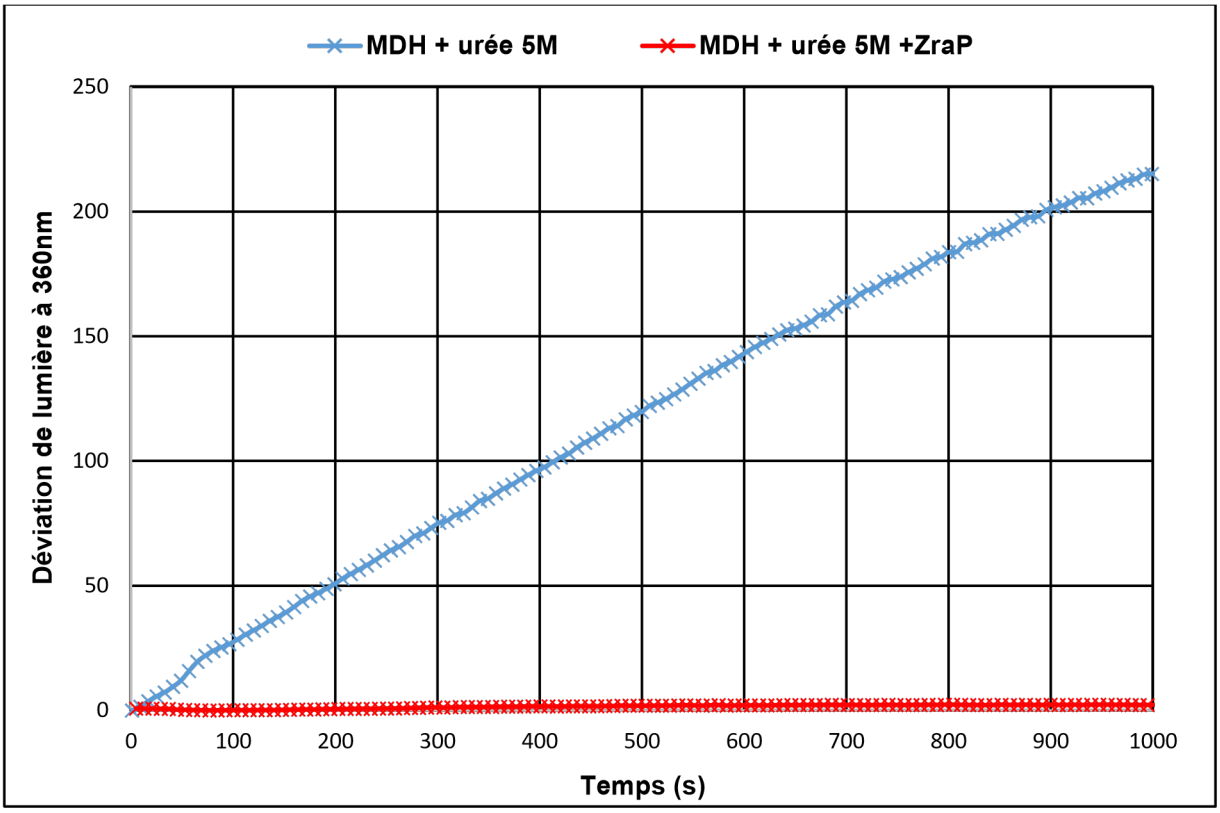


Figure 4. 1 : Détermination de l'effet protecteur de ZraP sur la dénaturation chimique de la MDH. 390 nM de MDH ont été incubés avec 5 M d'urée en présence ou en absence de 12 µM de ZraP. La déviation de la lumière a été mesurée à 360 nm pendant 1000 s (16 min 40 s) à 4°C. Cette expérience a été réalisée en duplicat et les courbes présentées représentent une des mesures.

1.b. Importance des résidus H1 et H4 pour l'activité chaperon

Les variants ZraPH1A et ZraPH4A ont été purifiés comme décrit dans la partie sur l'effet du zinc sur l'interaction entre ZraS et ZraP. Dans un premier temps la stabilité thermique de ces variants a été testée. La Figure 4. 2 montre la variation de la déviation de la lumière à 360 nm en fonction du temps lors du traitement thermique à 42°C. On peut voir que la déviation de la lumière par les variants H1A et H4A augmente de façon comparable pour atteindre un plateau aux environs de 600 s (10 min). En présence de 0,5 équivalent de zinc, la déviation de la lumière par le variant H1A à 42°C augmente également mais dans une moindre mesure (Figure 4. 2 A). Par contre, la déviation de la lumière par le variant H4A en présence de 0,5 équivalent de zinc n'augmente pas (Figure 4. 2 B). Il semble donc que les variants H1A et H4A de ZraP subissent une dénaturation thermique à 42°C, et que la fixation du zinc les protège, complètement pour le variant H4A, et de façon partielle pour le variant H1A.

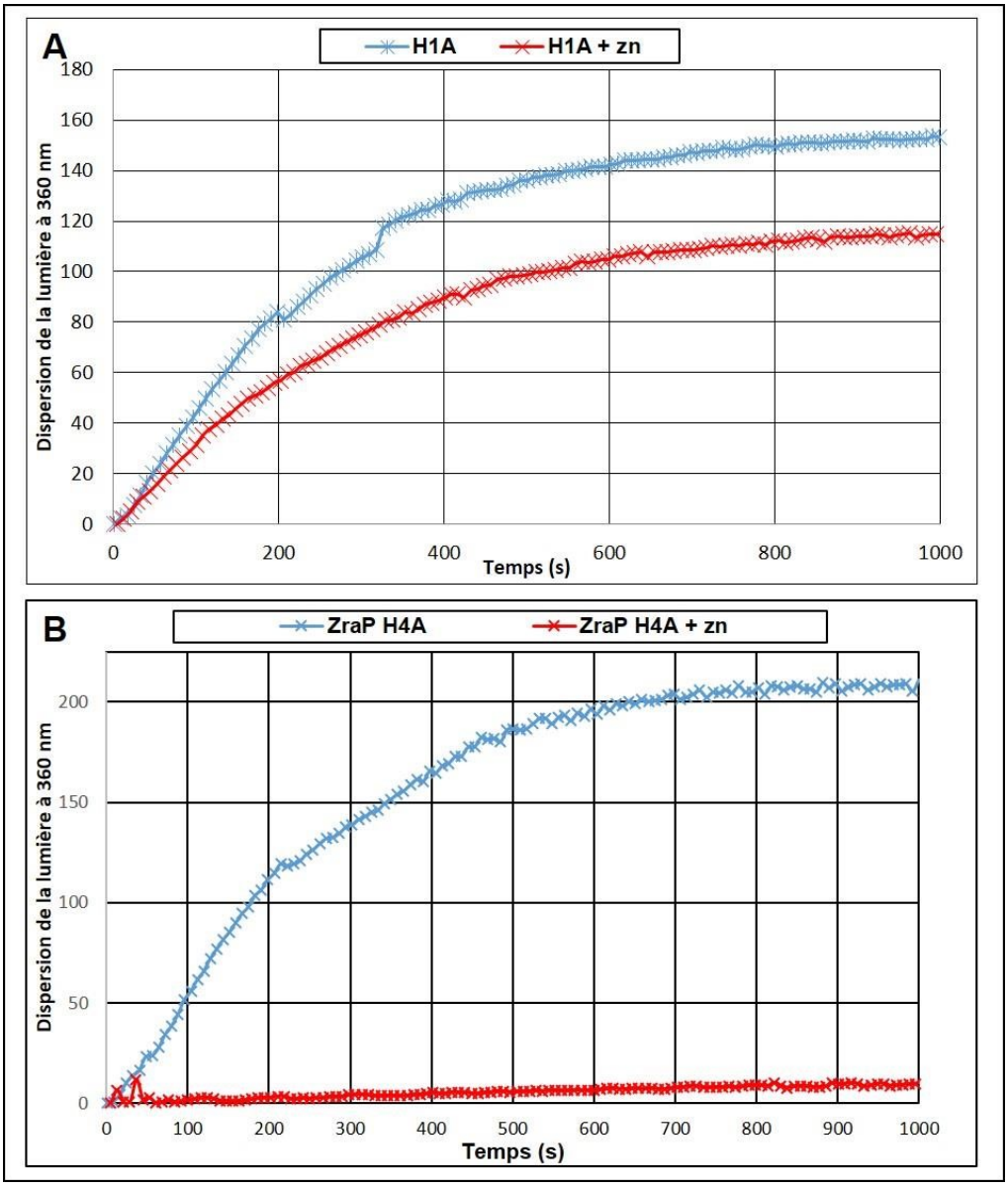


Figure 4. 2 : Stabilité thermique des variants H1A et H4A de ZraP.

12 µM de ZraP H1A (A) et ZraP H4A (B), traités ou non traités avec 0,5 équivalent de zinc, ont été incubés à 42°C. La déviation de la lumière à 360 nm de ces échantillons a été mesurée pendant 1000 s. Cette expérience a été réalisée en duplicat et les courbes présentées représentent une des mesures.

Nous avons ensuite testé l'activité chaperon des variants H1A et H4A sur la dénaturation thermique de la MDH. Comme dans le test précédent, 390 nM de MDH ont été incubé en présence ou en absence des variants H1A et H4A traités ou non-traités avec 0,5 équivalents de zinc. L'échantillon a ensuite subi un traitement thermique à 42°C. Les résultats montrent, comme attendu, une augmentation de la déviation de la lumière à 360 nm de l'échantillon contenant la MDH seule. Cette augmentation est accrue pour l'échantillon contenant la MDH

et le variant H1A (Figure 4. 3 A) alors que la dispersion de la lumière à 360 nm reste à des valeurs faibles autour de 10 unités arbitraires (UA) durant toute l'expérience si le variant H1A a été prétraité avec du zinc. Sur la Figure 4. 3 B, l'ajout du variant H4A, incubé ou non avec du zinc, cause une forte diminution de la dispersion de la lumière à 360 nm par rapport à la condition où il n'est pas présent. Cette diminution est légèrement moins forte pour la condition avec du zinc. Ces résultats montrent que le variant H1A, sans zinc se dénature à 42 °C et qu'il n'est pas capable de protéger la dénaturation thermique de la MDH. L'ajout du zinc semble diminuer la dénaturation thermique de ZraP H1A et permet ainsi de restaurer son activité chaperon. Le variant H4A n'est pas stable à 42°C mais la présence de zinc semble le stabiliser. Etonnamment, avec ou sans zinc, le variant H4A protège la MDH de la dénaturation thermique, cette activité étant même légèrement meilleure sans zinc. On peut donc supposer que même si le site de liaison préférentiel du zinc est le résidu H1, le variant H1A est capable de lier du zinc sur d'autres résidus, ce qui permet la stabilisation de la protéine, qui peut alors protéger la MDH de la dénaturation thermique. Le variant H4A possède le résidu H1 mais n'est pas stable à 42°C. La présence de ces deux histidines semble donc nécessaire à la stabilité de ZraP lors d'un traitement thermique. De plus, l'activité chaperon du variant H4A n'est pas favorisée par la liaison du zinc ce qui renforce l'idée que l'histidine 1 de ZraP aurait un rôle prépondérant dans la stabilisation par le zinc de la protéine.

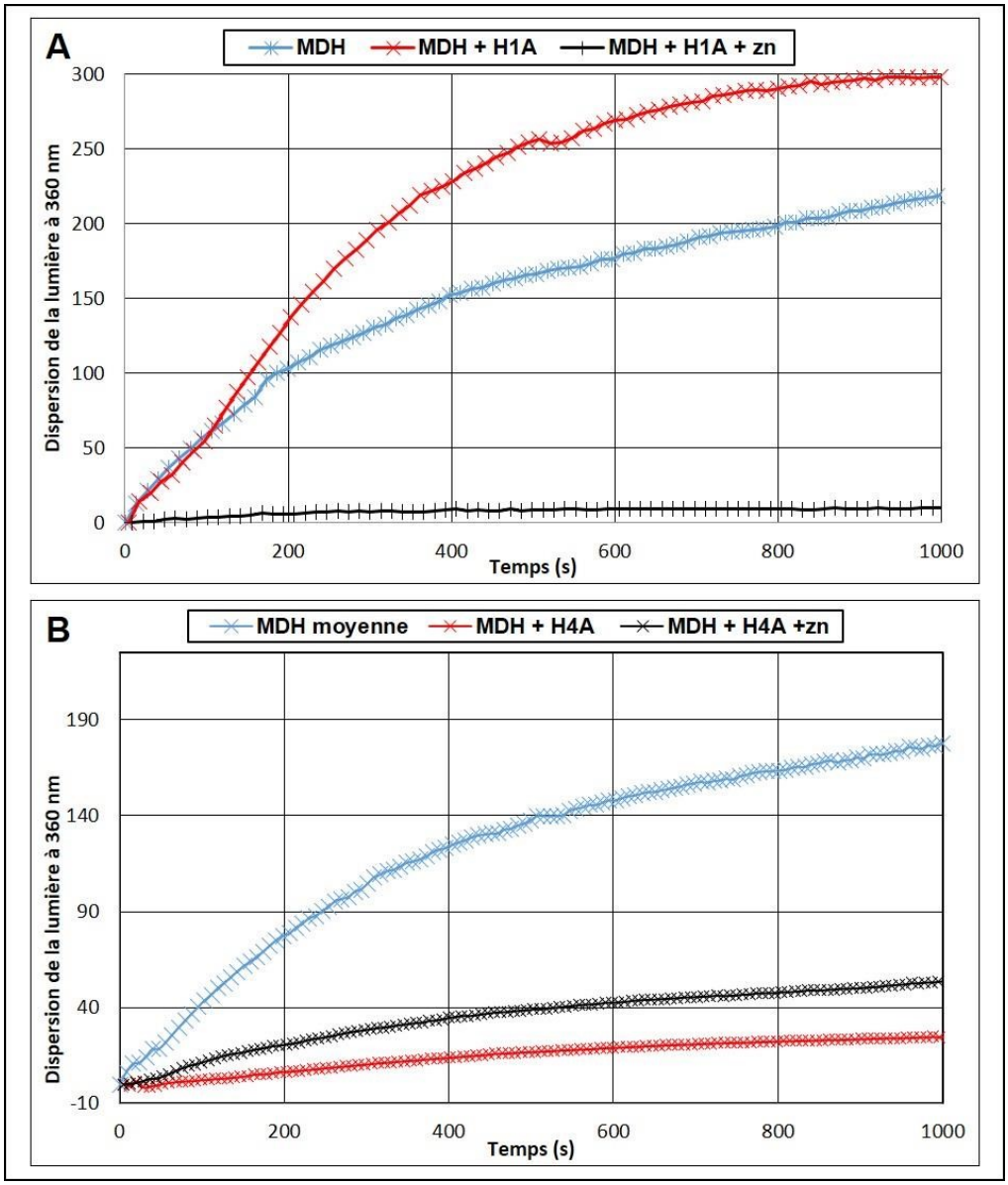


Figure 4. 3 : Mesure de l'activité chaperon des variants H1A et H4A de ZraP.

390 nM de MDH ont été incubés en présence ou en absence de 12 µM de ZraP H1A (A) ou ZraP H4A (B), traités ou non traités avec 0,5 équivalent de zinc. Les échantillons ont été incubés à 42°C et la déviation de la lumière à 360 nm a été mesurée pendant 1000 s. Cette expérience a été réalisée en duplicat.

2. Activité chaperon de ZraP, *in vivo*, suite à un stress d'enveloppe

Avant mon arrivée au laboratoire, une des hypothèses sur le rôle du système Zra stipulait que, par son activité de chaperon dans le périplasme, ZraP permettrait de rendre les bactéries moins sensibles aux stress affectant l'enveloppe bactérienne. Cette hypothèse a été appuyée par des expériences de survie avec des bactéries sauvages ou *ΔzraP* traitées à la

polymyxine B, un antibiotique qui cible la membrane bactérienne. Ces expériences ont montré que la souche qui n'expriment pas *zraP* ont un taux de survie plus faible que la souche sauvage, suite au traitement à la polymyxine B (Appia-Ayme *et al.*, 2012). Nous avons donc voulu tester cette hypothèse.

2.a. Détermination des conditions de stress d'enveloppe

Dans une première étape, j'ai mis au point les conditions expérimentales du test et déterminé les concentrations de polymyxine B à utiliser pour affecter la croissance bactérienne sans tuer toutes les bactéries et donc pouvoir quantifier les bactéries survivantes. Des cultures de *E. coli* W3110 (souche sauvage) et W3110*ΔzraR* (souche mutante *ΔzraR*) ont été inoculées, à partir d'une pré-culture lancée sur la nuit, puis cultivées à 200 rpm et 37°C jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm ($DO_{600\ nm}$) de 0,7. Les cultures ont ensuite été traitées ou non-traitées avec 2 µg/mL ou 4 µg/mL de polymyxine B.

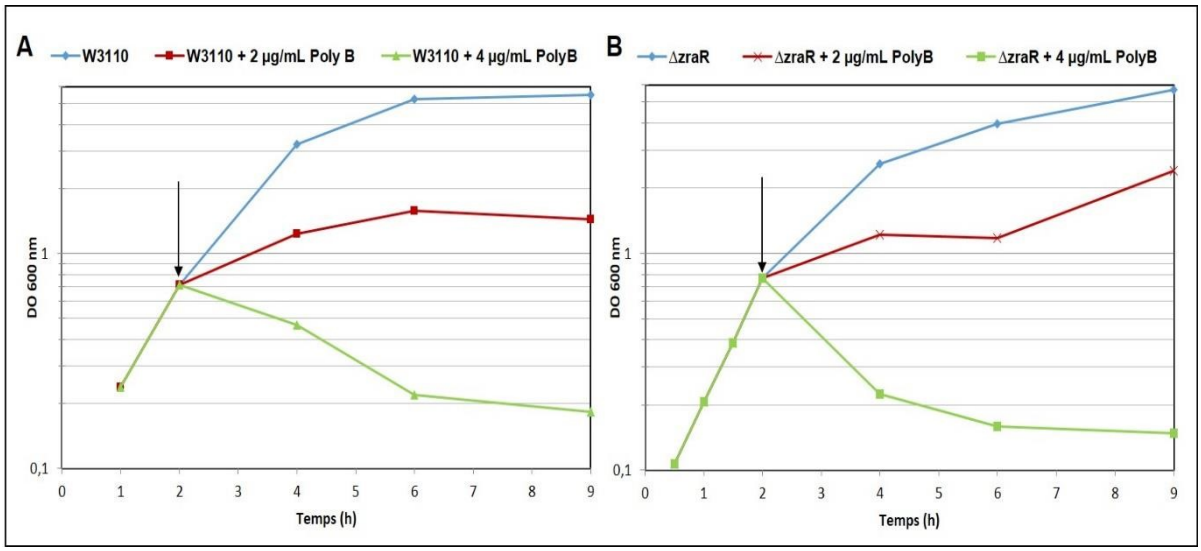


Figure 4. 4 : Suivi de la croissance bactérienne après ajout de deux concentrations de polymyxine B.

Des cultures de *E. coli* W3110 (A) et W3110*ΔzraR* (B) ont été cultivées jusqu'à une $DO_{600\ nm}$ de 0,7 avant traitement à la polymyxine B (représenté par la flèche noire). La $DO_{600\ nm}$ est ensuite mesurée toute les 2 h pendant 7h. Le terme Poly B désigne la polymyxine B.

Le suivi de la croissance après le stress antibiotique montre pour les souches sauvage et ΔzraR, qu'un traitement avec 4 µg/mL de polymyxine B cause une diminution de la $DO_{600\ nm}$

dès 2h après le traitement ce qui indique un effet bactéricide (Figure 4. 4). Lorsque ces souches sont traitées avec 2 µg/mL de polymyxine B, on voit un effet bactériostatique sur la croissance puisque la culture se stabilise à une $DO_{600\ nm}$ de 1,5. On en conclut que pour les expériences de stress d'enveloppe, il faudra traiter les bactéries avec 2 µg/mL de polymyxine B et mesurer la turbidité 2h et 4h après le stress. Par ailleurs, les résultats montrent qu'aux deux concentrations utilisées, la croissance de la souche *ΔzraR* est plus affectée par la polymyxine B que la souche sauvage.

2.b. Impact de la surexpression de ZraP lors d'un stress d'enveloppe

Dans le but de tester si ZraP, dans le périplasme protège la cellule du stress d'enveloppe grâce à son rôle de protéine chaperon, nous souhaitions induire uniquement l'expression de *zraP* dans le périplasme des bactéries avant de leur faire subir le stress d'enveloppe par la polymyxine B. Pour cela nous avons transformé les souches sauvages et *ΔzraR* avec un plasmide pBad18 (inductible à l'arabinose) dans lequel *zraP* a été cloné. Des cultures de *E.coli* W3110 sauvage et *ΔzraR* ont été cultivées dans du milieu LB à 37 °C en présence ou en absence d'arabinose. Lorsque les cultures ont atteint une $DO_{600\ nm}$ de 0,4, les bactéries ont été traitées ou non-traitées avec 2 µg/mL de polymyxine B puis remises en culture pendant 1h à 37°C. Les bactéries survivantes ont ensuite été comptées sur goutte, après dépôt sur boite et incubation sur la nuit à 37°C. L'induction de l'expression de ZraP par l'arabinose a été vérifiée par immunoblot anti-ZraP (Figure 4. 5 A). Les taux de survie de la souche sauvage et de la souche ΔzraR en présence et en absence de zinc ont été mesurés après induction de l'expression de *zraP*. Ces taux ont été rapportés aux même conditions mais sans induction. (Figure 4. 5 B). On peut voir que dans la souche sauvage et *ΔzraR*, la production de ZraP dans le périplasme ne conduit pas à une augmentation du taux de survie. Cela indique que la présence seule de ZraP, dans la souche *ΔzraR,* n'est pas suffisante pour protéger la cellule, même en présence de zinc et donc que ce n'est pas son rôle chaperon qui protège la cellule du stress d'enveloppe causé par le traitement antibiotique. L'expérience contrôle avec la souche sauvage et la production de ZraP conduit au même résultat qui est une absence de protection par ZraP en conditions noninductrices (sans zinc).

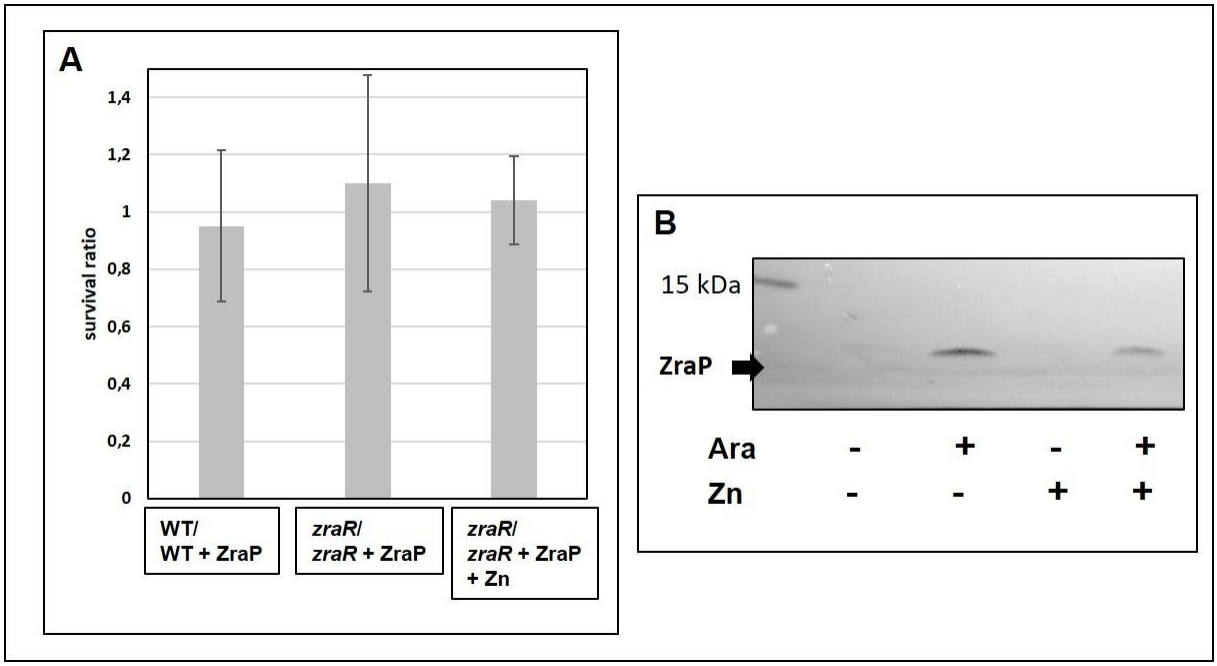


Figure 4. 5 : Mesure de l'influence de ZraP sur la survie des bactéries en présence de polymyxine B

Le rapport de survie des souches sauvage et *ΔzraR* ne produisant pas ZraP par rapport à celles qui produisent ZraP a été calculé suite au traitement a la polymyxine B. Ces valeurs reflètent trois expériences indépendantes (A). Les bactéries contenant le plasmide pBad18-zraP^{+}ont été cultivées en présence ou en absence de zinc ou d'arabinose puis ont été récoltées, la présence de ZraP a ensuite été révélée par immunoblot anti-ZraP (B).

2.c. Effet régulateur de ZraP sur l'activation du système Zra

Nous avons montré que l'activité chaperon de ZraP n'est pas impliquée dans la protection de la bactérie au stress d'enveloppe induit par la polymyxine B, ce qui implique que c'est son rôle inhibiteur du système Zra qui intervient. On peut donc se poser la question de l'intérêt pour la cellule d'inhiber l'activation du système.

Dans des expériences de stress d'enveloppe, nous avons mesuré l'effet du zinc et de la polymyxine B sur les souches sauvages et *ΔzraP*. Les souches sauvages et *ΔzraP* ont été cultivées en présence de 500 µM de zinc puis traitées avec la polymyxine B. Ces expériences montrent que la croissance de la souche *ΔzraP* est plus affectée par la polymyxine B combinée au zinc que la souche sauvage (Figure 4. 6). Cela suggère que l'absence de ZraP cause un défaut de croissance des bactéries en présence de zinc. La suractivation du système Zra serait donc délétère pour la croissance de *E. coli*.

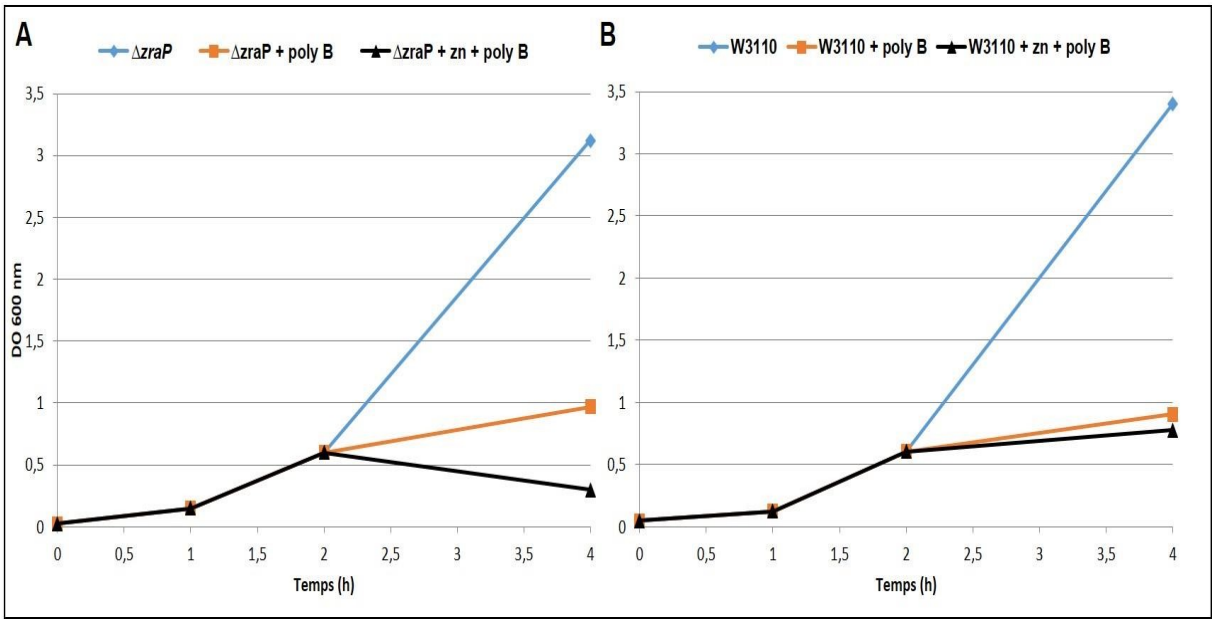


Figure 4. 6 : Effets du zinc et de la polymyxine B sur la croissance bactérienne.

Des cultures de *E. coli* W3110 (A) et W3110*ΔzraP* (B) ont été cultivées dans du LB en présence de 500 µM de $ZnSO_4$ jusqu'à une $DO_{600\ nm}$ de 0,55 avant traitement avec 2 µg/mL de polymyxine B (t=2h). La $DO_{600\ nm}$ est ensuite mesurée 2 h après le stress. Le terme Poly B désigne la polymyxine B.

Dans la littérature, il a été montré que l'activation constitutive de l'histidine kinase CpxA du système Cpx affecte la croissance de *E. coli* (Delhaye *et al.*, 2016). Ne disposant pas de souche présentant une activation constitutive de ZraS, nous avons choisi de la surproduire dans la souche *ΔzraP* et d'ajouter du zinc pour augmenter son activité. Dans ce but, la séquence codante de ZraS a été clonée dans un plasmide pBad18 dont l'induction est contrôlée par l'ajout d'arabinose. Une culture d'*E. coli* W3110*ΔzraP* transformée avec le pBad18 exprimant *zraS* a été cultivée à 37° C en absence ou en présence d'arabinose. À une $DO_{600\ nm}$ de 0,5, les cellules ont été exposées à 500 µM de zinc puis la croissance des cultures a été suivie jusqu'à 4h après l'ajout du zinc. Le pourcentage de croissance des différentes conditions de culture a été calculé par rapport à la croissance de la culture de *ΔzraP* cultivée en LB 2h et 4h après l'addition de zinc. L'activation du système Zra dans les conditions de surexpression de ZraS a été vérifiée en quantifiant la production de ZraR par immunoblot.

Sur la Figure 4. 7 A, on peut voir que ZraR est plus produite dans les cellules traitées par du sulfate de zinc et suite à l'induction de l'expression de *zraS* (par l'ajout d'arabinose) par rapport à la condition non-traitée. Les résultats montrent également que la surproduction de

ZraS ne modifie pas significativement la croissance de la souche Δ*zraP* (Figure 4. 7 B) et que la culture en présence d'une concentration sub-létale de zinc ralentit la croissance du mutant Δ*zraP*. En effet, on note une croissance diminuée de 20% et 25% 2h et 4h par l'ajout du zinc dans la culture dans cette souche. De manière intéressante la surproduction de ZraS associée à l'ajout de zinc diminue la croissance de la souche Δ*zraP* de 40% à 45%. Pour confirmer l'effet de la surproduction de ZraS sur la croissance du mutant Δ*zraP* par rapport au simple effet du zinc, les rapports de $DO_{600\ nm}$ des bactéries exposées au zinc et celles exposées au zinc et surproduisant ZraS ont été comparés (Figure 4. 7 C). On peut voir que des trois expériences menées, le pourcentage calculé à partir de la $DO_{600\ nm}$ calculé des bactéries qui ont subi l'effet du zinc est supérieur à celles qui ont subi l'effet du zinc et de la surexpression de *zraS*. On peut donc affirmer qu'en plus de l'effet inhibiteur de la croissance du zinc, la suractivation de ZraS, dans une souche *ΔzraP*, est néfaste pour la croissance bactérienne.

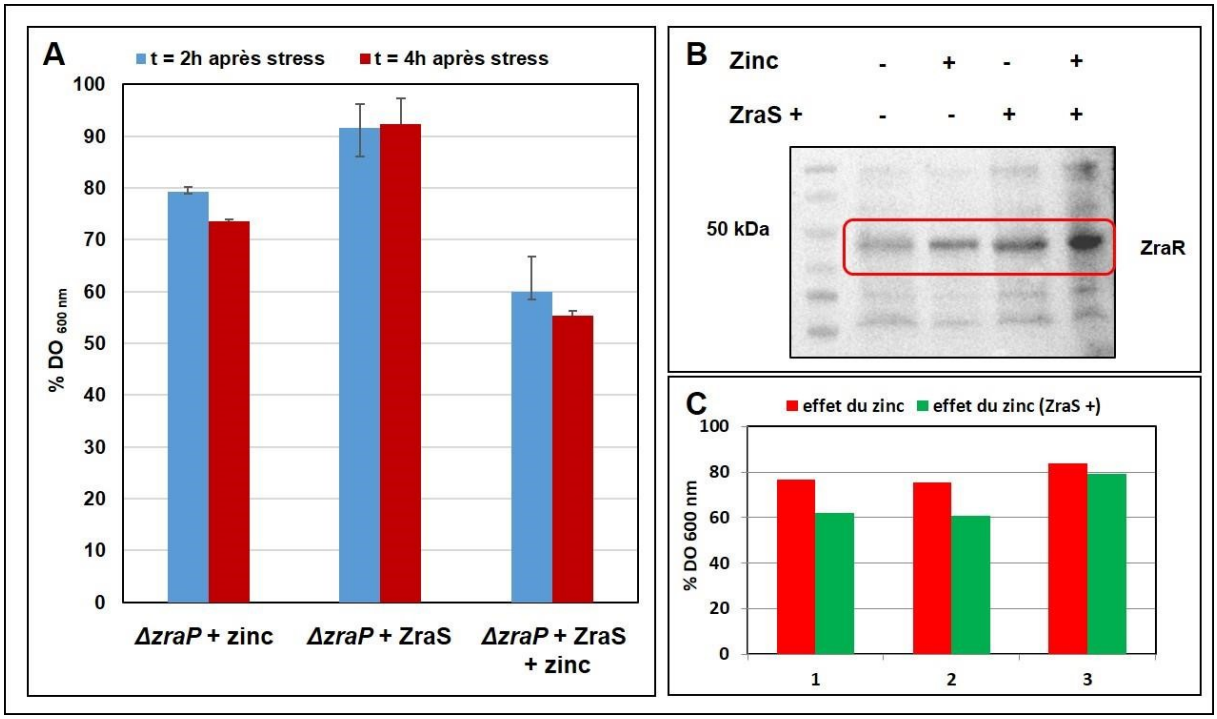


Figure 4. 7 : Impact de la surexpression de ZraS et de son activation par le zinc.

Une même densité bactérienne de *E. coli* Δ*zraP* cultivée en absence ou présence de 500 µM de zinc, de 0,02% d'arabinose ou de zinc et d'arabinose a été analysée par immunoblot anti-ZraR. Le rectangle rouge indique la bande de 50 kDa représentant ZraR (A). La croissance des bactéries Δ*zraP* cultivées en présence de zinc, surexprimant *zraS* ou cultivées en présence de zinc et surexprimant *zraS* après 2h et 4h ont été rapportées par rapport à une culture de Δ*zraP* cultivée en LB. Les résultats sont exprimés en % de croissance (B). Le suivi de la croissance 2h après le stress a été mesuré dans trois expériences indépendantes et la croissance 4h après le stress a été mesurée dans deux expériences indépendantes. Les valeurs de %DO $_{600\ nm}$ ont été comparées entre la condition où les bactéries sont seulement exposées au zinc ou exposées au zinc et surexprimant *zraS* 3h après le stress (C).

Essais de cristallisation de ZraSp et ZraP

Liste des figures de la partie :

Figure 5. 1 : Digestion de l'étiquette strep de ZraSp-strep au facteur Xa. 145

Figure 5. 2 : Suivi des conditions formant des précipités de ZraSp. 147

Figure 5. 3 : Chromatogrammes de la filtration sur Gel de ZraSp et du variant C167A. 148

Figure 5. 4 : Cristallisation de ZraP. 150

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués chez les protéines du système Zra, nous avons tenté de cristalliser les protéines ZraSp et ZraP pour obtenir leurs structures tridimensionnelles à haute résolution.

1. Cristallisation de ZraSp

1.a. Digestion de l'étiquette strep de ZraSp

Comme décrit dans la partie Purification de ZraSp, la protéine ZraSp a été purifiée avec une étiquette strep du côté N-terminal. Lors du clonage de *zraSp* dans le plasmide pASK-IBA7^{+}, une séquence codant pour le site de coupure spécifique de la protéase facteur Xa a été inséré entre l'étiquette strep et le gène de *ZraSp*. L'objectif étant de pouvoir éliminer cette étiquette qui pourrait gêner la cristallogenèse. La protéine ZraSp a été incubée 6h à température ambiante avec différentes concentrations de facteur Xa, puis les produits de digestion ont été déposés sur un gel SDS-PAGE (Figure 5. 1). Sur le gel, dans la condition sans ajout de facteur Xa, on voit une bande de 20 kDa correspondant à ZraSp avec l'étiquette. Le produit de digestion révèle deux bandes, dont une d'approximativement 30 kDa, représentative du facteur Xa.

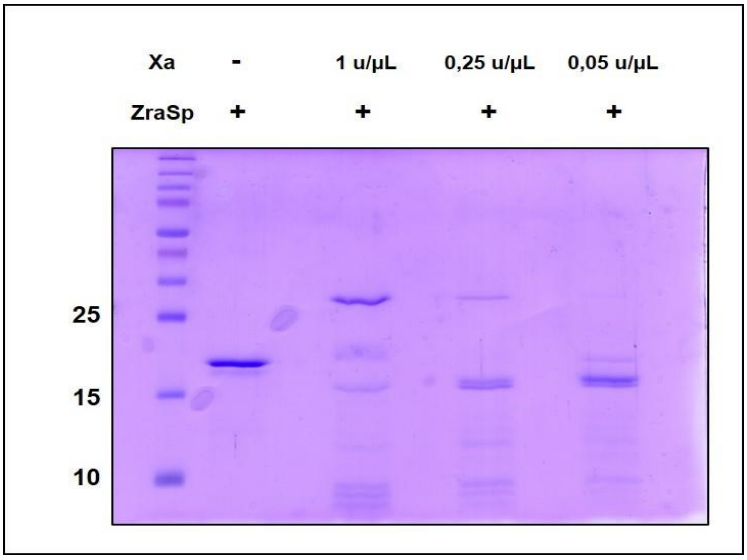


Figure 5. 1 : Suivi de la digestion de l'étiquette strep de ZraSp-strep au facteur Xa.

200 µg/mL de ZraSp-strep ont été incubés avec 1, 0,25 ou 0,05 u/µL de facteur Xa pendant 6h à température ambiante. Le contenu des échantillons a ensuite été séparé par SDS-PAGE. Le contrôle négatif contient seulement ZraSp. Xa est la dénomination utilisée pour le facteur Xa.

On observe que la digestion avec le facteur Xa cause l'apparition d'une bande de poids moléculaire inférieur à celle obtenue sans digestion, correspondant à ZraSp sans l'étiquette strep. Toutefois cela cause également de la protéolyse non spécifique, comme en atteste l'apparition de bandes de poids moléculaire inférieur à 10 kDa. L'incubation avec 0,05 unités par µL de facteur Xa permet de cliver l'étiquette strep sans trop causer de protéolyse cependant l'incubation de ZraSp à température ambiante pendant 6 h cause sa dénaturation et conduit à l'apparition de précipités. Pour conserver un échantillon protéique utilisable, le tampon de ZraSp a donc été complémenté avec 5% de glycérol et les expériences ont été réalisées sur glace et pendant le minimum de temps possible.

1.b. Criblage des conditions de cristallisation de ZraSp

La protéine ZraSp pure a été concentrée jusqu'à 6 mg/mL ou 12 mg/mL avant d'être apportée sur la plateforme HTX lab de l'EMBL Grenoble, afin de cribler, grâce à un robot, des conditions permettant la cristallisation de ZraSp. Nous avons sélectionné quatre cribles de 96 conditions chacun avec des gouttes de 100 nL, deux concentrations de protéines ont été déposées. Les quatre cribles choisis sont : (1) le Classic Suite qui contient les produits chimiques les plus utilisés pour la cristallisation de protéines, (2) le PEGs-I composé de solutions contenant des sels avec du polyéthylène glycol (PEG) de différents poids moléculaires, (3) le SaltGrid qui permet de cribler les différentes concentrations de sulfate d'ammonium, de malonate de sodium et de formate de sodium et (4) le Wizard I &II qui contient des mélanges aléatoires issus de matrices utilisées pour la cristallisation de macromolécules.

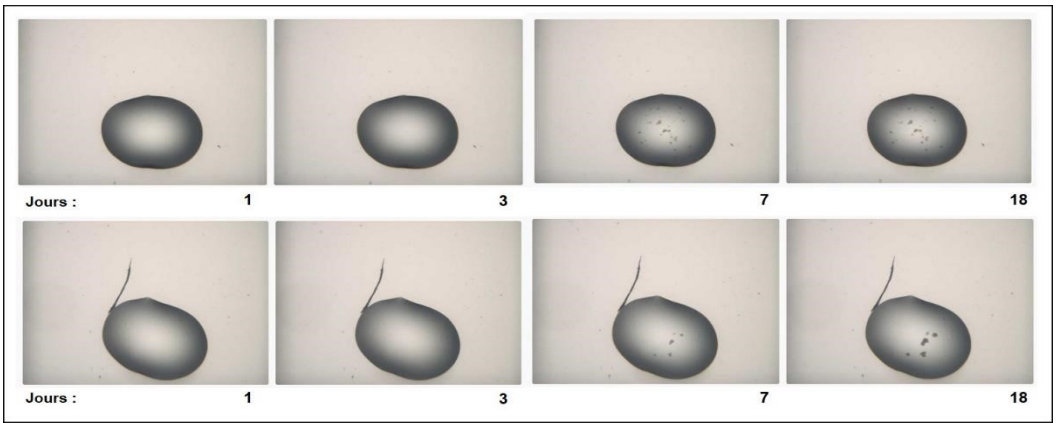


Figure 5. 2 : Suivi des conditions formant des précipités de ZraSp.

Suivi de la cristallisation de ZraSp dans les conditions du crible Morpheus. On note qu'il y a de la nucléation dans certaines conditions entre 3 et 7 jours.

Nos essais de cristallisation n'ont pas permis d'obtenir des cristaux isolés et utilisables pour de la diffraction aux rayons X. Toutefois, nous avons pu obtenir des informations intéressantes qui permettront peut-être de cristalliser plus tard cette protéine.

À 12 mg/mL la protéine se dénature beaucoup lors du dépôt des gouttes dans les puits, comme le montre la présence de gros précipités bruns filandreux dès les premières images prises par le robot (données non montrées). Nous avons donc choisi pour la suite de travailler avec une protéine concentrée à 6 mg/mL. Lors du suivi des plaques de cristallisation, nous avons pu observer un certain nombre de conditions pour lesquelles des petits précipités se formaient au bout de 7 jours (Figure 5. 2) puis se concentraient après une vingtaine de jours. Ces précipités ne sont jamais devenus des cristaux mais ils donnent des pistes de cristallisation intéressantes. On peut ainsi en conclure que ZraSp forme ces précipités avec différents tampons tels que le Tris à pH 7 à 8,5, le MES à pH 6,5, le KH_2PO_4 à pH 8,2 et le tampon Hepes à pH 7,5. Des concentrations de 0.1 à 0,2 M de NaCl semblent être favorables à la formation de ces précipités. L'analyse du crible *PEGs-I* indique que pour la cristallisation de la protéine, il faudrait plutôt utiliser du PEG 3350 à 20% ou alors du PEG 8000 entre 10% et 20%. Enfin, l'ajout, en additif, de $MgCl_2$, $MgSO_4$ ou $Mg(HCO_2)_2$ à 0,2 M semble favoriser l'apparition de précipités intéressants.

Pour les essais de cristallisation suivants, nous avons souhaité tester des échantillons protéiques

plus homogènes et moins concentrés. Nous avons observé que, lors de l'étape de chromatographie d'exclusion sur colonne SDX75® (voir Résultats : Figure 2. 1), le pic d'élution du variant C167A était plus homogène que dans le cas de ZraSp native (Figure 5. 3). En effet, lors de la purification, le pic qui contient la forme oligomérique est plus petit avec le variant C167A qu'avec ZraSp natif. De plus, l'étude de la stabilité thermique de ZraSp (voir la partie Détermination de l'état oligomérique de ZraSp) ont montré que le variant C167A est plus résistant à la dénaturation thermique que ZraSp. De plus, nous avons décidé de tester, avec le robot de cristallisation, ZraSp native et le variant C167A métalés par du zinc, à une concentration de 6 mg/mL.

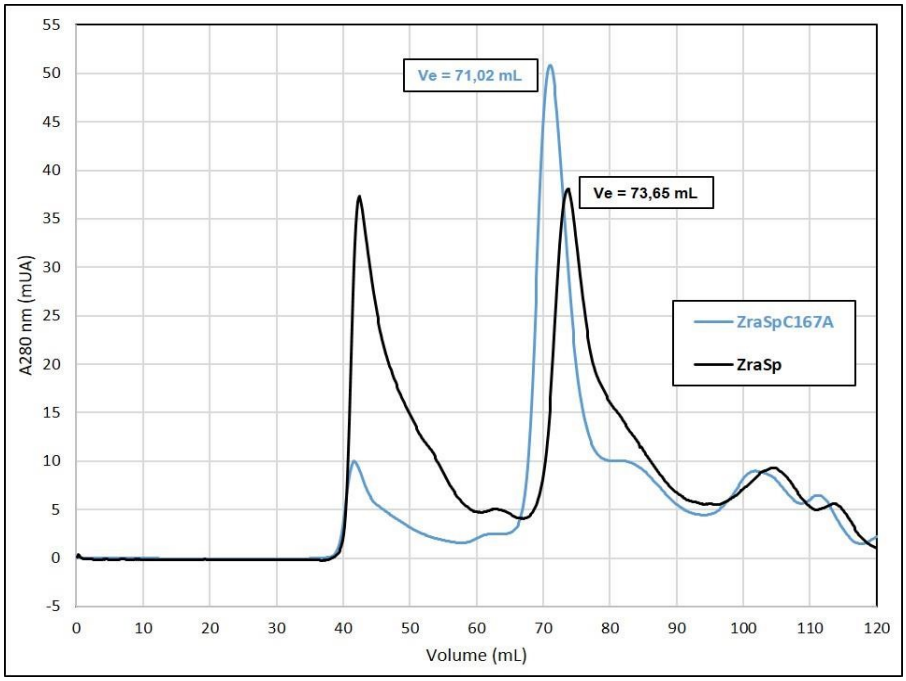


Figure 5. 3 : Chromatogrammes de la filtration sur Gel de ZraSp et du variant C167A.

Les protéines ont été injectées sur colonne SDX75 de 120 mL. Le volume d'élution des protéines sont semblables montrant qu'elles ont le même état oligomérique.

Le suivi des plaques de cristallisation de ZraSp lié au zinc n'a pas permis de trouver d'autres conditions de cristallisation. De plus, dans les conditions intéressantes identifiées avec ZraSp sans zinc, les échantillons de ZraSp liés au zinc ont précipité. Il est possible que la présence de magnésium favorise l'agglomération de ZraSp, permettant peut-être de former des cristaux.

En conclusion, nous n'avons pas réussi à cristalliser ZraSp mais nous avons des conditions intéressantes qui, si elles sont reproduites manuellement et légèrement modifiées pourraient permettre d'obtenir des cristaux.

2. Cristallisation de ZraP

La structure de ZraP issue de *Salmonella enterica* a été résolue par un consortium de génomique structurale (voir Introduction : Figure I. 23), mais aucune publication n'a été associée à cette protéine. La structure montre une architecture uniquement composée d'hélices α arrangées en pentamère de dimères.

Chaque protomère est formé de deux hélices α repliées en épingle à cheveux. L'analyse des surfaces d'interaction par le logiciel en ligne PISA montre que cet arrangement est très

probablement dû à la cristallisation et que le dimère serait l'unité physiologique. La structure ne présente que deux hélices α car les quarante-deux acides aminés en N-ter et les dix-sept résidus en C-ter forment des boucles désordonnées. Avant mon arrivée, le criblage des conditions de cristallisation au robot, pour le ZraP de *E. coli*, avait été effectué et des cristaux avaient été obtenus (Figure 5. 4 A). Il était alors nécessaire d'incuber ZraP avec du zinc ou du cuivre et la condition de cristallisation était composée de NiCl dans du tampon Tris et du PEG 6000 comme agent précipitant. Malgré plusieurs essais, ces cristaux n'ont pas diffracté les rayons X, rendant la résolution de la structure impossible. Nous avons donc réessayé de cristalliser ZraP mais cette fois avec un nouveau crible de conditions de cristallisation. Le crible choisi, le Morpheus, couvre une large gamme de précipitants, de pH, de sels, d'additifs et inclus 49 ligands de faible poids moléculaire. Le but étant de mettre en évidence de nouvelles conditions de cristallisation non trouvées auparavant. Nous continuons actuellement de suivre l'éventuelle apparition de cristaux.

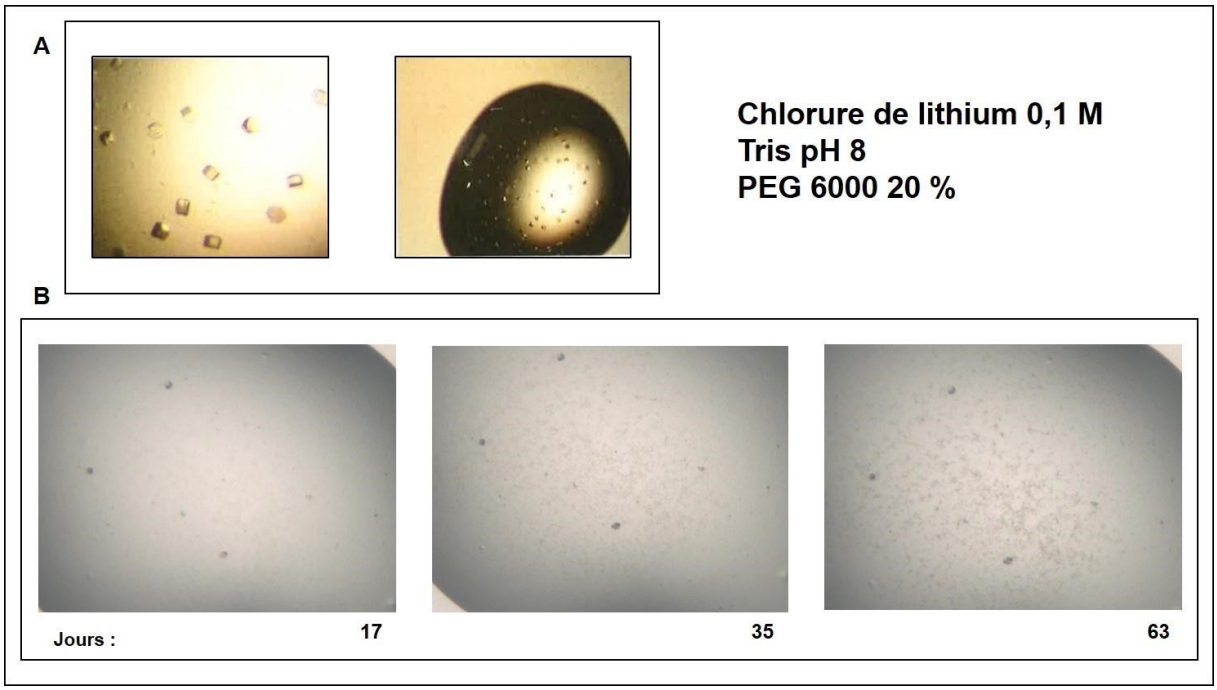


Figure 5. 4 : Cristallisation de ZraP.

Cristaux de ZraP en présence de cuivre obtenus en 2014 dans les conditions décrites (A). Suivi de la cristallisation de ZraP dans les conditions du crible Morpheus. On note qu'il y a de la nucléation dans certaines conditions entre 17 et 35 jours (B).

DISCUSSION

Liste des figures de la discussion :

Figure D 1 : Comparaison des structures cristallographiques de VpCpxAp et PhoQ. ..... 154 Figure D 2 : Hypothèse de la modification des hélices α de ZraSp suite à la liaison du zinc ou

des substitutions des histidines en alanine. 157

Figure D 3 : Comparaison des séquences de ZraSp issues de quatre différentes

enterobacteriaceae. 158

Figure D 4 : Schéma de régulation de l'activation du système Zra par le zinc dans la souche

sauvage et la souche ΔzraP. 160

Figure D 5 : Schéma explicatif de l'effet de la liaison différentielle du zinc sur ZraP. 162

Figure D 6 : Distribution de ZraP au sein des ϒ-protéobactéries. 165

Figure D 7 : Effets de la suractivation de ZraS sur la fitness des bactéries. 166

Figure D 8 : Proposition de mécanisme d'activation de la voie Zra par le zinc. 169

Cela fait maintenant plus de trente ans que les premières études sur les systèmes à deux composants de *E. coli* ont été publiées (Nixon *et al.*, 1986) et depuis, une trentaine de nouveaux systèmes ont été identifiés dans cette souche (Tiwari *et al.*, 2017). Beaucoup de ces *twocomponent system* (TCS) fonctionnent de manière synergique, il est donc très difficile de déterminer le rôle isolé d'un de ces systèmes. Le système Zra n'a pas été extensivement étudié même si les travaux publiés depuis 1998 ont permis d'avoir une vision globale de son fonctionnement. En particulier, il existe très peu d'informations sur l'activation du système par le domaine périplasmique de ZraS, cet aspect à fait l'objet de mes travaux de thèse avec pour objectif une meilleure compréhension du système Zra.

1. Etude structurale de la boucle périplasmique de ZraS

1.a. Etat oligomérique de ZraS

Il est communément accepté que le dimère est l'unité fonctionnelle des histidines kinases des systèmes à deux-composants. Toutefois les tentatives de purification des domaines périplasmiques de différentes histidines kinases pour des études biochimiques telles que NarX,

DcuS, DctB et CitA n'ont pu mener qu'à l'obtention de formes monomériques. Par contre la résolution des structures de ces protéines par cristallographie aux rayons X montre des structures dimériques stabilisées par des liaisons hydrogènes (Cheung & Hendrickson, 2009). La seule exception est la protéine PhoQ pour laquelle le dimère est stabilisé par un pont-salin entre les résidus R50 et D179 stabilisant la structure dimérique (Figure D 1 A). L'implication de ces résidus dans la dimérisation de PhoQ a été confirmée par mutagénèse dirigée (Cheung *et al.*, 2008). La structure cristallographique du domaine périplasmique de CpxA de *Vibrio parahemolyticus* (VpCpxAp) montre aussi une organisation dimérique mais les extrémités N et

C-terminal étant dirigées l'une vers l'autre, on peut difficilement imaginer que cette organisation permette un ancrage à la membrane interne (Figure D 1 B). Il est fort possible que cette dimérisation soit un artéfact dû à la cristallisation de la protéine (Kwon *et al.*, 2012). La purification et l'analyse de l'oligomérisation du domaine périplasmique de ZraS (ZraSp) par des expériences de SEC-MALS, nous ont montré que ZraSp aussi, en solution, est monomérique (voir Résultats partie : Détermination de l'état oligomérique de ZraSp).

Cependant, les données que nous avons obtenues semblent indiquer que, dans le contexte membranaire, cette protéine est au moins dimérique.

De plus, lors des expériences contrôles d'interaction *in vitro* (Figure 3. 4), le traitement de ZraSp seul avec du formaldéhyde avait conduit à la formation de complexes de taille compatible avec celle d'un dimère. Ces résultats indiquent que ZraSp peut s'arranger en dimères *in vitro*, probablement par intervention d'interactions faibles au niveau des domaines périplasmiques mais que ces dimères sont peu stables. Ainsi, la dimérisation pourrait de la protéine entière pourrait provenir, en grande majorité, des domaines transmembranaires ou cytoplasmiques.

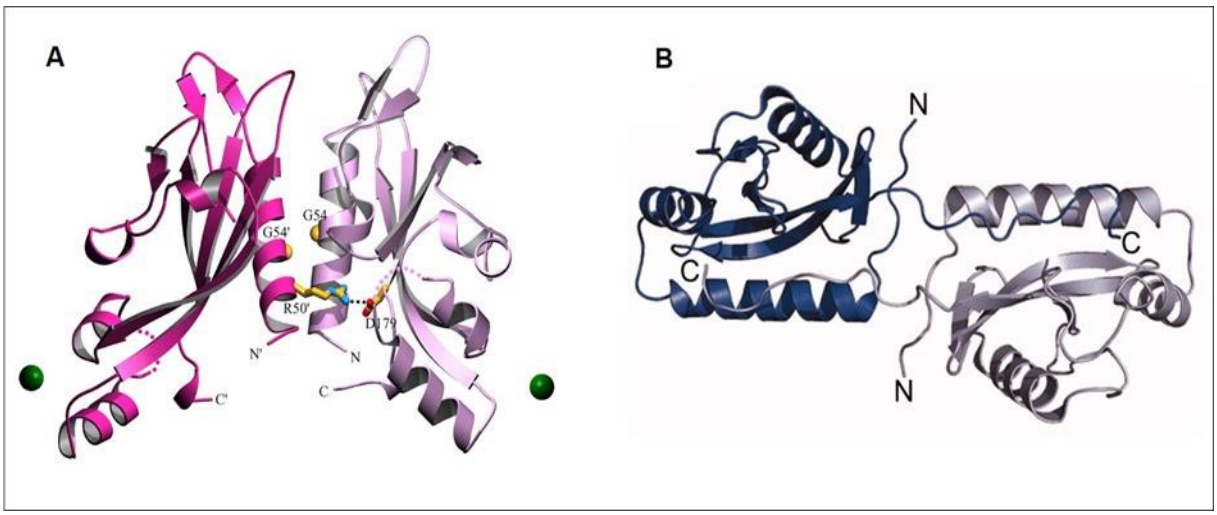


Figure D 1 : Comparaison des structures cristallographiques de VpCpxAp et PhoQ.

Les structures de PhoQ (PDB :3BQ8, A) et VpCpxA (PDB :3V67, B) montrent une organisation dimérique mais les domaines N et C-terminal d'un protomère de VpCpxAp sont dirigés vers l'autre protomère ce qui rend la fixation à la membrane impossible. Dans le cas de PhoQ les domaines N et C-terminal sont positionnés de manière optimale pour lier un domaine transmembranaire.

1.b. Repliement de ZraSp

Étant donné que nous n'avons pas travaillé avec la protéine entière mais seulement avec le domaine périplasmique de ZraS, il y avait un risque que la protéine n'adopte pas un repliement « physiologique ». La prédiction de structures secondaires par le logiciel en ligne *Jpred* (Cuff *et al.*, 1998) à partir de la séquence en acides aminés montre que le domaine périplasmique (ZraSp) adopte un repliement typique des senseurs appelés PhoQ, DcuS et CitA (PDC). Selon *Jpred*, ZraSp est composé de cinq brins β entourés en N-terminal et C-terminal par trois hélices α. Les acides aminés impliqués dans des hélices α et des brins β représentent

respectivement 31,3% et 19,7 % de la protéine. L'hélice α en N-ter est longue de trente acides aminés et représente 18% de la protéine et les deux autres hélices α de onze acides aminés représentant chacun 6,5% de la protéine. Lorsque nous avons analysé ZraSp par dichroïsme circulaire, nous avons utilisé un programme de déconvolution pour déterminer le pourcentage des structures secondaires composant la protéine. Les résultats obtenus suggèrent que ZraSp est en majorité hélicoïdale et la détermination du repliement donne les mêmes résultats que la prédiction de structure par *Jpred* (Résultats partie : Etude du repliement de ZraSp et des variants). Ce résultat est aussi compatible avec le fait que ZraSp adopte un repliement typique des domaines senseurs d'histidine kinase. Nous avons ensuite voulu évaluer la stabilité de ZraSp en mesurant la température de demi dénaturation (Tm). Les résultats nous montrent que le domaine périplasmique de ZraSp n'est pas très stable puisque son Tm est seulement de 36°C (Résultats partie : Stabilité thermique de ZraSp et des variants). Ces résultats confirment que, malgré le fait que ZraSp ait un repliement correcte *in vitro*, purifier un domaine périplasmique sans la partie transmembranaire d'une histidine kinase est compliqué puisqu'il faut travailler avec une protéine qui est peu stable.

2. Fixation du zinc

L'étude de la transcription des gènes *zraS* et *zraP* en présence de zinc a montré que même absence de ZraP, le système Zra est activé (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Cela suggère que ZraS peut être activé directement par le zinc et donc qu'elle est capable de lier l'ion métallique. La caractérisation de ZraSp nous montre que la protéine est monomérique *in vitro* mais son repliement serait compatible avec un repliement de type PDC (Figure D 2 au centre). Nous avons donc tenté de vérifier que le zinc pouvait effectivement lier ZraSp. Les expériences de rétention sur colonne métallique (IMAC) chargée en zinc ont démontré que ZraSp était capable de lier le zinc. Ce résultat a aussi été confirmé par le dosage de la quantité de zinc fixée par

ZraSp à l'aide du 4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR). L'analyse de la structure secondaire de ZraSp par dichroïsme circulaire suggère que la protéine est composée approximativement de 31% d'hélices α, 14% de brins β et 39% de boucles non-ordonnées. L'ajout de zinc modifie le spectre de dichroïsme circulaire de ZraSp faisant diminuer l'ellipticité. L'analyse de ces spectres montre que la liaison du zinc cause une diminution de 9% du pourcentage d'hélices α alors que le pourcentage de boucles non-ordonnées augmente du même pourcentage. Cela

suggère que la liaison du zinc modifie la conformation de ZraSp. Sachant que le programme *jpred* prédit que ZraSp contient trois hélices α de respectivement trente, onze et onze acides aminés, on peut remarquer que la désorganisation d'une des hélices α de onze acides aminés ferait diminuer de 9% le pourcentage d'hélices α (Figure D 2, à gauche). Un changement de conformation de ce domaine suite à la liaison du zinc est cohérent avec un mécanisme de transduction du signal entre la partie périplasmique et cytoplasmique et corrobore l'hypothèse que ZraS serait activé directement par le zinc.

La compréhension du mécanisme d'activation passe par l'identification des résidus ligands du zinc de ZraSp. Des expériences dosage de zinc lié aux protéines ont été réalisées avec des variants ponctuels et ont mis en avant l'implication des résidus H73, H159, H162 et C167. Dans les métalloprotéines dont les structures ont été résolues par cristallographie, les résidus cystéine et histidine, et dans une moindre mesure les aspartates et glutamates, sont les ligands préférentiels du zinc (Laitaoja *et al.*, 2013). De même, pour les métalloprotéines à zinc, la coordination du métal se fait souvent par quatre résidus en plan carré (cas de Zur, Gilston *et al.*,
2014). Toutefois, lors de mes recherches bibliographiques, je n'ai jamais vu de zinc coordonné par trois histidines et une cystéine. Ces résultats sont pourtant soutenus par les résultats des tests de rétention sur IMAC chargée en zinc. Il est donc possible que nous ayons confondu les ligands du zinc de ZraSp avec des histidines impliquées dans la structuration de la protéine. Il est aussi possible que ces résidus fassent partie de la seconde enveloppe de ligand qui stabilisent le positionnement des acides aminés qui participent directement à la coordination du zinc (Dudev *et al.*, 2003).

Dans le but de tester si l'influence de la substitution des histidines en alanines sur la conformation globale de la protéine, des expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées avec les variants H73A, H74A, H159A et H162A. Les résultats ont montré que les spectres de dichroïsme circulaire des variants sous forme apo étaient différents de la forme native.

L'analyse des structures secondaires montrent que la substitution H73A est la seule qui donne un variant avec une organisation de structures secondaires semblable à ZraSp. La métallation du variant H73A cause une diminution de l'ellipticité mesurée par dichroïsme circulaire qui se traduit aussi par une diminution de 13% du pourcentage d'hélices α, ce qui est proche de ce qui a été trouvé avec ZraSp.

Le variant H159A sous forme apo ne contenant plus que 18,8% d'hélices α (contre 31 % pour ZraSp) et 21% de brins β (contre 13% pour ZraSp), ceci pourrait être la conséquence du

réarrangement des deux hélices α de onze acides aminés en boucles non-ordonnées ou en brins β provoqué par la mutation (Figure D 2, à droite). De manière semblable, les simples substitutions des histidines 74 et 162 par des alanines ont pour effet de diminuer de presque 10% le pourcentage d'hélices α qui pourrait être lié la désorganisation d'une des hélices α de onze acides aminés. Il est donc impossible, avec ces données, de déterminer si les histidines 159 et 162 sont impliquées dans la coordination du zinc et/ou dans la structuration du site de liaison du zinc.

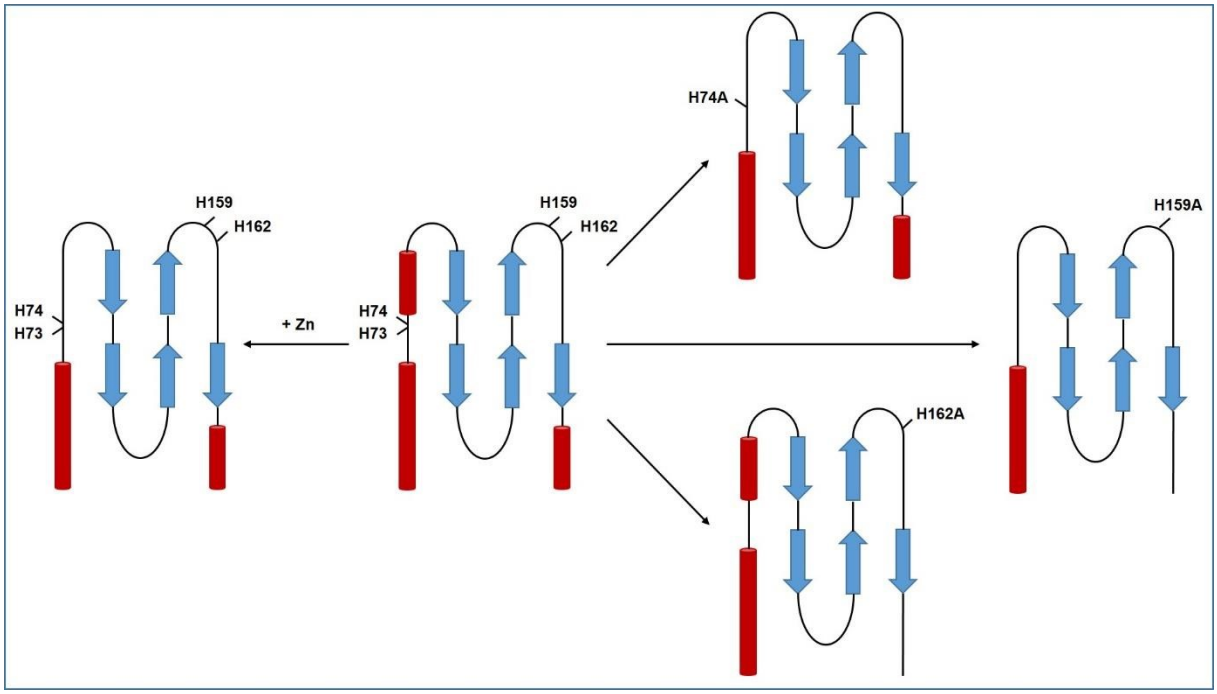


Figure D 2 : Hypothèse de la modification des hélices α de ZraSp suite à la liaison du zinc ou des substitutions des histidines en alanine.

Représentation schématique du domaine PDC de ZraSp avant et après liaison du zinc (gauche) ou suite à la substitution des histidines 74, 159 et 162. Les hélices α sont représentées par des cylindres rouges et les brins β par des flèches bleues. Seule la modification du pourcentage d'hélices α est représentée.

Nous avons aussi été surpris de remarquer que ces variants après métallation donnent des spectres avec des ellipticités très semblables, alors que les données de dosage du zinc lié avaient montré qu'ils fixaient le zinc avec des ratios différents. Il aurait été logique que la substitution des histidines responsables de la liaison du zinc modifie aussi le repliement des variants de ZraSp en présence de zinc par rapport à la forme sauvage. Il est à noter que même si leur capacité de liaison du zinc est affectée, chaque variant lie au moins 0,3 moles zinc par mol de protéine. Le cas le plus surprenant est celui du variant H74A dont la métallation ne

modifie pas l'ellipticité alors que ce variant lie autant de zinc que ZraSp. En effet, la mesure d'ellipticité est identique entre la protéine liée ou non liée au zinc (Figure D 1, à droite). Cela suggère que la substitution de l'histidine 74 conduit à une forme proche de la forme active de la protéine native. Ce changement est différent des déstructurations d'hélices α causées par la métallation de ZraSp native. On peut émettre l'hypothèse que l'histidine 74 n'est pas impliquée dans la coordination du zinc mais dans la seule structuration de ZraSp. Ceci expliquerait pourquoi la capacité de liaison du zinc du variant H74A est semblable à la protéine native.

Les histidines 73, 159 et 162 sont des résidus conservés dans les séquences des domaines périplasmiques de ZraS au sein des *enterobacteriaceae* pathogènes ou commensales (Figure D 3). Nos résultats confirment leur importance pour la métallation de ZraS que ce soit en liant le zinc ou en structurant ce domaine périplasmique. Collectivement, toutes ces données suggèrent que les histidines 73, 159 et 162 conservées sont importantes pour le changement de conformation dû à la liaison de ZraSp au zinc.

```
sp|P14377|ZRAS_ECOLI              RDYGRASEADRQALLEKGNVLIRALESGSRVGMGMRMHHVQQQALLEEMAGQPGVLWFAV  60
sp|Q9APE0|ZRAS_KLEOX              RDYGRENEAARQTIQEKGSVLIRALESGTRVGMGMRMHHSQLQTLLEEMAWQPGVLWFAV  60
tr|A0A0H9BKT7|A0A0H9BKT7_SHISO    RDYGRETAAARQTLLEKGSVLIRALESGSRVGMGMRMHHAQQQALLEEMAGQPGVRWFAV  60
sp|P37461|ZRAS_SALTY              RDYGRESAAARQTLLEKGNVLIRALESGTRVGMGMRMHHAQQQTLLEEMAGQPGVLWFAV  60
                                  ***** . * **:: ***.*********:********** * *:****** **** ****

sp|P14377|ZRAS_ECOLI              TDAQGIIILHSDPDKVGRALYSPDEMQKLKPEENSRWRLLGKT---ETTPALEVYRLFQP  117
sp|Q9APE0|ZRAS_KLEOX              TDENGKIIAHSDPRRVGESLYPASTLRELNIGSEERWRRLEQ-----PEPALEIYRQFRP  115
tr|A0A0H9BKT7|A0A0H9BKT7_SHISO    TDEQGTIVMHSNSGMVGKQLYSPQEMQQLHPGDEEAWRRIDSAD---GEPVLEIYRQFQP  117
sp|P37461|ZRAS_SALTY              TDAQGVIITHSNPGMVGKSLYSPSEMHQLNPGPQERWRRVDVAANGETVPALEIYRQFQP  120
                                  ** :* *: **:   **. **  . :::*:   :. ** :         *.**:** *:*

sp|P14377|ZRAS_ECOLI              MSAPWRHGMHNMPRCNGKAVPQVDAQQAIFIAVDASDLVATQSGEKRNTL---         167
sp|Q9APE0|ZRAS_KLEOX              LNGG-GHHMRMMMRRESA-DLRNQAPQVIFIAFDTRELDADHARGLRNMV---         163
tr|A0A0H9BKT7|A0A0H9BKT7_SHISO    MFAAGMHRMRHM-------QQYAATPQAIFIAFDASNIVSAEDREQRNTLIIL         163
sp|P37461|ZRAS_SALTY              LFGMRGHGMRGHGMARSA-NDDEPAKQTIFIAFDASELAATQAREWRNT----         168
                                  : .   * *:              : *.****.*: :: : .    **
```

Figure D 3 : Comparaison des séquences de ZraSp issues de quatre différentes enterobacteriaceae.

Alignement des séquences d'acides aminés de ZraSp de *E. coli* (noté ECOLI), *Klebsiella oxytoca* (noté KLEOX), *Shigella sonnei* (noté SHISO) et *Salmonella enterica* (noté SALTY). Les résidus colorés en vert sont les histidines qui n'ont pas été montrées comme impliquées dans la liaison du zinc par nos expériences. Et, les résidus colorés en rouge sont les histidines identifiées comme impliquées dans la liaison du zinc par des tests de métallation.

On retrouve un cas semblable avec la protéine SilE qui intervient dans la résistance à l'argent chez *Salmonella enterica*. Cette protéine contient neuf histidines, dont certaines qui sont impliquées dans la liaison de l'argent mais la quantité de métal lié ne coïncide pas forcément

avec une perte d'ellipticité au dichroïsme circulaire (Asiani *et al.*, 2016). Pour certaines métalloprotéines dont la conformation change en fonction de la liaison du métal, avoir accès à la structure tridimensionnelles, par exemple par cristallographie aux rayons X, serait un moyen plus approprié de déterminer les résidus impliqués dans la coordination du métal. Cependant les tentatives de cristallisation que nous avons entreprises avec ZraSp n'ont pas abouti.

3. Mécanisme d'activation du système Zra par le zinc

3.a. Interactions entre ZraP et ZraS

Le but principal de ma thèse était de mieux comprendre le mécanisme d'activation du système Zra en présence de zinc. Nous nous sommes intéressés à l'interaction entre la protéine périplasmique ZraP et le domaine périplasmique de l'histidine/kinase ZraS. La régulation périplasmique des histidine/kinase a beaucoup été étudiée chez les autres systèmes de réponse au stress d'enveloppe. Par exemple, l'activation du système Rcs, à travers l'activation de l'histidine kinase RcsC, par la protéine de la membrane externe RcsF a été mise en évidence depuis peu (Sato *et al.*, 2017). Dans cette étude, les auteurs ont montré que RcsF pouvait interagir avec le domaine périplasmique de RcsC exporté dans le périplasme. De même l'interaction physique entre la protéine du périplasme CpxP et le senseur membranaire CpxA *in vivo* a aussi été démontrée (Tschauner *et al.*, 2014). Pourtant, une tentative de prouver l'interaction entre le domaine périplasmique de CpxA issu de *Vibrio paraheamolyticus* et CpxP par résonnance magnétique nucléaire a échoué (Kwon *et al.*, 2012). Il y a probablement deux raisons possibles à ce résultat. Tout d'abord, l'absence des domaines transmembranaires de
CpxA a pu empêcher la formation d'un site de fixation pour CpxP. De plus, l'interaction entre CpxP et CpxA étant très dynamique, la faible stabilité du complexe n'a pas permis sa détection *in vitro* car il était trop minoritaire. Une manière élégante de prouver l'existence de ce complexe a été de figer l'interaction *in situ* dans le périplasme par pontage covalent, et de purifier le complexe directement d'un contexte membranaire. C'est ce que Tschauner et collaborateurs (Tschauner *et al.*, 2014) ont fait dans leur étude et ce que nous avons reproduit avec le système Zra.

Différentes hypothèses sur l'activation de ZraS par le zinc étaient envisagées lors de mon arrivée en thèse. Tout comme CpxP, ZraP pourrait être liée à ZraS pour maintenir le système inactif et l'entrée massive de zinc dans le périplasme déplacerait ZraP pour rendre ZraS accessible au zinc. On pouvait aussi envisager que ZraP et ZraS interagissent pour garder le système inactif et la fixation de zinc sur ZraP changerait sa conformation, modifiant l'interaction avec ZraS et activant le système. Enfin, nous avons envisagé que ZraP ne serait pas liée à ZraS lorsque le système est inactif. L'arrivée d'une dose stressante causerait une fixation du zinc à ZraP qui irait transporter le métal vers ZraS pour activer le système. Cette interaction serait permanente et empêcherait le système d'être réactivé par d'autres ZraP métalées. Par des expériences d'interactions *in vivo* entre ZraP et ZraS, nous avons montré que, suite à la coproduction de ZraS et ZraP dans le périplasme et la stabilisation des interactions physiques par traitement au formaldéhyde, il est possible de mettre en évidence un complexe contenant ZraS et ZraP. Cette même expérience en excès de zinc ou en présence d'un agent chélateur de zinc montre que la formation du complexe ZraS-ZraP est favorisée par la présence de zinc.

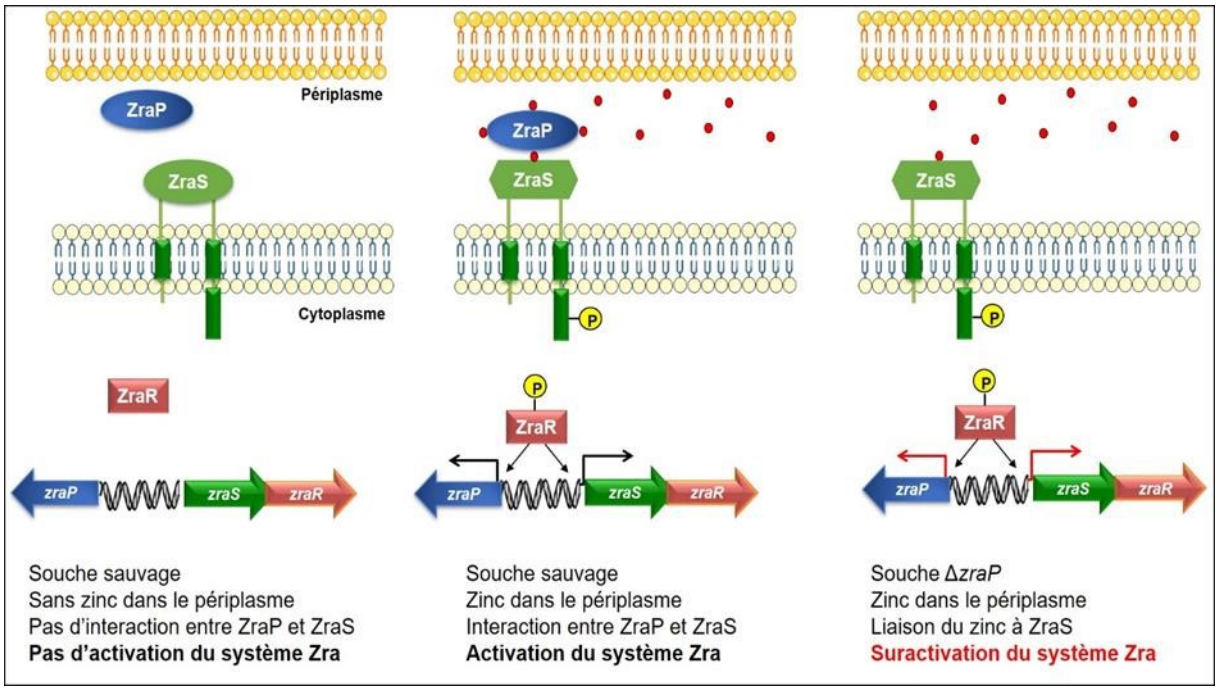


Figure D 4 : Schéma de régulation de l'activation du système Zra par le zinc dans la souche sauvage et la souche ΔzraP.

Le système Zra composé de ZraP (bleu), ZraS (vert) et ZraR (rouge) est activé par le zinc (cercles rouges). Dans le périplasme, le zinc va se lier à ZraP qui va alors interagir avec ZraS et activer le système. ZraS s'autophosphoryle puis transfère ce phosphate vers ZraR qui va

activer la transcription des gènes du système *zra*. Sans ZraP (souche *ΔzraP*), le zinc se lie directement à ZraS et suractive le système.

Nous pouvons donc déjà conclure qu'un mécanisme impliquant que ZraP soit liée à ZraS pour maintenir le système inactif en absence de zinc n'est pas possible puisque la liaison du zinc renforce l'interaction. Toutefois, il est vrai que nous ne pouvons pas savoir si c'est ZraP ou ZraS (le domaine périplasmique) qui lie le zinc en premier puisque les deux protéines démontrent la capacité de lier le zinc (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Mais, si on suppose que l'interaction entre ZraP et ZraS permet de limiter l'activation du système, ce résultat devient plutôt logique. L'absence de ZraP causerait alors une suractivation anormale du système lorsque ZraS lie directement le zinc (Figure D 4).

3.b. La concentration de zinc liée à ZraP affecte l'interaction avec le domaine périplasmique de ZraS

Lors de ma première année de thèse, nous avions tenté de faire des expériences de copurification, après mélange des protéines ZraSp et ZraP purifiées mais nous n'avons jamais pu mettre en évidence de formation de complexes. Nous avons réussi stabiliser l'interaction entre ZraSp et ZraP en ajoutant du formaldéhyde. Ces résultats nous ont permis de conclure que ZraP peut se lier au domaine périplasmique de ZraS. Des expériences annexes, avec des variants de ZraP, nous ont aussi montré l'implication du domaine C-ter de ZraP dans la formation du complexe avec ZraSp.

Pouvoir tester *in vitro* l'interaction entre ZraSp et ZraP nous donne un énorme avantage car il est possible de tester l'influence du métal et de sa concentration sur la formation du complexe. Ainsi, nos résultats ont montré que deux excès de zinc par rapport à la concentration de ZraP (concentration de l'octamère) ne modifient pas l'affinité de ZraP pour ZraSp. Dans ce cas, il y a 0,25 zinc lié par monomère de ZraP. D'autre part, cinq excès de zinc par rapport à la concentration monomérique de ZraP augmentent fortement l'affinité pour ZraSp. Il semble donc que la quantité de zinc liée par monomère de ZraP module son affinité pour ZraSp. Il a été montré que ZraP fixe, par des sites de fixation de haute affinité, 0,5 zinc par monomère (Figure D 5 au milieu) et, par des sites à basse affinité, 1 zinc par monomère (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Potentiellement, en cas d'excès de zinc, ZraP pourrait donc fixer 1,5 zinc par monomère (Figure D 5) . Dans le cas où ZraP lie 0,25 zinc par monomère, tous les sites de haute affinité pour le zinc de l'octamère ne sont pas remplis, ce qui cause une faible

interaction avec ZraSp. Dans l'autre cas, l'excès de zinc permet de remplir complètement les sites à haute et basse affinité de fixation du zinc, rendant ZraP plus affin pour ZraSp. La même expérience d'interaction *in vitro* a aussi été réalisée avec les variants ZraPH1A et ZraPΔCter. Le site de liaison privilégié du zinc (fixant le zinc avec haute affinité) sur ZraP étant l'histidine H1, la substitution de ce résidu par une alanine cause la perte du site à haute affinité. Toutefois ce variant reste octamérique. Le variant ZraPΔCter est dimérique mais ne contient plus ce domaine non structuré en C-terminal décrit comme étant capable de lier le zinc avec basse affinité (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Ces variants, en présence de 5 excès de zinc par rapport à la quantité de monomères de ZraP, lient avec moins d'affinité ZraSp que le ZraP natif. La quantification de l'interaction avec le logiciel *Imagelab* suggère même que le variant ZraPΔCter se lie moins que le variant H1A à ZraSp.

Sachant que ZraP possède en C-ter une boucle non-structurée contenant des résidus histidine et cystéine potentiellement capable de fixer du zinc, on peut penser que les sites de fixation du zinc à basse affinité se trouveraient au niveau de cette boucle en C-ter.

Ces expériences confirment la modulation de l'interaction entre ZraS et ZraP par la quantité de zinc liée à ZraP.

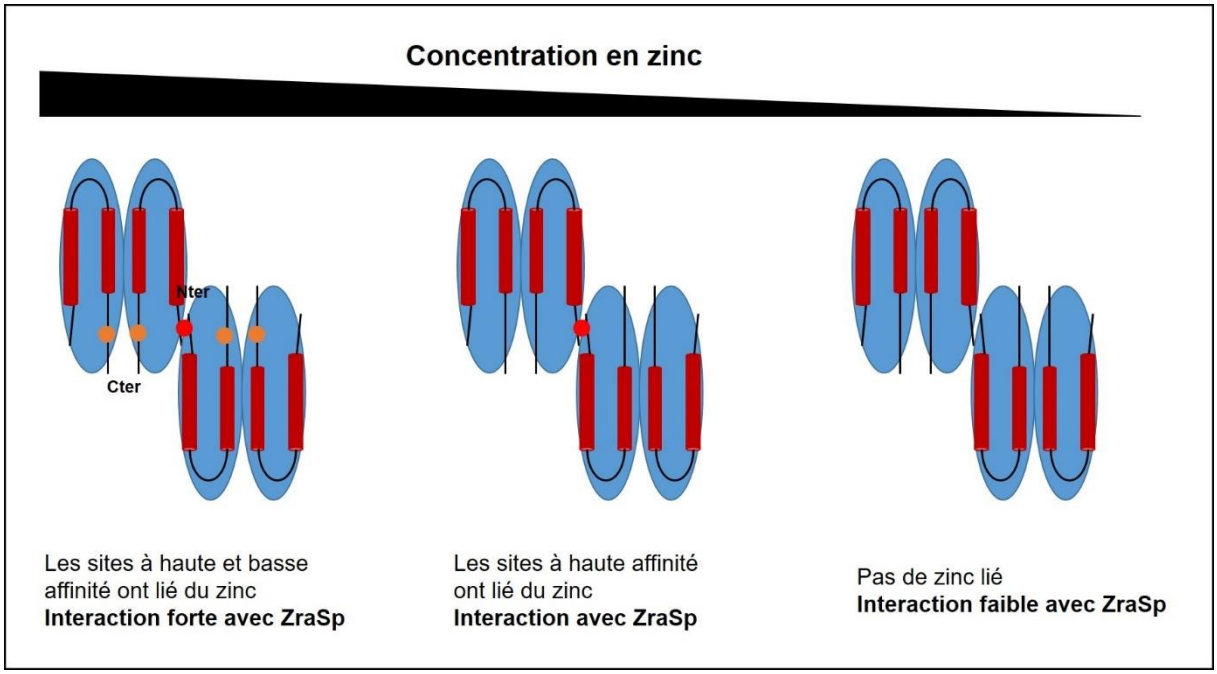


Figure D 5 : Schéma explicatif de l'effet de la liaison différentielle du zinc sur ZraP.

L'enveloppe (ovale bleu) des monomères de ZraP arrangés en tétramère est représentée avec les différents états de métallation. Le repliement de ZraP en hélices α antiparallèles est modélisé par les cylindres rouges. Le zinc, lié sur le site à haute affinité est représenté par une boule rouge. De même, celui lié sur les sites à basse affinité est désigné par une boule orange. Pour une question de visibilité, seuls deux dimères de l'octamère ont été représentés.

Pensant que ZraP pourrait être un métallochaperon qui transporte le zinc vers ZraS pour activer le système Zra, nous avons tenté de déterminer s'il y a un transfert de zinc entre les deux protéines par mesure de fluorescence. Nous avions observé auparavant que seule la fixation du zinc sur ZraSp modifiait la fluorescence intrinsèque ce qui pouvait nous permettre de mettre en évidence un transfert de l'ion métallique entre ZraS et ZraP. On observe que du ZraP métalée avec du zinc modifie (1,2 fois plus environ) plus la fluorescence intrinsèque des résidus tryptophanes de ZraSp que celle de ZraP traitée avec de l'EDTA suggérant un transfert de l'ion métallique. De plus, l'ajout de ZraPΔCter métalé modifie 3,5 fois moins la fluorescence intrinsèque de ZraSp que celle de ZraP métalé signe d'une implication du domaine C-ter dans le transfert du zinc. Le seul résultat que nous trouvons un peu étrange est le fait que le ZraP métalé modifie la fluorescence de ZraSp seulement 1,07 fois plus que ZraP non métalée. Avec ce test, le zinc n'améliorerait que très peu la liaison de ZraP à ZraSp.

Cependant, l'interprétation de cette expérience est un peu compliquée à faire. En effet, la modification de la fluorescence émise par les tryptophanes de ZraSp peut être causée par deux évènements distincts. L'ajout de zinc a un effet de *quench* sur la fluorescence des tryptophanes mais on sait aussi que la liaison du zinc sur ZraSp modifie la conformation de la protéine. Ce changement pourrait aussi faire bouger les tryptophanes et ainsi causer une diminution de la fluorescence émise. Il est tout à fait envisageable que ce soit même l'effet de ces deux phénomènes que l'on observe. Pareillement, la liaison de ZraP pourrait modifier la conformation de ZraSp et ainsi changer la fluorescence émise. On ne peut donc pas dissocier les deux signaux seulement avec cette expérience. À titre d'exemple, l'absence de changement de fluorescence lors du mélange de ZraPΔCter avec ZraSp peut-être due à une absence d'interaction entre les deux protéines ou une absence de transfert du zinc. L'ensemble des résultats convergent tout de même vers une régulation fine de l'activation du système Zra par interaction entre ZraP et ZraS. Malheureusement, on ne peut pas conclure que ZraP est un métallochaperon car nous n'avons pas pu montrer que le zinc est transféré de ZraP à ZraS.
Prouver qu'il y a un transfert de zinc de ZraP à ZraSp nécessiterait, par exemple, d'incuber holo-ZraP (ZraP métalée avec du zinc) avec apo-ZraSp (ZraSp non-métalée) avant de séparer les deux protéines (par filtration sur gel par exemple) et doser par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-MS) si ZraSp contient du zinc. Cette expérience a été réalisée pour montrer le transfert de zinc entre AztD, un métallochaperon qui apporte le zinc périplasmique

à AztC, une protéine appartenant à un transporteur de type ABC impliqué dans l'assimilation du zinc chez *Paracoccus denitrificans* (Handali *et al.*, 2015; Neupane *et al.*, 2017).

3.c. Le système Zra nécessite une régulation fine par ZraP

Depuis l'article de Appia-Ayme et collaborateurs (Appia-Ayme et al., 2012), dans lequel il est montré que la délétion de *zraP* cause une sensibilité accrue de Salmonella enterica à la polymyxine B, un antibiotique qui cible la membrane, un rôle de chaperon moléculaire périplasmique a été assigné à ZraP. De plus, des expériences de protection de la malate deshydrogénase (MDH) *in vitro* ont prouvé que ZraP peut protéger la MDH de la dénaturation thermique supportant l'idée que ZraP serait une protéine chaperon de type *holdase* qui se lie à une protéine pour empêcher sa dénaturation (Petit-Hartlein *et al.*, 2015). Cette théorie est appuyée par la similarité structurale de ZraP avec la famille des chaperons périplasmiques représentés par Spy (Introduction partie : État des connaissances sur le système Zra). En effet, ces protéines ont plus ou moins la même masse molaire (10 à 15 kDa pour le monomère) et sont composées d'hélices α antiparallèles qui forment un « berceau ». Toutefois, l'oligomérisation en décamère de ZraP diffère beaucoup des dimères formés par CpxP et Spy. Enfin, le motif LTXXQ est retrouvé en N et C-ter de CpxP et Spy mais seulement en N-ter de ZraP. De plus, toutes ces protéines sont capables de protéger la MDH de la dénaturation thermique (Quan *et al.*, 2011, 2014). Mais, seule Spy a été montrée comme étant capable de restaurer l'activité d'oxydation du malate en oxaloacétate de la MDH suite à la dénaturation thermique ; on ne peut donc pas affirmer avec certitude que CpxP et ZraP sont aussi des chaperons qui aident au repliement des protéines dans le périplasme.

Pour tester la capacité de ZraP, à aider le repliement des protéines périplasmiques suite au stress affectant l'enveloppe bactérienne, nous avons surexprimé *zraP,* dans une contexte génétique *ΔzraR*, la polymyxine B. La mesure de la survie bactérienne dans ces conditions prouve que ZraP ne modifie pas la sensibilité des bactéries à la polymyxine B (Résultats partie : Rôle de la protéine accessoire ZraP). ZraP seule ne suffit donc pas à réparer les dommages causés par la polymyxine B et n'est donc probablement pas un chaperon périplasmique. Pareillement, même si le système Cpx est impliqué dans la résistance à certains antibiotiques (Raivio *et al.*, 2013; Mahoney & Silhavy, 2013), il n'y a aucune preuve que ce soit dû à l'activité chaperon de CpxP. Mais cela pose un problème sur les résultats *in vitro* de la protection de la MDH à la

dénaturation et sur la potentialisation de cet effet. Nous pensons que ZraP se lie facilement à la
MDH et l'empêche de se dénaturer à 45°C car le rôle de ZraP est de lier le domaine périplasmique de ZraS. Ce ne serait pas un effet chaperon que l'on observe mais juste une protection aspécifique de ZraP par sa capacité à interagir avec une autre protéine. De plus, l'ajout du zinc, comme nous l'avions expliqué, rend ZraP plus affin pour ZraSp. Cette forme métalée sera donc plus affine pour la MDH lors du test de dénaturation thermique rendant la protection plus efficace.

Le rôle régulateur du système Zra semble donc être le rôle prédominant de ZraP. Des analyses phylogénétiques au sein des ϒ-protéobactéries montrent que, parmi toutes les espèces bactériennes qui possèdent des gènes homologues à *zraS* et *zraR*, seules les enterobactériales possèdent un gène homologue à *zraP* (Figure D 6). L'analyse de la topologie des domaines périplasmiques de ZraS chez les enterobactériales, les vibrionales, les pseudomonadales, les oceanospirillales et les legionellales, montre que la présence de ZraP est corrélée avec la présence d'une boucle périplasmique de ZraS de 17 à 30 kDa. Au contraire, dans les souches où les protéines ZraSR sont présentes mais pas ZraP, on remarque la présence de plus de deux domaines transmembranaires et des domaines périplasmiques plus petits. Cela suggère que ZraP ne serait nécessaire que dans les souches bactériennes où le domaine périplasmique de ZraS est grand.

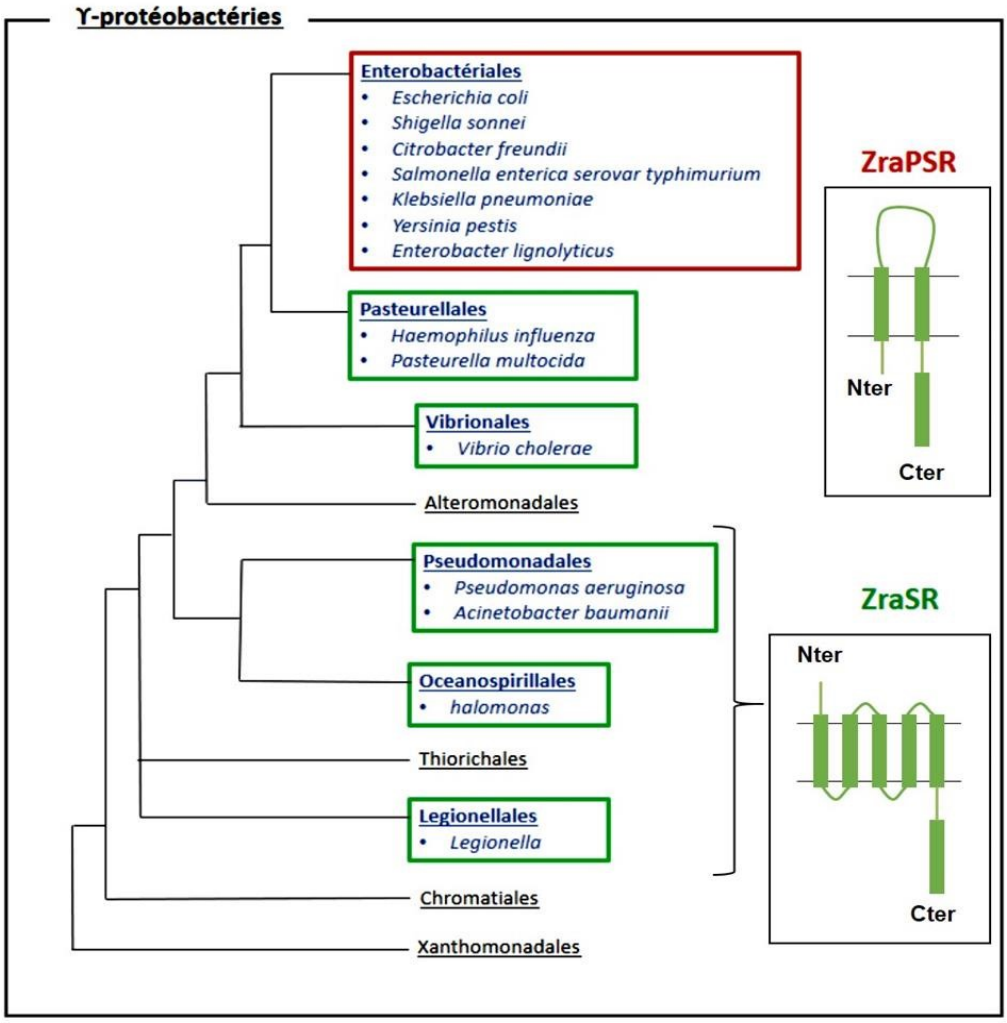


Figure D 6 : Distribution de ZraP au sein des ϒ-protéobactéries.

Arbre phylogénétique représentant les ϒ-protéobactéries. Les espèces entourées en rouge (les enterobactériales) possèdent les gènes *zraS*, *zraR* et *zraP*. Les espèces entourées en vert possèdent les gènes *zraS* et *zraR* mais pas *zraP*. Dans les cases à droite sont représentées les topologies typiques de ZraS des enterobactériales (haut), des pseudomonadales, oceanospirillales et legionellales (bas). La figure est issue de la thèse de Kévin ROME, INSA LYON, Décembre 2017.

On peut tout de même se demander pourquoi chez les enterobactériales, il est si important de réguler l'activation de ZraS par le zinc. Pour le système Cpx, il a été montré que la régulation fine de l'activation de ce système de « contrôle qualité » du périplasme est importante (Delhaye *et al.*, 2016). En effet, l'expression chez *E. coli* d'un mutant de CpxA constitutivement activé modifie la forme des bactéries et diminue croissance bactérienne. Ce résultat est assez logique quand on sait que le système Cpx régule un grand nombre de systèmes de réparation et de maintien de l'homéostasie périplasmique. Une activation non-justifiée du système cause une synthèse injustifiée de protéines ce qui demande donc

beaucoup d'énergie à la bactérie qui conduit à une diminution de son taux de croissance. Pour déterminer si le système Zra nécessite également d'être finement régulé, nous avons comparé les taux de croissance d'une souche *ΔzraP* surproduisant ou non ZraS en présence ou en absence de zinc (Résultats partie : Rôle de la protéine accessoire ZraP). Les résultats nous montrent d'abord que la surproduction seule de

ZraS n'affecte pas la croissance (Figure D 7 à gauche). On remarque aussi que l'activation directe de ZraS par le zinc, sans ZraP, affecte la croissance des bactéries (Figure D 7 au centre). De plus, la suractivation par ajout du zinc à une quantité de ZraS supérieure à la quantité physiologique diminue encore plus le temps de croissance des bactéries et donc leur efficacité de division (*fitness*) (Figure D 7 à droite).

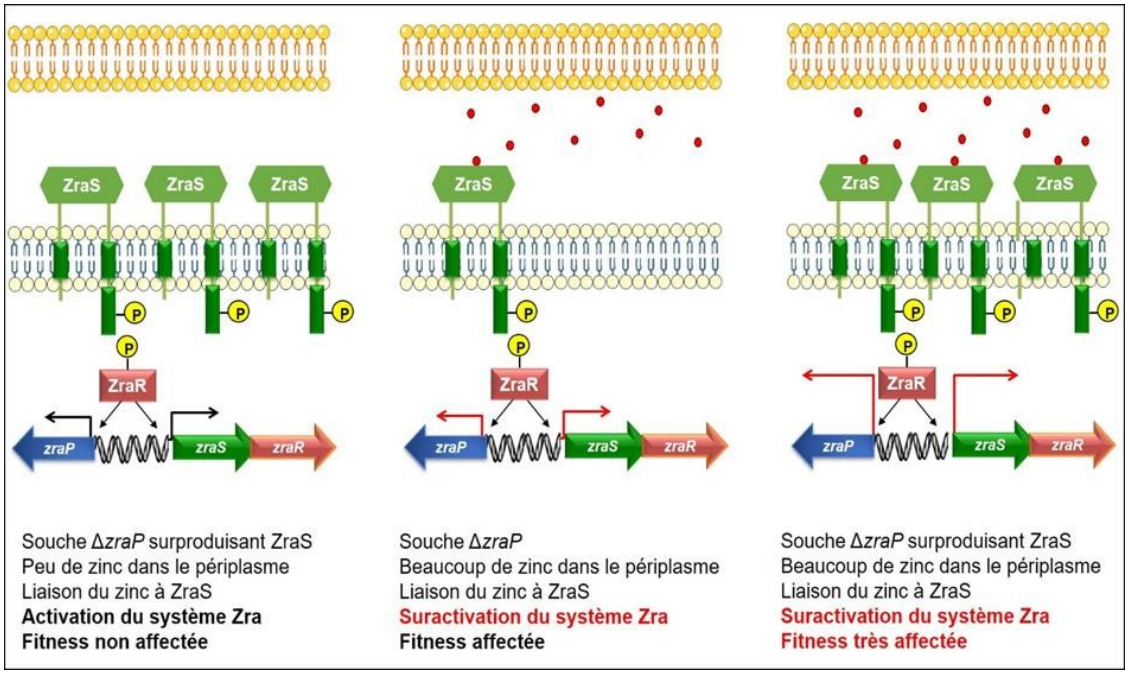


Figure D 7 : Effets de la suractivation de ZraS sur la fitness des bactéries.

Le système Zra, composé de ZraS (vert) et ZraR (rouge), est activé par le zinc (cercles rouges). La surproduction de ZraS est montrée à gauche, l'activation directe de ZraS par le zinc est montrée au centre et la suractivation du système sans régulation par ZraP est montrée à droite. Ces expériences montrent que la présence de ZraP est importante pour éviter l'emballement du système Zra lors de son activation par le zinc. Ainsi ce système n'est activé que lorsque c'est nécessaire de façon à ce que la bactérie utilise son énergie de manière optimale, à la fois pour croître et s'adapter aux stress de l'environnement.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Pour mieux comprendre la réponse engendrée par l'activation du système Zra, nos collaborateurs de l'INSA Lyon ont déterminé une partie des gènes régulés par ZraR en présence de zinc (voir l'article Rome K et al, 2018 en annexe). Notre contribution a permis de comprendre qu'*in vivo*, dans les conditions testées, ZraP n'agit pas comme un chaperon permettant de répondre au stress engendré par un antibiotique ciblant la membrane (la polymyxine B), mais via son rôle de régulateur négatif du système Zra.

De plus lors de ces trois années de thèse, mes recherches sur le système Zra nous ont permis de préciser son mécanisme d'activation qui est dépendant de ZraP. En effet, nos résultats montrent que ZraP fixerait le zinc et se lierait à ZraS pour activer le système. Ainsi ZraS ne serait activée qu'une seule fois et ce qui empêcherait la suractivation du système, nocive pour la vitesse de croissance de la bactérie. Le signal d'activation passe par la liaison du zinc, sur deux sites de liaisons avec des affinités différentes. Cette liaison modifierait l'affinité pour ZraS. Ainsi nous avons surtout réussi à donner un rôle précis à ZraP qui est selon nous un modulateur du système Zra et non une protéine qu'on a d'abord prise pour une simple « éponge à zinc » puis pour un chaperon périplasmique. Il est encore nécessaire de déterminer précisément quels sont les résidus impliqués dans la coordination du zinc de ZraS et quel est l'état oligomérique de ZraS dans le contexte membranaire. En effet, la purification de ZraS sous sa forme entière pourrait permettre d'obtenir une protéine plus stable. De plus, avoir accès à la partie cytoplasmique serait utile car ainsi, il serait possible de muter les résidus que l'on suppose impliqués dans la fixation du zinc et mesurer l'effet de ces substitutions sur l'activité kinase de ZraS. Cela pourrait nous permettre de préciser quels sont les résidus de ZraS coordonnant le zinc sans avoir à cristalliser la protéine. De plus, avoir accès à cette forme entière de ZraS nous permettrait de tester les activités kinase et phosphatase de cette protéine en présence et en absence de ZraP, confirmant une fois de plus nos hypothèses sur le mécanisme d'activation. Enfin, il reste à comprendre le mécanisme de dégradation et de recyclage des différentes protéines qui composent le système Zra. ZraP étant une protéine périplasmique, elle pourrait être prise en charge par des protéases tel que DegP (Chang, 2016). Suivre la production de ces protéines dans le temps suite à l'induction du système par le zinc permettrait de voir si la surexpression de l'une causerait la dégradation de l'autre. Ces mêmes expériences pourraient être appliquées aussi à ZraS et ZraR mais les protéases impliquées seront différentes.

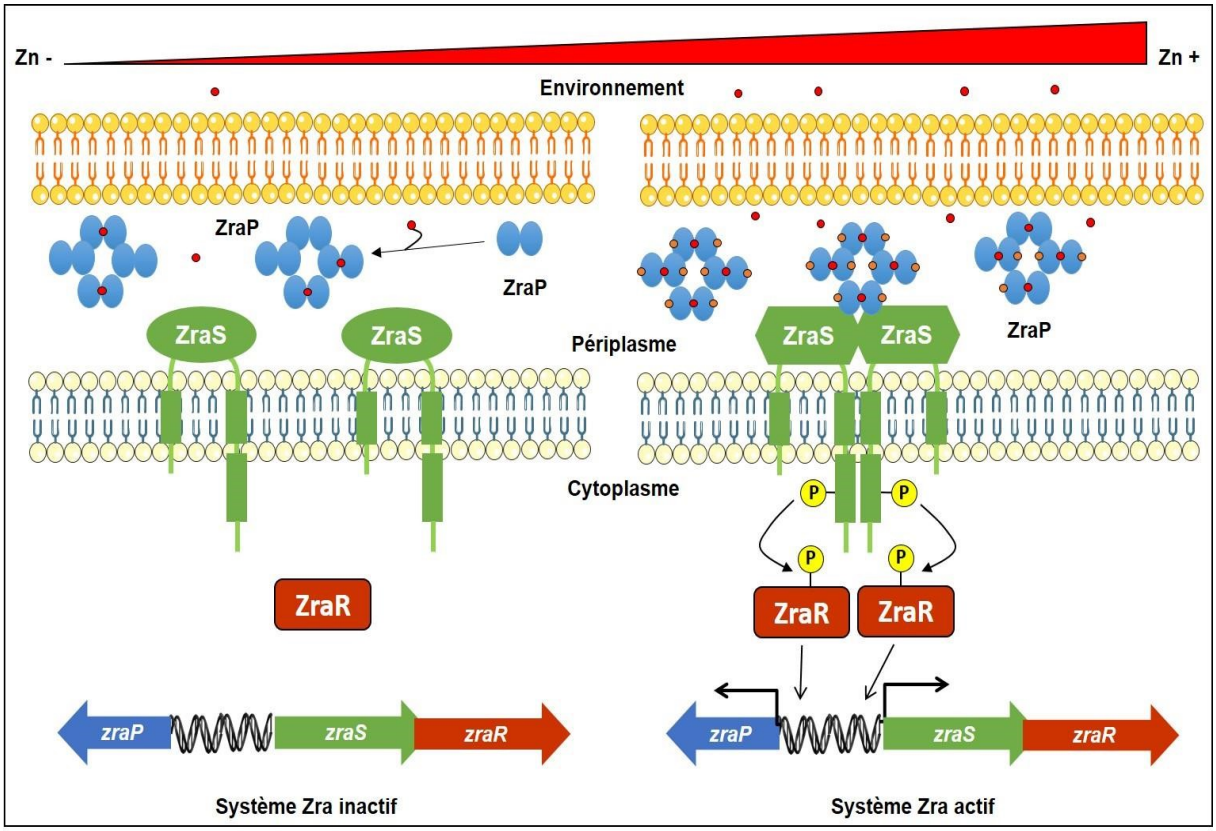


Figure D 8 : Proposition de mécanisme d'activation de la voie Zra par le zinc.

Schéma bilan du mécanisme d'activation par le zinc de ZraS. Dans des conditions où il y a peu de zinc dans le périplasme, les dimères de ZraP s'associeraient pour former l'octamère suite à la liaison du zinc (données récentes : Dans le périplasme, la seule cystéine de ZraP est sous forme réduite, le zinc aiderait à l'oligomérisation en octamère dans le périplasme). Le zinc seulement lié aux sites de fixation du zinc à haute affinité de ZraP n'interagirait pas avec ZraS et le système reste inactif. Dans des conditions d'excès de zinc dans le périplasme, le zinc se lierait sur les sites de fixation de haute et basse affinité de ZraP ce qui augmente son affinité pour ZraS. Par contact ou par transfert du zinc, ZraP assiste l'activation de ZraS qui vas s'autophosphoryler avant de transférer le phosphate à ZraR qui vas causer l'expression de *zraS*, *zraR* et *zraP*.

BIBLIOGRAPHIE

Abriata, L. A. (2011). *J. Chem. Educ.* **88**, 1268–1273.

Appia-Ayme, C., Hall, A., Patrick, E., Rajadurai, S., Clarke, T. A. & Rowley, G. (2012). *Biochem. J.* **442**, 85–93.

Asiani, K. R., Williams, H., Bird, L., Jenner, M., Searle, M. S., Hobman, J. L., Scott, D. J. & Soultanas, P. (2016). *Mol. Microbiol.* **101**, 731–742.

Backert, S., Neddermann, M., Maubach, G. & Naumann, M. (2016). *Helicobacter*. **21 Suppl 1**, 19–25.

Baranova, N. & Nikaido, H. (2002). *J. Bacteriol.* **184**, 4168–4176.

Becker, K. W. & Skaar, E. P. (2014). *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 1235–1249.

Binepal, G., Gill, K., Crowley, P., Cordova, M., Brady, L. J., Senadheera, D. B. & Cvitkovitch, D. G. (2016). *J. Bacteriol.* **198**, 1087–1100.

Binet, M. R. & Poole, R. K. (2000). *FEBS Lett.* **473**, 67–70.

Boor, K. J. (2006). *PLoS Biol.* **4**, e23.

Bourret, R. B. & Silversmith, R. E. (2010). *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 113–115.

Brissette, J. L., Russel, M., Weiner, L. & Model, P. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 862–866.

Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y. & Gralla, J. D. (2000). *J. Bacteriol.* **182**, 4129–4136.

Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A. & Bouloc, P. (2009). *PLoS Genet.* **5**, e1000651.

Bush, M. & Dixon, R. (2012). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 497–529.

Butkus, J. M., O'Riley, S., Chohan, B. S. & Basu, S. (2016). *Int. J. Spectrosc.* **2016**, 1–12.

Calmettes, C., Ing, C., Buckwalter, C. M., El Bakkouri, M., Chieh-Lin Lai, C., Pogoutse, A., Gray-Owen, S. D., Pomès, R. & Moraes, T. F. (2015). *Nat. Commun.* **6**,.

Capdevila, D. A., Edmonds, K. A. & Giedroc, D. P. (2017). *Essays Biochem.* **61**, 177–200.

Capdevila, D. A., Wang, J. & Giedroc, D. P. (2016). *J. Biol. Chem.* **291**, 20858–20868.

Chandrangsu, P., Rensing, C. & Helmann, J. D. (2017). *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 338–350.

Chang, Z. (2016). *IUBMB Life*. **68**, 904–907.

Cheung, J., Bingman, C. A., Reyngold, M., Hendrickson, W. A. & Waldburger, C. D. (2008). *J. Biol. Chem.* **283**, 13762–13770.

Cheung, J. & Hendrickson, W. A. (2008). *J. Biol. Chem.* **283**, 30256–30265.

Cheung, J. & Hendrickson, W. A. (2009). *Structure*. **17**, 190–201.

Cheung, J. & Hendrickson, W. A. (2010). *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 116–123.

Cheung, J., Le-Khac, M. & Hendrickson, W. A. (2009). *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **77**, 235–241.

Choi, E., Groisman, E. A. & Shin, D. (2009). *J. Bacteriol.* **191**, 7174–7181.

Choi, S. & Bird, A. J. (2014). *Metallomics*. **6**, 1198–1215.

Clarke, D. J. (2010). *Future Microbiol.* **5**, 1173–1184.

Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W. & Laemmli, U. K. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 1102–1106.

Clohessy, P. A. & Golden, B. E. (1995). *Scand. J. Immunol.* **42**, 551–556.

Cobine, P. A., Pierrel, F. & Winge, D. R. (2006). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1763**, 759–772.

Consalvi, V., Chiaraluce, R., Giangiacomo, L., Scandurra, R., Christova, P., Karshikoff, A., Knapp, S. & Ladenstein, R. (2000). *Protein Eng.* **13**, 501–507.

Corbin, B. D., Seeley, E. H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M. R., Torres, V. J., Anderson, K. L., Dattilo, B. M., Dunman, P. M., Gerads, R., Caprioli, R. M., Nacken, W., Chazin, W. J. & Skaar, E. P. (2008). *Science*. **319**, 962–965.

Cronan, J. E. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 37355–37364.

Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002). *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*. **66**, 223–249.

Csonka, L. N. (1989). *Microbiol. Rev.* **53**, 121–147.

Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M. & Barton, G. J. (1998). *Bioinforma. Oxf. Engl.* **14**, 892–893.

Danese, P. N. & Silhavy, T. J. (1998). *J. Bacteriol.* **180**, 831–839.

Dartigalongue, C., Missiakas, D. & Raina, S. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 20866–20875.

De Biase, D. & Lund, P. A. (2015). *Advances in Applied Microbiology*, Vol. *92*, pp. 49–88. Elsevier.

De Wulf, P., McGuire, A. M., Liu, X. & Lin, E. C. C. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 26652–26661.

Delhaye, A., Collet, J.-F. & Laloux, G. (2016). *MBio*. **7**, e00047-16.

Dong, J., Iuchi, S., Kwan, H. S., Lu, Z. & Lin, E. C. (1993). *Gene*. **136**, 227–230.

Dudev, T., Lin, Dudev, M. & Lim, C. (2003). *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3168–3180.

Dupré, E., Herrou, J., Lensink, M. F., Wintjens, R., Vagin, A., Lebedev, A., Crosson, S., Villeret, V., Locht, C., Antoine, R. & Jacob-Dubuisson, F. (2015). *PLOS Pathog.* **11**, e1004700.

Eron, L. & Block, R. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 1828–1832.

Fischbach, M. A., Lin, H., Liu, D. R. & Walsh, C. T. (2006). *Nat. Chem. Biol.* **2**, 132.

Flores-Kim, J. & Darwin, A. J. (2016). *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 83–101.

Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L. & Battistoni, A. (2011). *BMC Microbiol.* **11**, 36.

Gabriel, S. E., Miyagi, F., Gaballa, A. & Helmann, J. D. (2008). *J. Bacteriol.* **190**, 3482–3488.

Giedroc, D. P. & Coleman, J. E. (1986). *Biochemistry* . **25**, 4969–4978.

Gilston, B. A., Wang, S., Marcus, M. D., Canalizo-Hernández, M. A., Swindell, E. P., Xue, Y., Mondragón, A. & O'Halloran, T. V. (2014). *PLoS Biol.* **12**, e1001987.

Goldberg, S. D., Soto, C. S., Waldburger, C. D. & DeGrado, W. F. (2008). *J. Mol. Biol.* **379**, 656–665.

Gottesman, S., Trisler, P. & Torres-Cabassa, A. (1985). *J. Bacteriol.* **162**, 1111–1119.

Greie, J.-C. (2011). *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 705–710.

Grim, K. P., San Francisco, B., Radin, J. N., Brazel, E. B., Kelliher, J. L., Párraga Solórzano, P. K., Kim, P. C., McDevitt, C. A. & Kehl-Fie, T. E. (2017). *MBio*. **8**,.

Guerrero, P., Collao, B., Morales, E. H., Calderón, I. L., Ipinza, F., Parra, S., Saavedra, C. P. & Gil, F. (2012). *Arch. Microbiol.* **194**, 453–460.

Gupta, S. D., Lee, B. T., Camakaris, J. & Wu, H. C. (1995). *J. Bacteriol.* **177**, 4207–4215.

Gushchin, I. & Gordeliy, V. (2018). *BioEssays*. **40**, 1700197.

Gushchin, I., Melnikov, I., Polovinkin, V., Ishchenko, A., Yuzhakova, A., Buslaev, P., Bourenkov, G., Grudinin, S., Round, E., Balandin, T., Borshchevskiy, V., Willbold, D., Leonard, G., Büldt, G., Popov, A. & Gordeliy, V. (2017). *Science*. **356**, eaah6345.

Handali, M., Roychowdhury, H., Neupane, D. P. & Yukl, E. T. (2015). *J. Biol. Chem.* **290**, 29984–29992.

Herrou, J., Bompard, C., Wintjens, R., Dupre, E., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., Antoine, R. & Jacob-Dubuisson, F. (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17351–17355.

Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2004). *Mol. Microbiol.* **55**, 1113–1126.

Hirano, Y., Hossain, M. M., Takeda, K., Tokuda, H. & Miki, K. (2007). *Structure*. **15**, 963–976.

Horiyama, T. & Nishino, K. (2014). *PloS One*. **9**, e108642.

Hu, H. Q., Huang, H.-T. & Maroney, M. J. (2018). *Biochemistry* . **57**, 2932–2942.

Hu, Z., Gunasekera, T. S., Spadafora, L., Bennett, B. & Crowder, M. W. (2008). *Biochemistry*. **47**, 7947–7953.

Hunke, S. & Betton, J.-M. (2003). *Mol. Microbiol.* **50**, 1579–1589.

Hunke, S., Keller, R. & Müller, V. S. (2012). *FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 12–22.

Hunter, M. J. & Chazin, W. J. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 12427–12435.

Hurme, R., Berndt, K. D., Normark, S. J. & Rhen, M. (1997). *Cell*. **90**, 55–64.

Ilari, A., Alaleona, F., Tria, G., Petrarca, P., Battistoni, A., Zamparelli, C., Verzili, D., Falconi, M. & Chiancone, E. (2014). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1840**, 535– 544.

Ishii, E., Eguchi, Y. & Utsumi, R. (2013). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 814–819.

Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J.-M. & Antoine, R. (2018). *Nat. Rev. Microbiol.*

Jeong, S. M., Lee, H. J., Park, Y. M., Kim, J. S., Lee, S. D. & Bang, I. S. (2017). *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **37**, 134–138.

Johnson, R. C., Hu, H. Q., Merrell, D. S. & Maroney, M. J. (2015). *Met. Integr. Biometal Sci.* **7**, 674–682.

Koldewey, P., Stull, F., Horowitz, S., Martin, R. & Bardwell, J. C. A. (2016). *Cell*. **166**, 369–379.

Konkel, M. E. & Tilly, K. (2000). *Microbes Infect.* **2**, 157–166.

Korndörfer, I. P., Brueckner, F. & Skerra, A. (2007). *J. Mol. Biol.* **370**, 887–898.

Kustusch, R. J., Kuehl, C. J. & Crosa, J. H. (2011). *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **24**, 559–566.

Kwon, E., Kim, D. Y., Ngo, T. D., Gross, C. A., Gross, J. D. & Kim, K. K. (2012). *Protein Sci.* **21**, 1334–1343.

Lacasse, M. J. & Zamble, D. B. (2016). *Biochemistry* . **55**, 1689–1701.

Laitaoja, M., Valjakka, J. & Jänis, J. (2013). *Inorg. Chem.* **52**, 10983–10991.

Lee, N., Wilcox, G., Gielow, W., Arnold, J., Cleary, P. & Englesberg, E. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 634–638.

Leonhartsberger, S., Huber, A., Lottspeich, F. & Böck, A. (2001). *J. Mol. Biol.* **307**, 93–105.

Li, M. Z. & Elledge, S. J. (2012). *Gene Synthesis*, Vol. *852*, edited by J. Peccoud, pp. 51–59. Totowa, NJ: Humana Press.

Lund, P., Tramonti, A. & De Biase, D. (2014). *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 1091–1125.

Ma, Z., Gabriel, S. E. & Helmann, J. D. (2011). *Nucleic Acids Res.* **39**, 9130–9138.

Mahoney, T. F. & Silhavy, T. J. (2013). *J. Bacteriol.* **195**, 1869–1874.

McCall, K. A. & Fierke, C. A. (2000*a*). *Anal. Biochem.* **284**, 307–315.

McCall, K. A. & Fierke, C. A. (2000*b*). *Anal. Biochem.* **284**, 307–315.

McEwen, J. & Silverman, P. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 513–517.

Merrick, M. J. (1993). *Mol. Microbiol.* **10**, 903–909.

Mikhaylina, A., Ksibe, A. Z., Scanlan, D. J. & Blindauer, C. A. (2018). *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 983–1001.

Miller, S. I., Kukral, A. M. & Mekalanos, J. J. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5054–5058.

Mooney, R. A. & Landick, R. (1999). *Cell*. **98**, 687–690.

Murakami, K. (2015). *Biomolecules*. **5**, 848–864.

Musiani, F., Gioia, D., Masetti, M., Falchi, F., Cavalli, A., Recanatini, M. & Ciurli, S. (2017). *J. Chem. Theory Comput.* **13**, 2322–2331.

Nadeau & Carlson, O., Gerald (2005). *Protein-Protein Interactions*, Vol. p. NY, USA,: Cold Spring Harbor.

Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2002). *J. Bacteriol.* **184**, 4161–4167.

Neupane, D. P., Avalos, D., Fullam, S., Roychowdhury, H. & Yukl, E. T. (2017). *J. Biol. Chem.* **292**, 17496–17505.

Nishino, K., Nikaido, E. & Yamaguchi, A. (2007). *J. Bacteriol.* **189**, 9066–9075.

Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 7850–7854.

Noll, M., Petrukhin, K. & Lutsenko, S. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 21393–21401.

O'Halloran, T. V. & Culotta, V. C. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 25057–25060.

Otto, K. & Silhavy, T. J. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 2287–2292.

Outten, C. E. (2001). *Science*. **292**, 2488–2492.

Paget, M. S. B. & Helmann, J. D. (2003). *Genome Biol.* **4**, 203.

Pappalardo, L., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M., Unden, G. & Griesinger, C. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 39185–39188.

Parkinson, J. S. (1993). *Cell*. **73**, 857–871.

Petit-Hartlein, I., Rome, K., de Rosny, E., Molton, F., Duboc, C., Gueguen, E., Rodrigue, A. & Coves, J. (2015). *Biochem. J.* **472**, 205–216.

Price, N. L. & Raivio, T. L. (2009). *J. Bacteriol.* **191**, 1798–1815.

Quan, S., Koldewey, P., Tapley, T., Kirsch, N., Ruane, K. M., Pfizenmaier, J., Shi, R., Hofmann, S., Foit, L., Ren, G., Jakob, U., Xu, Z., Cygler, M. & Bardwell, J. C. A. (2011). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 262–269.

Quan, S., Wang, L., Petrotchenko, E. V., Makepeace, K. A., Horowitz, S., Yang, J., Zhang, Y., Borchers, C. H. & Bardwell, J. C. (2014). *ELife*. **3**,.

Rahman, S., Archana, A., Azam, M. & Minakshi, R. (2018). *Curr. Drug Metab.*

Raivio, T. L., Laird, M. W., Joly, J. C. & Silhavy, T. J. (2000). *Mol. Microbiol.* **37**, 1186–1197.

Raivio, T. L., Leblanc, S. K. D. & Price, N. L. (2013). *J. Bacteriol.* **195**, 2755–2767.

Raivio, T. L., Popkin, D. L. & Silhavy, T. J. (1999). *J. Bacteriol.* **181**, 5263–5272.

Rezuchova, B., Miticka, H., Homerova, D., Roberts, M. & Kormanec, J. (2003). *FEMS Microbiol. Lett.* **225**, 1–7.

von Rozycki, T. & Nies, D. H. (2009). *Antonie Van Leeuwenhoek*. **96**, 115–139.

Sallai, L. & Tucker, P. A. (2005). *J. Struct. Biol.* **151**, 160–170.

Sato, T., Takano, A., Hori, N., Izawa, T., Eda, T., Sato, K., Umekawa, M., Miyagawa, H., Matsumoto, K., Muramatsu-Fujishiro, A., Matsumoto, K., Matsuoka, S. & Hara, H. (2017). *Microbiology*. **163**, 1071–1080.

Scarlato, V., Prugnola, A., Aricó, B. & Rappuoli, R. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6753–6757.

Sevcenco, A.-M., Pinkse, M. W. H., Wolterbeek, H. T., Verhaert, P. D. E. M., Hagen, W. R. & Hagedoorn, P.-L. (2011). *Metallomics*. **3**, 1324.

Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D. R., Herbst-Irmer, R., Sheldrick, G. M., Bott, M., Griesinger, C. & Becker, S. (2008). *J. Mol. Biol.* **377**, 512–523.

Shabala, L. & Ross, T. (2008). *Res. Microbiol.* **159**, 458–461.

Shapiro, R. S. & Cowen, L. E. (2012). *MBio*. **3**,.

Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B. P. & Mitra, B. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 3873–3878.

Shin, J.-H. & Helmann, J. D. (2016). *Nat. Commun.* **7**, 12612.

Sigdel, T. K., Easton, J. A. & Crowder, M. W. (2006). *J. Bacteriol.* **188**, 6709–6713.

Snyder, W. B., Davis, L. J., Danese, P. N., Cosma, C. L. & Silhavy, T. J. (1995). *J. Bacteriol.* **177**, 4216–4223.

Sohnle, P. G., Collins-Lech, C. & Wiessner, J. H. (1991). *J. Infect. Dis.* **164**, 137–142.

Stafford, S. L., Bokil, N. J., Achard, M. E. S., Kapetanovic, R., Schembri, M. A., McEwan, A. G. & Sweet, M. J. (2013). *Biosci. Rep.* **33**, 541–554.

Strupat, K., Rogniaux, H., Dorsselaer, A., Roth, J. & Vogl, T. (2000). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 780–788.

Thede, G. L., Arthur, D. C., Edwards, R. A., Buelow, D. R., Wong, J. L., Raivio, T. L. & Glover, J. N. M. (2011). *J. Bacteriol.* **193**, 2149–2157.

Tiwari, S., Jamal, S. B., Hassan, S. S., Carvalho, P. V. S. D., Almeida, S., Barh, D., Ghosh, P., Silva, A., Castro, T. L. P. & Azevedo, V. (2017). *Front. Microbiol.* **8**,.

Trasnea, P.-I., Andrei, A., Marckmann, D., Utz, M., Khalfaoui-Hassani, B., Selamoglu, N., Daldal, F. & Koch, H.-G. (2018). *ACS Chem. Biol.* **13**, 1388–1397.

Trasnea, P.-I., Utz, M., Khalfaoui-Hassani, B., Lagies, S., Daldal, F. & Koch, H.-G. (2016). *Mol. Microbiol.* **100**, 345–361.

Tschauner, K., Hörnschemeyer, P., Müller, V. S. & Hunke, S. (2014). *PLoS ONE*. **9**, e107383.

Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Šoštaric´, N., Economou, A. & Karamanou, S. (2017). *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 21–36.

Vogt, J. H. M. & Schippers, J. H. M. (2015). *Front. Plant Sci.* **6**,.

Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D. & Robinson, N. J. (2009). *Nature*. **460**, 823–830.

Wall, E., Majdalani, N. & Gottesman, S. (2018). *Annu. Rev. Microbiol.* **72**,.

Wang, D., Hosteen, O. & Fierke, C. A. (2012). *J. Inorg. Biochem.* **111**, 173–181.

Weber, R. F. & Silverman, P. M. (1988). *J. Mol. Biol.* **203**, 467–478.

Wood, J. M. (2015). *J. Gen. Physiol.* **145**, 381–388.

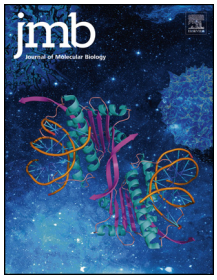
Yuen, M. H., Fong, Y. H., Nim, Y. S., Lau, P. H. & Wong, K.-B. (2017). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E10890–E10898.

Zeer-Wanklyn, C. J. & Zamble, D. B. (2017). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **37**, 80–88.

Zhou, X., Keller, R., Volkmer, R., Krauss, N., Scheerer, P. & Hunke, S. (2011). *J. Biol. Chem.* **286**, 9805–9814.

Zygiel, E. M. & Nolan, E. M. (2018). *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 621–643.

ANNEXES



The Two-Component System ZraPSR Is a Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*

Kévin Rome [1], Céline Borde [1], Raleb Taher [2], Julien Cayron [3], Christian Lesterlin [3], Erwan Gueguen [1], Eve De Rosny [2] and Agnès Rodrigue [1]

1 - Microbiologie, *Adaptation et Pathogénie, UMR5240, CNRS, INSA Lyon, Université Lyon 1, F-69621 Villeurbanne Cedex, France*
2 - Institut de Biologie Structurale, *Campus EPN, CS, 10090, 71 Avenue des Martyrs, 38044 Grenoble cedex 9, France*
3 - Microbiologie Moléculaire et Biochimie Structurale (MMSB), *Université Lyon 1, CNRS, INSERM, UMR5086, 69007 Lyon, France*

Correspondence to Agnès Rodrigue: *agnes.rodrigue@insa-lyon.fr*
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021
Edited by Jenal Urs

Abstract

During their lifecycle, bacteria are exposed to continuous changes in their environment, some of which are stressful and can be harmful. The cell envelope is the first line of defense against a hostile environment, but it is also the first target for damage. To deal with this problem, bacteria have evolved systems collectively called "envelope stress response," or ESR, dedicated to the detection and repair of damaged components. Here we decided to investigate whether the atypical two-component system ZraP-SR is a novel ESR. Based on the screening of more than 240 drugs using the Biolog technology, we show that the deletion of *zraP* or *zraR* confers increased susceptibility to five classes of antibiotics and to some environmental stress targeting the envelope. Using a microscopy approach, we also establish that ZraP and ZraR are required to maintain envelope integrity. So far, the ZraR regulator was only known to activate the transcription of *zraP* and *zraSR.* Using chromatin immunoprecipitation followed by sequencing and RT-qPCR, we have now identified 25 additional genes regulated by ZraR, the majority of which are involved in the response against stress. Taken together, our results demonstrate that ZraP-SR is a novel ESR.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

A common feature of bacteria is that their envelope is in direct contact with their environment. The integrity of this structure is thus crucial to protect the cells against changing or stressful conditions. Detection of stress defects in the cell wall structure or assembly, and ability to repair and maintain the envelope structure are key functions allowing bacteria to evolve in unbalanced environments. In Gram-negative bacteria, several signal transduction pathways are dedicated to the detection of damage of the envelope and to a rapid response via transcriptional regulation of effector genes. These systems are grouped under the term envelope stress response (ESR). Each ESR detects a set of stimuli and controls the expression of genes involved in different cellular functions that concur to the repair or the homeostasis of the envelope. These stimuli range from physical (heat, surface adhesion), chemical (indole, antibiotics, metals) to biological stress (misfolded or damaged proteins) [1]. In *Escherichia coli*, the main ESRs are the σE, Psp, Cpx, Bae and Rcs pathways [2–5]. Most of these ESRs systems belong to the two-component systems family, like Rcs, Bae or Cpx [6]. A sensor composed of a histidine kinase located in the inner membrane autophophorylates upon signal detection and subsequently phosphorylates a cognate cytoplasmic response regulator [7]. When activated, the regulator modulates the expression of the stress response.

One of the best-characterized ESRs is the Cpx system composed of the CpxA histidine kinase and the CpxR response regulator. Cpx is induced by a diversity of extracytoplasmic stimuli such as pH variations, hyperosmolarity, indole and metals [8]. It is also responsive to periplasmic protein misfolding, peptidoglycan alteration and fluctuations of the physical properties of the membranes [3]. Notably, Cpx responds to the fluctuation of the outer-membrane proprieties upon cell attachment to hydrophobic

surfaces, in an NlpE-dependent manner. Overexpression of this this outer-membrane lipoprotein leads to activation of CpxA [9]. It has been shown also that the Cpx system monitors the appropriate targeting of lipoproteins and contributes to the suppression of the toxic effect in case of mislocalization [10]. A transcriptomic study revealed that induction of Cpx by NlpE results in the deregulation of a hundred genes [11]. The signature of stress adaptation mediated by CpxAR is the down-regulation of several large and energy-consuming membrane complexes, and the up-regulation of proteases and chaperones [11]. The identification of CpxP as an accessory protein of the two-component CpxAR system raised the question of its role. CpxP does not seem to be involved in signal transfer between CpxA and CpxR. Instead, it modulates the autokinase activity of CpxA by interacting with its sensor domain. This interaction results in a negative feedback on the CpxAR signaling cascade [12]. The CpxA–CpxP interaction has been inferred from the structural study of CpxP. CpxP is an antiparallel dimer and has an α-helix structure forming a cap shaped dimer. Interestingly, the concave surface has many positively charged residues, whereas the convex surface contains a hydrophobic patch. It has been suggested that the positively charged concave surface of the CpxP dimer interacts with negatively charged residues of the periplasmic domain of CpxA. When under stress, CpxP would be dissociated from CpxA by misfolded proteins, through their interaction with the hydrophobic patch in the convex region of the former [13,14]. Following its release, CpxP is proposed to contribute to prevent protein aggregation through its chaperone activity [13].

The CpxP structure has revealed a structural homology to periplasmic proteins that was not predictable from the amino acid sequence. These structural homologs were grouped under the name of "CpxP superfamily," consisting of the periplasmic proteins CpxP, Spy and ZraP [15]. The amino acid sequence identity between ZraP and Spy, ZraP and CpxP, Spy and CpxP is 13%, 12% and 29%, respectively. These proteins have the structural particularity of being organized in oligomers composed of dimers of intertwined α-helices. In addition to this common tertiary structure, the analysis of CpxP, Spy and ZraP structures revealed the presence of an LTXXQ motif forming a "pinhead" at the end of a helix specific to this family. Although the chaperone function of Spy and CpxP in the stress response of the envelope has been known for a long time [16], this is not the case for ZraP for which a similar role has been inferred only from indirect observations [17].

The *zraP* gene is clustered and co-regulated with the two-component system *zraSR*. The expression of ZraP and ZraSR is induced by Zn^{2+} through the *zraSR* phosphorelay, although it is not involved in zinc resistance [18]. Interestingly, we previously showed that ZraP displays chaperone properties and is a repressor of the expression of the ZraP-SR system [18]. Thus, both at the structural and functional levels, the Zra system share similarities with the Cpx signaling pathway.

The functional convergence between Spy and CpxP was suggested by the fact that the expression of *spy* and *cpxP* is induced in the presence of polymyxin B [19]. Polymyxin B is an antibiotic of the family of cationic peptides which binds to negatively charged lipopolysaccharides (LPS) leading to alteration of the outer membrane [20]. Appia *et al*. [17] investigated in *Salmonella enterica* the effect of polymyxin B on the third element of this structural family, ZraP. Ultimately, by phenotypic analysis of deletion mutants Δ*cpxP*, Δ*zraP* and Δ*spy* in the presence of polymyxin B, these authors showed that all the components of the "CpxP superfamily" are involved in the intrinsic resistance to this antibiotic. This result also suggested that ZraP is involved in envelope homeostasis.

Here, we have investigated the function of ZraP-SR in antibiotic resistance and characterized the regulon of ZraR. We show that ZraP and ZraSR are important to maintain membrane integrity in the presence of biocides targeting the envelope, suggesting that Zra is a novel ESR. We finally demonstrate, using chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIp-Seq), that ZraR controls a regulon of genes of diverse functions that may be critical to maintain envelope integrity and cell survival under stressful conditions.

Results

Zra confers intrinsic resistance to several drugs

The absence of ZraP confers sensitivity to the cationic polypeptide antibiotic polymyxin B in *S. enterica* [17], suggesting that it may be involved in biocide resistance mechanisms. To further its characterization and determine if ZraP is actually a key actor of cell survival under stressful conditions, we used the Biolog Phenotype Microarrays technology [21]. Thus, 240 chemicals were screened that belong to different chemical classes: detergent, uncoupling agents, metals, antibiotics and so on. *E. coli* lacking *zraP* developed sensitivity to seven drugs, five of which were antibiotics (Table 1). Δ*zraP* mutant was more sensitive to the antibiotics lomefloxacin (fluoroquinolone), capreomycin (aminoglycoside), puromycin (aminonucleoside), tetracycline (cycline) and amoxicillin (β-lactam) than WT. The *zraP* deletion mutant was also more sensitive to the detergent domiphen bromide and to the electron acceptor methyl viologen. On the other hand, it was more resistant to the antibiotics cephalotin, and cefluroxime (β-lactams, cephalosporin), amikacine (aminoglycoside) and the oxidative-phosphorylation inhibitor CCCP (Table 1).

Table 1. High-throughput screening of the sensitivity of the *zraR* mutant to drugs

Drug	Family	Target	Δarea (Δ*zraP*-WT)	Phenotype Δ*zraP*
Lomefloxacin	Fluoroquinolone	Replication	−5595	Sensitive
Puromycin	Aminonucleoside	Protein synthesis	−4466	
Amoxicillin	β-lactam	Peptidoglycan	−3180	
Methyl viologen	Electron acceptor	Respiration	−2832	
Capreomycin	Aminoglycoside	Protein synthesis	−1421	
Domiphen bromide	Quaternary Ammonium	Membranes	−1290	
Tetracycline	Cycline	Protein synthesis	−338	
Cephalotin	β-lactam Cephalosporin	Peptidoglycan	6670	Resistant
Cefluroxine	β-lactam Cephalosporin	Peptidoglycan	6266	
Amikacine	Aminoglycoside	Protein synthesis	1364	
CCCP	Oxidative phosphorylation inhibitor	Respiration	1191	

Using the Biolog technology, the respiration of the bacteria was monitored for 24 h. Δarea: the area under the resulting curves were calculated, then the area of the curve obtained with the wild-type strain was subtracted from the area of the mutant strain.

Because the Biolog technology may be occasionally biased, these results were confirmed by *in vivo* survival tests using the same drugs or drugs of the same families. The assays were also extended to more drugs and to the Δ*zraR* mutant. For that purpose, the bacteria were first grown in liquid medium until $OD_{600\ nm} = 0.1$, then the drug was added at a sub-inhibitory concentration to avoid any secondary effects; after 1 h the bacteria were spread on agar rich medium plates. The survival bacterial rate corresponds to the ratio of living cells in the untreated and treated conditions. The impact of ZraP and ZraR on the cell survival is given by the ratio of the survival rates between WT and mutant. The Biolog results were confirmed for most of the tested chemicals. They were not confirmed for methyl viologen and CCCP for which opposite results were obtained (Fig. 1a). As these two compounds are electron uncouplers, they may interfere with the reduction of tetrazolium dye which monitors the respiration in the Biolog system. The Biolog results were also not confirmed for cephalotin as the observed effect was not statistically significant. Among the other chemical tested, the Δ*zraP* mutant was more sensitive to benzethonium chloride (quaternary ammonium, surfactant) and ampicillin (β-lactam) (Fig. 1a) and more resistant to gentamicin (aminoglycoside). We finally confirmed that *zraP* is more sensitive to polymyxin B. When tested, the Δ*zraR* mutant displayed phenotypes similar to that of the Δ*zraP* mutant, except that it was more sensitive to rifampicin (rifamycin) and to mecillinam (β-lactam) (Fig. 1a).

The role of ZraPSR in the intrinsic antibiotics resistance suggests that the expression of the *zra* genes is induced in their presence. To test this hypothesis, we have used transcriptional fusion between the promoters of *zraP* and *zraS* and the *luxCDABE* genes. The induction profile of PzraP::lux in response to antimicrobials at subinhibitory concentrations was analyzed. The expression of *zraP* is induced 2- to 3-fold in the presence of benzethonium chloride, mecillinam, polymyxin B, tetracycline and lomefloxacin compared to the control condition (Fig. 1b). The expression of *zraS* was induced by the same compounds as *zraP*. To note, the fold change of induction was less pronounced with *zraS* as previously observed using Zn as an inducer [18]. As a control, we used cephalothin; the *zra* mutants were not more sentitive to this compound. In this case, the expression of *zraP* or *zraS* was not induced and was similar to the control condition. These results demonstrate that the expression of the system is induced by antimicrobials to which the mutants are more sensitive, underlying the function of ZraPSR in response to these antimicrobials.

Impact of the Zra mutations on environmental stress survival

The Biolog chemical phenotyping, as well as the *in vivo* assays, highlighted the susceptibility of the *zra* mutants to several chemicals, mainly to those targeting the envelope. To investigate a more general function of the Zra system in stress survival, *zra* mutants were tested under environmental stresses that *E. coli* may encounter during its lifecycle and that affect the envelope. The conditions tested were acidic pH, bile salts, indole, oxidative stress and osmotic stress. The deletion of *zraP* significantly altered the survival of bacterial grown under acidic pH in the presence of bile salts or after an osmotic choc with NaCl (Table 2), while the deletion of *zraR* only conferred sensitivity to acidic pH and osmotic shock (Table 2).

ZraP-SR are important for membrane integrity in the presence of membrane-targeting biocides

Because of its similarity with CpxP-AR, ZraP-SR was predicted to be an ESR. To assess if the *zra* mutants show defects in membrane integrity, we used the Live/Dead assay. This kit utilizes a mixture of SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain and the red-fluorescent nucleic acid stain, propidium iodide (LIVE/DEAD™ *Bac*Light™; Thermo Fisher Scientific). With SYTO 9, all bacteria display green fluorescence, whereas propidium iodide penetrates only bacteria with damaged membranes, which display red fluorescence. In the

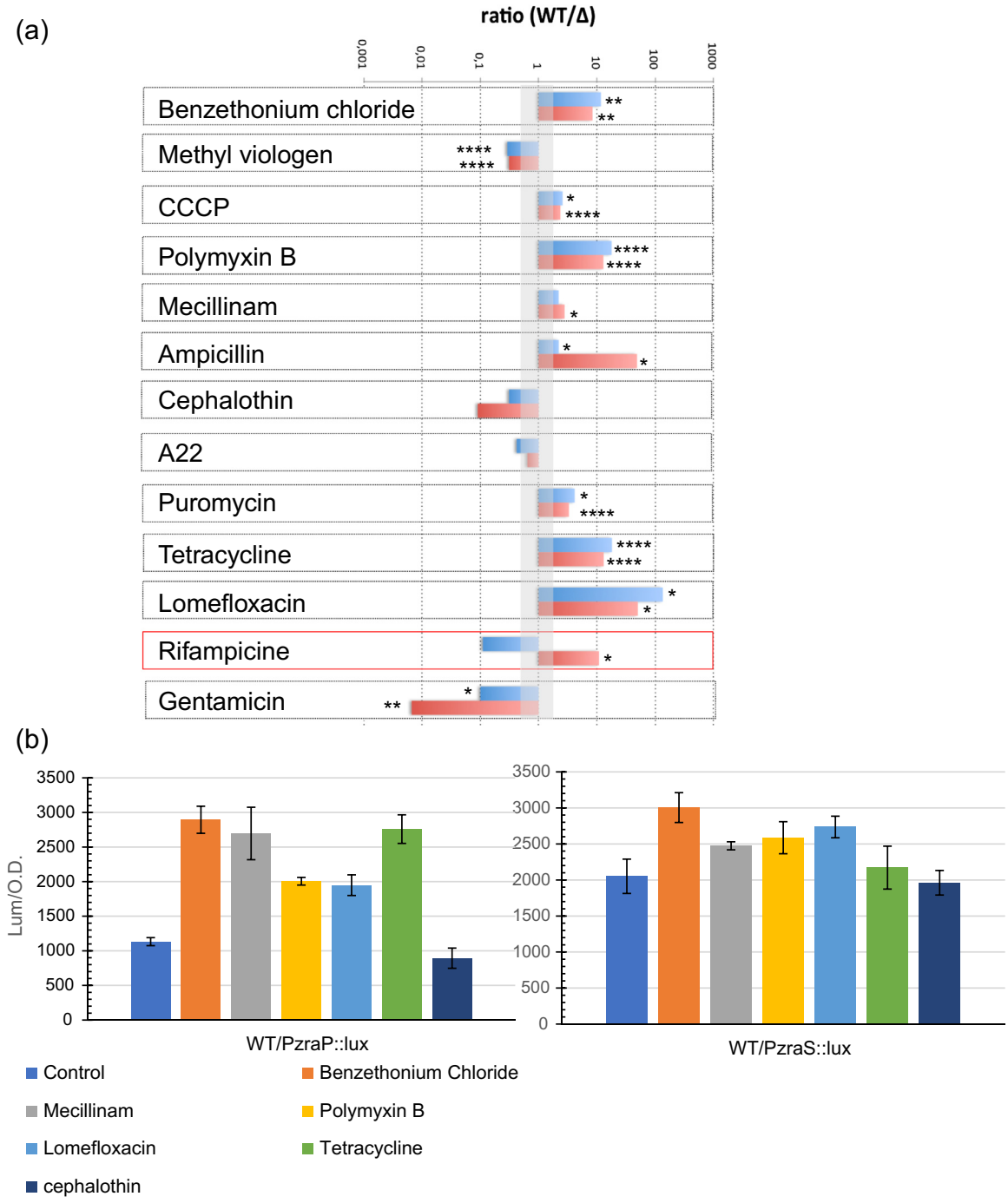


Fig. 1. Impact of *zraP* or *zraR* deletion on resistance to several antibiotics. (a) Relative survival rate of the Δ*zraP* (in blue) or Δ*zraR* (in red) mutants, compared to the wild-type strain. *Denotes significant difference; *$p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ***$p \leq 0.001$; ****$p \leq 0.0001$, Student's *t* test. (b) Expression of PzraP::lux (left) or PzraS::lux (right) gene fusions in the presence of different compounds. The values represent the maximum of fluorescence over OD 600 nm recorded in LB medium at 37 °C.

Table 2. Sensitivity of the *zraP* and *zraR* mutants to environmental stresses

Condition	Stress	Survival ratio (WT/Δ*zraP*)	Survival ratio (WT/Δ*zraR*)
Malic acid	pH	8.97****	8.20***
Bile salts	Membrane	2.42*	1.01
Indole	Membrane	1.44 ns	1.46
H_20_2	Oxidative	1.05 ns	1.21
NaCl	Osmotic	1.60*	1.78*

The following concentrations were used: 33 mM malic acid, 0.05% bile salts, 3 mM indole, 1.5 mM H_2O_2, and 500 mM NaCl. Survival (%) = CFU (colony-forming units) of surviving cells/CFU of non-challenged cells. Survival ratio of the mutant (Δ*zraP* or Δ*zraR*) was calculated as the ratio of survival percentages (WT/mutant).
*Denotes significant difference; *$p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ***$p \leq 0.001$; ****$p \leq 0.0001$; (n.s.) = non significative ($p > 0.05$), Student's t test.

absence of stress, the Δ*zraP* or Δ*zraR* cells showed no default in membrane integrity or in cell morphology as compared to the wild-type cells (Fig. 2A). Bacteria were incubated for 1 h with different drugs at sub-inhibitory concentrations. After treatment with the quaternary ammonium surfactant (cationic biocide) benzethonium chloride, the Δ*zraP* and Δ*zraR* mutants displayed significantly more red-labeled cells than wild type, showing that their membrane integrity was more affected (Fig. 2B). Upon exposure to polymyxin B, which disrupts the cell membranes, the Δ*zraP* and Δ*zraR* mutants also exhibited significantly more red-labeled cells (Fig. 2C). Next, we incubated the cells with mecillinam (adminocillin) a β-lactam antibiotic, an inhibitor of the peptidoglycan transpeptidase PBP2, which causes cell rounding. In this case, the bacteria (WT and mutants) were all stained green. As expected, all the cells were rounder than the untreated controls, but the mutant cells were even smaller and more spherical (see Fig. S4 for a magnification of the images). The average cell size (measured as the length between the two poles) in the control was 2.85 μm (±0.15) (Fig. 2D) whereas in the presence of mecillinam, the average size of the WT cells was 2.56 (±0.15) μm, that of the Δ*zraR* mutant was 2.19 (±0.09) μm and that of the Δ*zraP* mutant, 2.12 (±0.08) μm (Fig. 2D). For comparison, we used antibiotics that do not target the envelope but to which the Δ*zra* mutants are more susceptible. Accordingly, in the presence of tetracycline, which targets translation, few bacteria were labeled red and no significant differences were obtained between the Δ*zra* mutants and the wild-type strain. The results were similar to the control condition in the absence of an external drug (Fig. 2A–E).

As a conclusion, in the presence of drugs that target the envelope, the Δ*zra* mutants show enhanced membrane disruption and abnormal cell shape. This highlights the importance of the Zra system for envelope maintenance.

ZraP protects the cell from envelope stress via its inhibitory function of the system

We previously showed, *in vitro*, that ZraP displays chaperone activity [18], indicating that the ability of Zra to provide envelop maintenance and/or repair could reside in that activity. To test that hypothesis, the ability of ZraP to confer enhanced resistance to polymyxin B, independently to the activation of the genes regulated by ZraR, was assessed. For that purpose, ZraP was cloned in a pBad18 plasmid and transformed into WT and Δ*zraR* strains. Cells were grown in the presence of arabinose to the exponential phase to allow for ZraP expression before the addition of 2 μg/mL of polymyxin B. Induction of ZraP expression was monitored by Western blot (Fig. 3a). One hour after treatment, no significant differences were observed in survival rates between the cells expressing ZraP and the control cultures that did not contain arabinose (Fig. 3b). Because, the chaperon activity of ZraP is enhanced in the presence of zinc ions, 500 μM of Zn^{2+}, corresponding to a sub-inhibitory concentration [18], was added at the same time as the antibiotic. However, even in these conditions, no protecting effect of ZraP on the polymyxin B treatment was observed (Fig. 3b).

Next, we tested a series of previously characterized *zraP* mutants, H1A, ΔNter and ΔCter, cloned in a pUC plasmid. ΔNter and ΔCter mutants lack the first four and the last seven amino acids of the mature protein, respectively. While the three mutants were shown to be exported to the periplasm, they were all impaired in their signaling function [18]. The H1A and ΔNter mutants are defective in Zn^{2+} binding. The ΔCter mutant retains its ability to bind the metal ion and exhibits a chaperone activity comparable to that of the wild-type protein but is affected in it oligomerization state, the latter being responsible for the loss of its repressor activity. The mutated forms of ZraP were expressed in a Δ*zraP* strain challenged with polymyxin B (Fig. 3c). None of the *zraP* mutants were able to complement the defective strain. These results suggest that ZraP alone is not able to restore the intrinsic resistance to the envelop-targeting antibiotic only via its chaperon activity, and therefore, its participation to the cell protection arises mainly from its repressor function of the Zra system.

ZraR orchestrates a complex cellular network

As proposed above, ZraP is mainly a signaling partner of the response to drug and environmental stresses. It also contributes to maintain membrane integrity. These functions suggest that, in addition to *zraSR* and *zraP*, ZraR regulates genes involved in the cellular defense against stresses. To examine the ZraR regulon, we used a ChIP-Seq approach. First, we raised polyclonal antibodies against ZraR that are highly specific as shown by Western blot (Fig. S1).

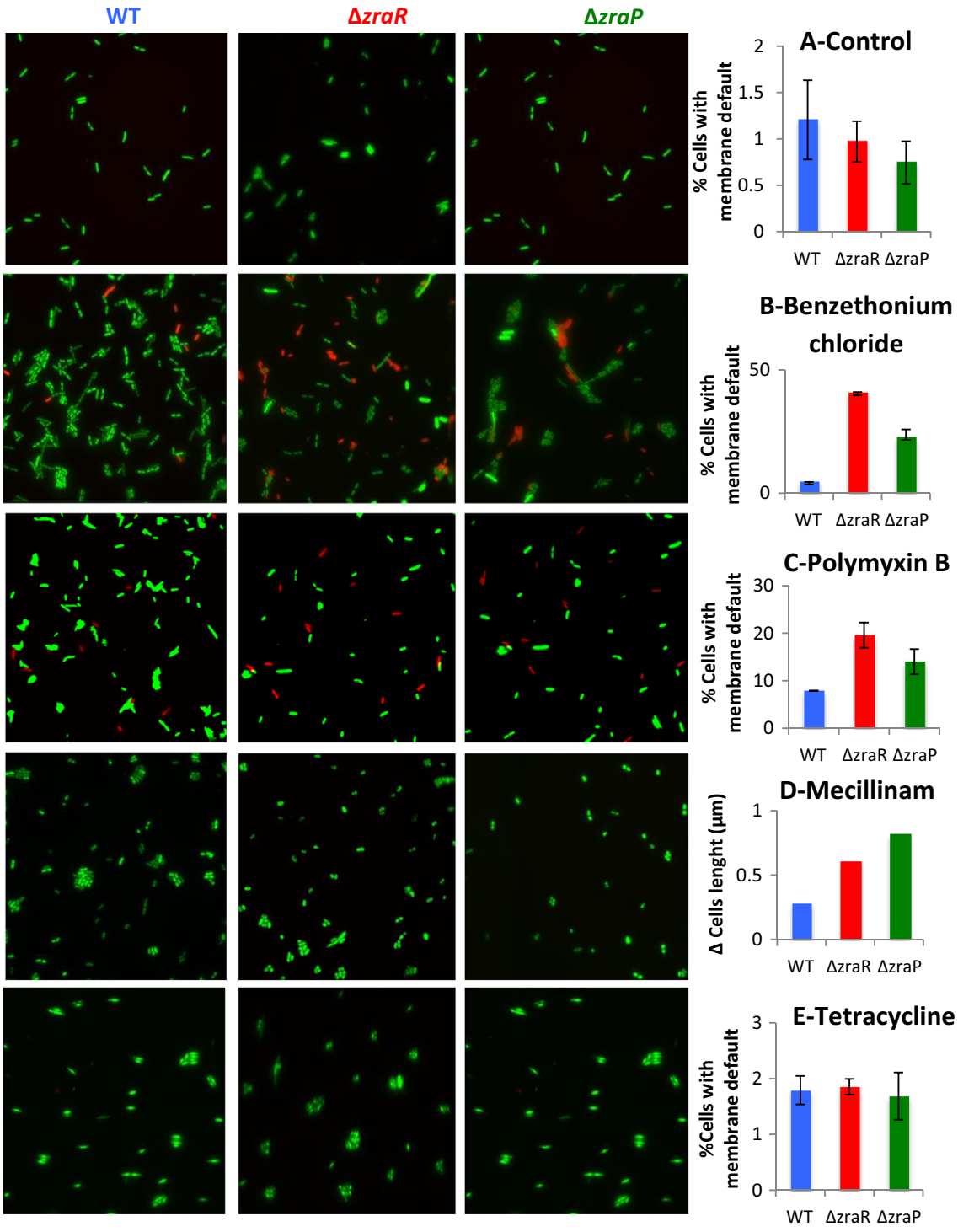


Fig. 2. The Zra system protects the cell envelope. Fluorescence microscopy of cells stained with Syto9 and propidium iodide after exposure to the mentioned drugs. The merged acquisition of both channels is displayed. More than 600 cells were counted. Representative fields are shown. Right panels (A-B-C-E): % = number of red cells/total number of cells. Right panel (D): the cell lengths were measured between the two poles, the difference with the control condition is shown.

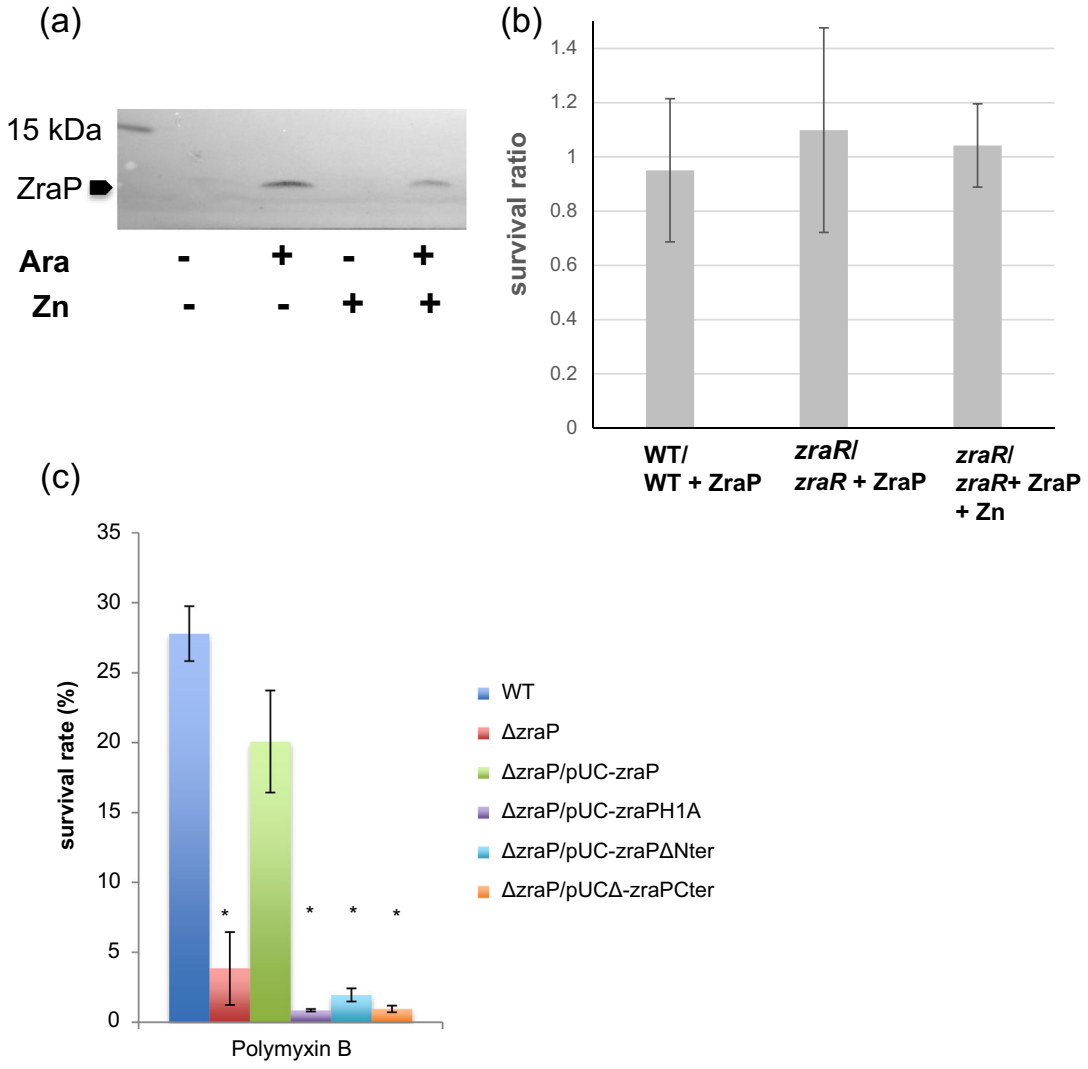


Fig. 3. ZraP alone is unable to restore cell survival under polymyxin B challenge. (a) Overexpression of ZraP from the pBAD plasmid was monitored in the Δ*zraR* strain by Western blot in the presence of Arabinose or Zn. (b) Survival ratio of the WT or the Δ*zraR* strains compared with the same strains overproducing ZraP (+ZraP), challenged with polymyxin B. Zn was added where mentioned. (c) Percentage of survival after 1-h exposure to 1 µg/ml polymyxin B. WT and mutant Δ*zraP* complemented by *zraP* variants (WT, ΔNter, H1A, ΔCter). *Denotes a significant difference compared to the wild-type strain ($p < 0.05$, Student's *t* test).

Next, we optimized the conditions of induction of the system by Zn^{2+}. For that purpose, we measured the activity of a transcriptional *zraP*::*lux* fusion and concluded that in LB medium the optimal induction was obtained with 500 µM $ZnSO_4$ (Fig. S1). Finally, the expression of ZraR was monitored during growth. ZraR was optimally expressed at $OD_{600\ nm}$ = 0.6 and was stably produced during both the exponential and stationary phase (OD = 1.5) (Fig. S1). Using these conditions, we mapped ZraR binding locations in the presence of Zn^{2+} using ChIP-Seq. As expected, the number of reads was enriched in the *zraP–zraSR* intergenic region in both biological replicates, with enrichments of 2.24- and 1.64-fold, respectively (Fig. S2, Table 3). Although these enrichment ratios are rather low for a region known to be regulated by ZraR, this threshold was applied to select genes potentially regulated by it. Second, only genes that have enrichment peaks located in their upstream region (Fig. S2) were considered as possibly regulated by ZraR. A total of 39 ZraR binding locations were identified using this approach (Table 3). The potential ZraR targets are involved in numerous cell functions: environmental stress response, metabolism, protein synthesis, motility and biofilm formation. ZraR is not only a response regulator of a two-component system but also a bEBP (bacterial enhancer binding protein) [22]. Because bEBPs are needed to activate sigma 54 factors, ZraR was predicted to activate the transcription of sigma 54-dependent genes [23]. However, the

Table 3. ChIP-Seq results

Gene	ChiP-Seq		Characteristics		
	Fold-change	-LOG10 (*p*-value)	Biological process	Product function	σ Factor[a]
zraP	2.24	586	Stress response	Chaperone and modulator of ZraSR	σ54
raiA	1.87	246		Ribosome stability	σ70
ssrA	2.16	444		Trans-translation	σ70
pnp	1.92	118		mRNA degradation	σ70
mdtL	1.66	59		Transporter Putative antibiotic resistance	Unknown
cspA	3.16	1293		Cold shock response	σ70
cspB	1.59	120		Cold shock response	σ54, σ70
rpoH	2.1	446		Sigma factor 32	σ70, σ54, σ24
sspA	1.95	117		Stringent starvation response	Unknown
yhhY	1.63	54		N-acetyltransferase	σ70
ryhB	1.62	72		Small regulatory RNA	σ70
acrE	1.58	49.47		Multidrug export protein	σ70
cpxP	1.66	131		Chaperone and modulator of CpxAR	
hokA	3.16	1293		Small toxic polypeptide	σ24
fau	2.71	950		5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	Unknown
rfaD	1.58	42	Membrane component	Heptose epimerase	Unknown
yhdW	1.50	45		Putative amino acid ABC-transporter	σ54
wecD	1.56	44		Synthesis of LPS O-antigen	σ70
metY	2.79	928	Cellular cycle	tARN	σ70
yrdD	1.69	164		Putative topoisomerase	Unknown
rsmG	1.82	78		rARN methyl transferase	σ70
rhO	1.82	92		Transcription termination factor	Unknown
rpsJ	1.7	181		Ribosomal protein	σ70
fliA	2.71	161	Motility	Sigma factor 28	σ28, σ70
crsB	2.22	188	Biofilm	Small regulatory RNA	σ70
gcvB	1.92	118	formation	Small regulatory RNA	σ70
bsmA	1.80	108		Biofilm peroxide resistance putative lipoprotein	σS
glnA	4.76	2926	Metabolism	Glutamine synthetase	σ54
tnaAB	1.59	123		Tryptophan transport and catabolism	σ70
glnH	1.71	86		glutamine transport	σ54
argG	2.79	928		Arginosuccinate synthetase	σ70
mtlD	1.55	46		Manitol dehydrogenase	σ70
ntrB	1.52	130		Sensory histidine kinase Nitrogen metabolism	σ54, σ70
exuR	1.68	64		Hexuronate regulon transcriptional repressor	σ32, σ70
gadW	1.51	39.4		Acid stress Transcriptional activator	Unknown
dcuB	1.73	72		C4 dicarboxylate transporter anaerobic respiration	σ70
tktA	1.64	36		transketolase	Unknown
yjjy	1.66	131	Unknown	Putative protein	σ70
bax	1.77	80		Conserved protein	σ70
yjeJ	1.57	46		Putative protein	σ32, σ70
fxsA	1.73	72		Suppressor of F exclusion of phage T7	σ32

[a] σ Factor: denotes the sigma factor known to control the gene, as deduced from literature and databases.

majority of the promoter regions of ZraR gene targets we screened are recognized by sigma 70 (Table 3). ZraR might thus not specifically control the expression of genes controlled by sigma 54.

Next, the level of expression of each target gene was analyzed. For that purpose, total RNAs were isolated from the wild-type and Δ*zraR* strains grown in the presence of Zn^{2+}, and mRNAs levels were quantified using RT-qPCR. The differential expression of each gene was tested; values are reported in Table 4. A total of 22 genes or operons showed significantly different expression between the two strains (Table 4). The expressions of *tnaA* and *tnaB*, coding for proteins that regulate the intracellular indole levels, were more expressed in the Δ*zraR* strains than in WT, indicating that ZraR down-regulates their expression. The same profile was found for *mdtL* that codes for an efflux pump. Conversely, the expression of other genes was reduced in the Δ*zraR* strain. The latter contribute among other functions to metabolism (*glnA*, *glnH*, *exuR*) or motility (*fliA*). Remarkably, the majority of the ZraR up-regulated genes code for effectors involved in

Table 4. Genes that are controlled by ZraR

Transcriptionnal unit	Product description/fonction	Fold-change	*p*-value
acrE	Multidrug export protein	2.55	0.0003
cpxP	Chaperone and modulator of CpxAR	2.62	0.0473
cspB	Cold shock protein	3.79	0.0447
exuR	Negative regulator of exu regulon	2.52	0.0079
fliA	Sigma factor 28	7.59	0.0001
gadW	Acid stress – transcriptional activator	2.58	0.0139
glnA	Glutamine synthetase	3.27	0.0324
glnH	Glutamine transport	2.65	0.0042
mdtE	Multidrug export protein	7	0.0450
mdtL	Transporter-putative antibiotic resistance	−3.95	0.0066
pnp	RNA processing	2.88	0.0387
raiA	Ribosome stability	3.99	0.0446
rfaD	Heptose epimerase	2.13	0.0363
rpoH	Sigma factor 32	3.6	0.0023
sspA	Stringent starvation response	3.05	0.0237
ssrA	Trans-translation	2.25	0.0229
tnaA ; tnaB	Tryptophan transport and indole production	−19.53; −49.87	0.0012 ; 0.0260
yhdW	Putative amino acid ABC transporter	10.45	0.0025
yhhy	N-acetyltransferase	2.11	0.0317
Yjjy	Putative protein	3.24	0.0423
yrdD	Putative topoisomerase	2.44	0.0307
zraP	Chaperone and modulator of ZraSR	35.67	0.0043

qRT-PCR results of the genes that are differentially expressed among those identified by ChIP-Seq. The fold change indicates the ratio of gene expression of strain WT to strain Δ*zraR*.

the response to physico-chemical stresses such as uv stress (*pnp*), thermal stress (*rpoH*, *cspB*), nutritive deficiency (*sspA*) and detoxification (*yhhY*). Some other genes can only be indirectly connected to the stress response because they are involved in essential cell functions. These are genes coding for chaperones (*cpxP*, *zraP*), a putative ABC transporter (*yhdW*), enzymes catalysing LPS synthesis (*rfaD)*, a protein involved in maintaining ribosome stability in stationary phase (*raiA*), a protein involved in trans-translation (*ssrA*), and a putative topoisomerase (*yrdD*). ZraR also controls regulatory proteins such as ExuR (catabolism of hexuronate), NtrB (nitrogen metabolism), FliA (sigma factor 28), RpoH (sigma factor 32), as well as small regulatory RNAs (*ryhB, crsB, gcvB*). Finally, genes of unknown function were also detected (*yjjy*, *yjeJ, fxsA*). We then tried to identify a consensus binding site in the promoter region of regulated genes. No sequence motif could be obtained with automated tools (e.g., MAST, GLAM), indicating that the ZraR regulator exhibits little sequence specificity. However, specific bioinformatic analysis of the validated regulatory regions (see Materials and Methods) provided a weak motif that appears with strong accuracy in a subset of regulated genes (Fig. S5). This low sequence specificity may be related to the observation that ZraR activates the transcription of both sigma 54 and sigma 70 promoters: this dual role involves different binding mechanisms, usual sequence motifs may be poorly suited to describe such versatility. Another possible explanation is that, like many dimeric transcription factors, ZraR recognizes and binds DNA regions with specific structural and mechanical properties, which are also poorly described by usual sequence motifs [24]. Even if the structure of the DNA–protein complex is not available, the central A/T tract is characteristic of flexible regions that could be bent by the protein. In addition, ZraR preferentially binds regions located between divergently oriented transcription units, which are known to accumulate negative supercoiling [25,26] and exhibit unusual DNA conformations. The mechanisms behind ZraR binding selectivity may thus involve DNA dynamical features rather than, or in addition to, the static genomic sequence.

To sum up, the global picture of the ZraR regulon (Fig. 4) highlights the complexity of the cellular response mediated by this transcriptional regulator.

Discussion

Previous works suggested that the ZraPSR system is involved in the ESR in *S. enterica* because the deletion of *zraP* increased its susceptibility to polymyxin B [17]. In addition, *E. coli* gene expression databases (//genexpdb.ou.edu) show that *zraPSR* genes are induced by a set of conditions that cause cellular stress [metals, (zinc, cadmium), antibiotics (rifampycin, bicyclomycin), metabolism (anaerobic, carbon monoxide), biofilm). Consequently, we decided to analyze the exact role of the ZraPSR system in response to extracellular stress.

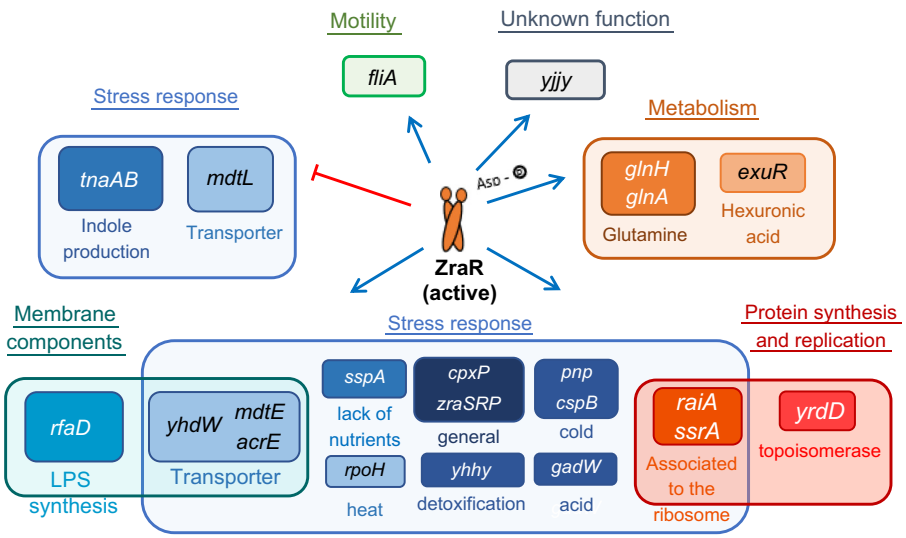


Fig. 4. The ZraR regulon. Genes regulated by ZraR were grouped into categories according to their cellular function.

Is ZraPSR a novel ESR?

The analysis of the ZraR regulon (Fig. 4) shows that the majority of ZraR-activated genes encode stress response proteins (chaperones, detoxification enzymes, stress response regulators, transporters). In addition to these elements, we note that ZraR activates the expression of important enzymes for the implementation of LPS (RafD). All these observations could explain the observed susceptibility phenotypes of Δ*zra* mutants to some antimicrobials targeting the envelope. The activation of repair and envelope synthesis genes by ZraR could contribute to recover cell equilibrium in the presence of stress. In addition, we have shown that ZraPSR helps maintaining envelop integrity. The Live-Dead microscopy experiments reveal that in the presence of antimicrobials (polymyxin B, benzethonium chloride) that cause a defect in membrane integrity, the Δ*zraR* and Δ*zraP* mutants have a more pronounced loss of membrane integrity than the WT strain (Fig. 2B–C). In addition, exposure to mecillinam, an inhibitor of cell wall polymerization which results in an abnormal cell shape, causes a defect of this process in the mutants (Fig. 2D). This result is evocative of the Cpx system. Indeed, CpxR mutants are more sensitive to mecillinam and other ß-lactams. It was shown that mecillinam induces the transcription of *cpxP* which results in cell protection, probably by inhibiting the activation of the system, since over-activation of CpxA abolishes the effect of *cpxP* and leads to aberrant cell shape. The fine control of the Cpx ESR is thus crucial to maintain cell wall homeostasis [27].

Response to antimicrobial agents

High-throughput screening using the Biolog technology showed that deletion of *zraP* resulted in a significant increase in susceptibility to five classes of biocides (Table 1). In agreement with the results of this work, which underscore the importance of the Zra system in antimicrobial resistance, it has been shown recently that ZraP is one of the overproduced proteins in the presence of the antimicrobial peptide magainin I [28]. More generally, we have shown that the deletion of genes coding for ZraSR also resulted in a significant increase in sensitivity to several antimicrobials (Fig. 1).

The phenotype of the *zraP* and *zraS* mutants toward drug susceptibility is qualitatively largely similar. This observation is counter-intuitive because ZraP has a repressive effect on ZraR activation by ZraS, although it agrees with published data on the Cpx system showing that both CpxP [17] and CpxR [19] deletion mutants have a reduced tolerance to polymyxin. In addition, deregulation of the CpxAR two-component systems is associated with excessive stress response. For instance, binding of mammalian PGRPs (peptidoglycan recognition proteins) activates CpxA–CpxR and kills bacteria by inducing membrane depolarization and reactive oxygen species production [29]. In addition, as mentioned above, fine tuning of CpxA is essential to maintain cell wall homeostasis [27]. This suggests that activation of the Cpx system must be tightly regulated to meet its protecting effect. Similarly, the feedback inhibition of ZraSR by ZraP may be necessary to counteract a sustained deleterious activation.

Conversely, as shown in Fig. 1a, the deletion of *zra* genes increases the resistance to methyl viologen and gentamicin. This may be explained by the fact that extra-cytoplasmic stress signaling systems are interconnected [4]. Thus, the deletion of *zra* could lead to over-activation of another specific system that increases the resistance. A similar observation was made in a Δ*cpxA* mutant in the presence of gentamicin [30]. Therefore, it would be interesting to measure the

expression of other ESRs under stressful conditions in a Δ*zraSR* context. The deletion of *zra* confers susceptibility to biocides targeting different cellular mechanisms: protein synthesis (tetracycline, puromycin), DNA synthesis (lomefloxacin) or structures of the bacterial envelope (benzethonium chloride, domiphen bromide, polymyxin B, ampicillin, mecillinam, amoxicillin). The demonstration that Zra has a role in antimicrobial resistance is reminiscent of other ESRs. Indeed, Psp, Bae, Cpx, Rcs and Cpx were shown to increase resistance to several antibiotics (ß-lactams, quinolones, antimicrobial peptides) and antimicrobials (bile salts, H_2O_2) (for a review, see Ref. [31]). In some cases, this antimicrobial resistance relies on the up-regulation of efflux pumps [31]. The characterization of the ZraR regulon shows that it up-regulates *mdtE* and *acrE* (Fig. 4), two multidrug exporters whose expression may encounter for the resistance to the antibiotics not involved in envelop stress response.

Specificity of the stress response

Although they share some inducing conditions, the main ESRs, Cpx, Rcs, Bae, Psp and sigmaE have quite distinct regulons [32]. The ZraR regulon shows little or no overlap with those of the above systems. ZraR up-regulates *raiA, fliA and cpxP* similarly to PspF, sigmaE, and CpxR, respectively. It also up-regulates *rpoH* and *sspA* like CpxR and sigmaE do (Fig. S3). Unexpectedly, despite its bEBP activator properties, ChIP-Seq and RT-qPCR results showed that ZraR can repress gene transcription. *tnaA* and *tnaB*, are among the most strongly regulated genes and are repressed by ZraR with a 20-fold and a 50-fold drop in expression, respectively, when comparing WT to the Δ*zraR* strain (Table 4). Strikingly, PspF, CpxR, sigma E and ZraR also down-regulate *tnaAB* genes. TnaB transports tryptophan from the medium to the cytoplasm where it is used by the enzyme TnaA to generate indole. This process is affected by temperature, pH and the presence of antibiotics [33]. Indole has been described as a signal molecule associated with several bacterial functions, including drug resistance [34]. In particular, it increases the expression of genes encoding the export systems *mdtAE, cusB, emrK* and *yceL*, via the activation of the Bae and Cpx systems [35]. Furthermore, indole induces the expression of the RpoE, Bae, Cpx, Psp and Zra systems [17,32]. Therefore, the repression of gene expression influencing its production could constitute a negative feedback. As a matter of fact, control of indole production is essential because at high extracellular concentrations (mM) it can inhibit cell growth and division in *E. coli* through its role as ionophore of H^+ ions [36]. ZraP activates *mdtE* expression, while it reduces the amount of indole by down-regulating *tnaAB*. It is possible that ZraR counteracts the reduction of the multidrug resistance protein expression due to the decrease of indole production, and fosters antibiotic resistance.

ZraPSR response mechanism

The genes of the ZraR regulon are also involved in replication and protein synthesis (Fig. 4). Consequently, the lack of the Zra system confers sensitivity to antimicrobial stresses targeting these mechanisms (Fig. 1a). Moreover, we show that the expressions of *zraS* and more strongly *zraP* are induced by compounds that target not only the envelope but also replication and protein synthesis (Fig. 1b). As mentioned above, other characterized ESRs also confer resistance to drugs that do not target the envelope. In the present study, we therefore propose that inhibiting translation or replication may be detrimental for maintaining the envelope integrity over time or during division. This effect may be more pronounced in the *zra* mutants.

Interestingly, the ExuR, RpoH, FliA, CspB and CspA regulators and the *ryhB, ssrA* and *gcvB* regulatory RNAs are found in the ZraR regulon (Table 3). It suggests that the ZraSR-mediated response mechanism may indirectly involves response effectors other than those evidenced by the ChIP-Seq experiment. It would be worth the effort to validate this hypothesis by carrying out a transcriptomic analysis. This would broaden our understanding of the system's contribution to intrinsic antimicrobial resistance in *E. coli*.

The characterization of ZraP as a chaperone [17] suggested that envelope stress causes this protein to participate in the prevention of protein aggregation. Elimination of the ZraP C-terminal domain involved in oligomerization impacted the survival of the cells upon polymyxin B treatment (Fig. 3). Although this protein retains the chaperone function *in vitro,* it is defective in the signaling function of the Zra system [17] (Fig. 3). These observations suggest that the function of ZraP, in the ESR response, is mainly to modulate the response of the system and that the response involves activation of the expression of other effectors of extracellular stress response by ZraR. In addition, we have shown that most of the Zra features are common with other ESR systems; it allows us to propose that the Zra system is a novel ESR conserved among Proteobacteria.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions

The strains used in this work are summarized in Table S1 (supplementary material) and are all derivatives of *E. coli* K-12. Bacterial cells were grown in LB medium or M63 minimal medium supplemented with 0.4% glucose. $ZnSO_4$ heptahydrate, 99.999% pure on trace metal basis, was purchased from Sigma-Aldrich. Antibiotics and drugs were purchased from Sigma-Aldrich. The plasmids used in this study are listed in Table S2.

Biolog PHENOTYPE MIcroArrays

The drug sensitivity profile of Δ*zraP* W3110 was determined using Biolog Phenotype MicroArrays (PMs 21–25). Each 96-well plate contains 24 different chemical agents at 4 different concentrations. These drugs are divided in eight groups based on their structure and function: anions, cations, cyclic compounds, organic compounds, membrane function compounds, chelators, antibiotics and nitrogen compounds. *E. coli* WT W3110 and Δ*zraP* W3110 cells were streaked on LB agar and were grown overnight at 37 °C. Individual colonies were picked up from the surface of agar plates by gently rubbing a sterile swab across the surface. Then cells were suspended in sterile inoculating fluid (IF, BiologTM) at a density corresponding to 85% transmittance in the Biolog turbidimeter. Then 100 µL of the bacterial inoculum was transferred into each well. Inoculated PM plates were placed in the OmniLog instrument for either 24 or 48 h at 37 °C. Bacterial growth was estimated by following tetrazolium dye reduction to colorimetrically monitor the respiration of cells. Data were automatically collected every 15 min.

Drugs susceptibility assay

To verify the results of chemical sensitivity performed with Biolog Phenotype MicroArrays, survival stress assays were performed. Each strain was inoculated in fresh LB medium and grown to an OD_{600} of 0.1 at 37 °C. The cultures were challenged with the indicated antibiotic at the concentrations listed in Table S3. Cells were incubated in microtubes at 37 °C, 550 rpm for 1 h and plated on LB plates overnight at 37 °C according to Ref. [17]. The survival percentage was calculated as follows: survival (%) = CFU (colony-forming units) of surviving cells/CFU of non-challenged cells. Relative survival rate of the mutant (Δ*zraP* or Δ*zraR*) was calculated as the ratio of survival percentage (WT/mutant).

Plasmid *pBad18–zraP* was obtained by subcloning the full length ORF of *zraP* in *pBad18* between the SacI and SalI restriction sites. *E. coli ΔzraR* W3110 containing *pBad18–zraP,* were grown over night in LB media with 34 µg/mL chloramphenicol. For inoculation, the pre-culture was diluted 100 times in fresh media and grown at 37 °C under 200 rpm agitation, in the presence or in the absence of 0.02% of arabinose, with or without 500 µM zinc. Polymyxins B (2 µg/mL) was added when cell reached an OD_{600} of 0.35 to 0.45. After 1 h of treatment, cells were diluted 10^2 to 10^5 times, and 10 µL was spotted twice for drop counting. Dilutions containing 5 to 30 cells were counted.

Environmental stress assays

Cells were grown until OD_{600} = 0.1 and then exposed to environmental stress in LB medium or in M63 sucrose for the condition with malic acid. The following concentrations were used: 33 mM malic acid, 0.05% bile salts, 3 mM indole, 1.5 mM H_20_2 and 500 mM NaCl. Cells were incubated under agitation in microtubes at 37 °C, 550 rpm, for 1 h and plated on LB agar plates. The number of bacteria was estimated after overnight incubation at 37 °C.

Microscopy imaging and analysis

Overnight cultures were diluted at 1:100 in fresh LB medium and grown to an $OD_{600\ nm}$ = 0.1 at 37 °C. Cell samples were then treated with either antibiotics (tetracycline 50 µg/mL, mecillinam 5 µg/mL, polymyxin B 0.25 µg/mL) or antimicrobial reagents (benzethonium chloride 0.002%) in the same conditions as the one used in the drug susceptibility assays. The ratios of dead cells after treatment were estimated using the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (ThermoFisher Scientific). Cells were stained with Syto9 and propidium iodide for 15 min and transferred to a slide mounted with 1% agarose in LB medium [37]. Conventional wide-field fluorescence microscopy imaging was carried out on an Eclipse Ti-E microscope (Nikon), equipped with ×100/1.45 oil Plan Apo Lambda phase objective, FLash4 V2 CMOS camera (Hamamatsu), and using NIS software for image acquisition. Acquisition settings were 10 ms for Syto9 and 10 ms for propidium iodide using 50% power of a FLuo LED Spectra X light source at 488- and 560-nm excitation wavelengths, respectively. Cell counting was performed using ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Luminescence assays

Reporter gene constructs were all introduced in the plux plasmid containing the *luxCDABE* genes from *Photorhabdus luminescens* and a p15A low-copy number origin of replication as described in Ref. [38]. The construction of pzraS::lux and pzraP::lux plasmids was described in Ref. [18]. The assays were conducted in 96-well plates. The wells were filled with 200 µL of LB medium supplemented with metals or antibiotics, inoculated with 10^6 bacteria harvested at $OD_{600\ nm}$ = 0.6. The plate was sealed using gas-permeable Breathe Easy membrane (Sigma Aldrich) and placed into a "TECAN Infinite Pro" plate-reader equilibrated at 37 °C and programmed to measure $OD_{600\ nm}$ and luminescence every 20 min, after a 1-min period of shaking, for 24 h.

Overproduction and purification of the ZraR protein

BL21(DE3) strain containing the pET-zraR plasmid was grown to mid-log phase in LB medium before addition of 1 mM IPTG to induce the expression of ZraR. After 2 h at 37 °C, cells were harvested by

centrifugation and frozen at – 80 °C. The cell pellet was resuspended in buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, Halt protease inhibitor (Thermo)] and lysed by three passages in a French press. The extract was clarified by centrifugation at 30,000*g* for 20 min. Sodium chloride was added at a concentration of 200 mM, and the suspension was stirred for 30 min on ice before centrifugation at 100,000*g* for 90 min to remove the membranes. Ammonium sulfate (20%) was added to the supernatant. Precipitated proteins were pelleted by centrifugation at 20,000*g* for 15 min and solubilized in buffer A. The supernatant was loaded into an anion-exchange chromatography HiTrap Q HP column (GE Healthcare). Proteins were eluted with a linear gradient of NaCl, from 0 to 1 L. The fractions containing ZraR (750 mM NaCl) were concentrated using 5-kDa cutoff Vivaspin 6 concentrators (Sartorius Stedim Biotech). The purity of ZraR was checked on 12% SDS-PAGE.

ChIP-Seq

The WT strain W3110 was grown at 37 °C in LB medium supplemented to an OD_{600} of 0.6. $ZnSO_4$ (500 μM) was added at the start of the culture. The cells were collected and cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 30 min with shaking, then quenched using 100 mM glycine for an additional 30 min of incubation at 4 °C. Chromatin immunoprecipitation assay was performed as described in Ref. [39]. Cells were lysed by sonication, and the supernatant was split into two samples. One sample was mixed with anti-ZraR antibodies to immunoprecipitate ZraR–DNA complexes (input sample), and the other was left untreated as a control. After overnight incubation at 4 °C, the samples were added to pre-washed agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) and incubated for 3 h at 4 °C on a rotating wheel. The samples were briefly centrifuged at 4000 rpm to precipitate agarose beads. Beads were then washed and resuspended in elution buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA and 1% SDS] prior to incubation at 65 °C overnight to reverse the cross-linking. DNA was purified with a PCR purification kit (Qiagen). Semi-quantitative PCR was carried out to assess the enrichment of the immunoprecipitated samples. The primers were designed to amplify *zraP_zraS* intergenic region as a positive control. DNA quality control, library preparation and sequencing were performed by the MGX platform. Library preparation was performed with TruSeq®ChIP Sample preparation kit with 5 ng of DNA. Samples were sequenced on Illumina Hiseq2500 in single reads. Reads were aligned to whole reference genome *E. coli* K12 W3110, accession number NC_007779, using BWA-backtrack software. ChIP peak identifications were performed using MACS2. Input samples were compared to the reference input controls. MACS2 calculate a *p*-value for each position of the genome using a dynamic Poisson law. Finally, the correction for multiple tests of Benjamini–Hochberg is used to estimate the false discovery rates. The most statistically significant peak calls at each genome position were then visually verified using the Artemis genome browser (Sanger Institute).

RNA extraction

Three independent cultures of WT W3110 and Δ*zraR* W3110 were grown at 37 °C in LB medium to an OD_{600} of 1. $ZnSO_4$ (500 μM) was added at the start of the culture. Cells were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using the frozen acid-phenol method as described in Ref. [40] and then treated with RNase-free DNaseI according to the manufacturer's recommendations (Ambion, USA). The absence of genomic DNA contamination was checked by PCR.

qRT-PCR analysis

cDNA was synthesized using random hexamers and REVERTAID H-RT reverse transcriptase (Thermofisher). qPCR was performed using the LightCycler® fast-start DNA masterplus SYBR Green I kit from Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Amplification and detection of the specific products were carried out with the LightCycler System; the programs used were as follows: denaturation (95 °C, 10 min), PCR (95 °C, 15 s; Tm*, 15 s, 72 °C, 20 s) ×45, and melting curve (95 °C, 1 s; 65 °C, 1 min; 65 °C to 95 °C at 0.11 °C/s). *Tm values were experimentally determined using direct PCR. Primers were designed using the method described in Ref. [41] and listed in Table S4. Data analysis was performed with the Lightcycler Relative Quantification software (Roche Applied Science). The *fabZ* gene was selected as a reference gene for data normalization. The expression of *fabZ* is constitutive and stable in the *zraR* deletion mutant. To estimate the effect of the *zraR* deletion on the expression of genes identified with ChIP-Seq, qPCR was conducted on at least three biological replicates of each strain. This experiment was carried out in triplicate. A *t*-test was computed to measure the significance associated with each differential expression value, and an error rate (*p*-value), measuring the risk of false predictions of differentially expressed genes, was associated with each tested gene. A gene expression value was decided to be biological significantly when the *p*-value was less than 0.05 and the expression ratio was ≥ 2.

Analysis of the promoter sequences

The sequence motif of the ZraR regulator was constructed as follows. Starting from the previously identified binding sequence of ZraR to the *zraS* promoter [42], we scanned the promoter regions of all genes where a direct regulatory effect was validated

(200 bp upstream of start codon) and located the sites with highest score. We observed that many of these sites exhibited A-tracts in the central region instead of a T-tract of the consensus (6 nucleotides), which is a typical signature of a flexible region involved in indirect readout by helix-turn-helix dimeric transcription factors [24]. Based on this observation, we modified the scanning algorithm to give an equal weight to A or T nucleotides in this central region. The resulting sites were filtered for a minimal log2-oddscore of 3.5, resulting in a binding site in the promoter region of 18 validated genes (Fig. S5). The sequence motif was constructed from these 18 putative binding sequences. This analysis was carried using the BiopPython package [43] and the WebLogo website [44].

Immunodetection of proteins

Polyclonal antibodies against ZraR were obtained from Covalab (Villeurbanne, France) by immunization of a rabbit with the purified protein. After migration on 12% SDS PAGE, the proteins were electrotransferred to a PVDF membrane. Anti-ZraR antibodies were used, at a dilution of 1:3000. The detection was performed by autoradiography using HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) and chemiluminescent Immobilon Western substrate (Millipore).

Acknowledgments

K.R. and C.B. were supported by a grant from French Ministry of Education and Research, R.T. was supported by a grant from Université Grenoble Alpes (IRS—2015). C.L and J.C were supported by the ATIP-avenir program in partnership with the FINOVI foundation. This work was supported by funds from CNRS and Université Lyon 1. We thank S. Meyer for its expert annotation of the consensus sequences. We thank J. Fontecilla-Camps for editing the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021.

Received 25 June 2018;
Received in revised form 24 September 2018;
Accepted 26 October 2018
Available online 30 October 2018

Keywords:
antibiotic;
zinc;
ChIP-seq

Abbreviations used:
ESR, envelope stress response; LPS, lipopolysaccharide; ChIp-Seq, chromatin immunoprecipitation followed by sequencing; bEBP, bacterial enhancer binding protein; TCS, two-component systems.

References

[1] S. Runkel, H.C. Wells, G. Rowley, Living with stress: a lesson from the enteric pathogen *Salmonella enterica*, Adv. Appl. Microbiol. 83 (2013) 87–144.
[2] G. Rowley, M. Spector, J. Kormanec, M. Roberts, Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens, Nat. Rev. Microbiol. 4 (2006) 383–394.
[3] T.L. Raivio, Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response, Biochim. Biophys. Acta 1843 (2014) 1529–1541.
[4] M. Grabowicz, T.J. Silhavy, Envelope stress responses: an interconnected safety net, Trends Biochem. Sci. 42 (2017) 232–242.
[5] G. Laloux, J.F. Collet, Major tom to ground control: how lipoproteins communicate extracytoplasmic stress to the decision center of the cell, J. Bacteriol. 199 (2017).
[6] D.M. MacRitchie, D.R. Buelow, N.L. Price, T.L. Raivio, Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems, Adv. Exp. Med. Biol. 631 (2008) 80–110.
[7] C.P. Zschiedrich, V. Keidel, H. Szurmant, Molecular mechanisms of two-component signal transduction, J. Mol. Biol. 428 (2016) 3752–3775.
[8] S. Hunke, R. Keller, V.S. Muller, Signal integration by the Cpx-envelope stress system, FEMS Microbiol. Lett. 326 (2012) 12–22.
[9] K. Otto, T.J. Silhavy, Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 2287–2292.
[10] M. Grabowicz, T.J. Silhavy, Redefining the essential trafficking pathway for outer membrane lipoproteins, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114 (2017) 4769–4774.
[11] T.L. Raivio, S.K. Leblanc, N.L. Price, The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity, J. Bacteriol. 195 (2013) 2755–2767.
[12] T.L. Raivio, D.L. Popkin, T.J. Silhavy, The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition, J. Bacteriol. 181 (1999) 5263–5272.
[13] X. Zhou, R. Keller, R. Volkmer, N. Krauss, P. Scheerer, S. Hunke, Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein, J. Biol. Chem. 286 (2011) 9805–9814.
[14] K. Tschauner, P. Hornschemeyer, V.S. Muller, S. Hunke, Dynamic interaction between the CpxA sensor kinase and the periplasmic accessory protein CpxP mediates signal recognition in *E. coli*, PLoS One 9 (2014), e107383.
[15] G.L. Thede, D.C. Arthur, R.A. Edwards, D.R. Buelow, J.L. Wong, T.L. Raivio, et al., Structure of the periplasmic stress response protein CpxP, J. Bacteriol. 193 (2011) 2149–2157.
[16] S. Quan, P. Koldewey, T. Tapley, N. Kirsch, K.M. Ruane, J. Pfizenmaier, et al., Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy, Nat. Struct. Mol. Biol. 18 (2011) 262–269.
[17] C. Appia-Ayme, A. Hall, E. Patrick, S. Rajadurai, T.A. Clarke, G. Rowley, ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a

repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR, Biochem. J. 442 (2012) 85–93.
[18] I. Petit-Hartlein, K. Rome, E. de Rosny, F. Molton, C. Duboc, E. Gueguen, et al., Biophysical and physiological characterization of ZraP from *Escherichia coli*, the periplasmic accessory protein of the atypical ZraSR two-component system, Biochem. J. 472 (2015) 205–216.
[19] B. Audrain, L. Ferrieres, A. Zairi, G. Soubigou, C. Dobson, J.Y. Coppee, et al., Induction of the Cpx envelope stress pathway contributes to *Escherichia coli* tolerance to antimicrobial peptides, Appl. Environ. Microbiol. 79 (2013) 7770–7779.
[20] M.W. Bader, W.W. Navarre, W. Shiau, H. Nikaido, J.G. Frye, M. McClelland, et al., Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides, Mol. Microbiol. 50 (2003) 219–230.
[21] B.R. Bochner, Global phenotypic characterization of bacteria, FEMS Microbiol. Rev. 33 (2009) 191–205.
[22] M. Bush, R. Dixon, The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of sigma54-dependent transcription, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76 (2012) 497–529.
[23] V. Shingler, Signal sensory systems that impact sigma(5)(4) -dependent transcription, FEMS Microbiol. Rev. 35 (2011) 425–440.
[24] J. Cevost, C. Vaillant, S. Meyer, B. Rost, ThreaDNA: predicting DNA mechanics' contribution to sequence selectivity of proteins along whole genomes, Bioinformatics 34 (2018) 609–616.
[25] M. Naughtin, Z. Haftek-Terreau, J. Xavier, S. Meyer, M. Silvain, Y. Jaszczyszyn, et al., DNA physical properties and nucleosome positions are major determinants of HIV-1 integrase selectivity, PLoS One 10 (2015), e0129427.
[26] S.A. Sevier, H. Levine, Properties of gene expression and chromatin structure with mechanically regulated elongation, Nucleic Acids Res. 46 (2018) 5924–5934.
[27] A. Delhaye, J.F. Collet, G. Laloux, Fine-tuning of the cpx envelope stress response is required for cell wall homeostasis in *Escherichia coli*, MBio 7 (2016) e00047-16.
[28] M.H. Cardoso, K.C. de Almeida, E.S. Candido, A.M. Murad, S. C. Dias, O.L. Franco, Comparative NanoUPLC-MS(E) analysis between magainin I-susceptible and -resistant *Escherichia coli* strains, Sci. Rep. 7 (2017) 4197.
[29] D.R. Kashyap, M. Wang, L.H. Liu, G.J. Boons, D. Gupta, R. Dziarski, Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems, Nat. Med. 17 (2011) 676–683.
[30] M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, J. Wierzbowski, G. Cottarel, J.J. Collins, Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death, Cell 135 (2008) 679–690.
[31] R.L. Guest, T.L. Raivio, Role of the Gram-negative envelope stress response in the presence of antimicrobial agents, Trends Microbiol. 24 (2016) 377–390.
[32] S. Bury-Mone, Y. Nomane, N. Reymond, R. Barbet, E. Jacquet, S. Imbeaud, et al., Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*, PLoS Genet. 5 (2009), e1000651.
[33] T.H. Han, J.H. Lee, M.H. Cho, T.K. Wood, J. Lee, Environmental factors affecting indole production in *Escherichia coli*, Res. Microbiol. 162 (2011) 108–116.
[34] J. Kim, W. Park, Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? J. Microbiol. 53 (2015) 421–428.
[35] H. Hirakawa, Y. Inazumi, T. Masaki, T. Hirata, A. Yamaguchi, Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*, Mol. Microbiol. 55 (2005) 1113–1126.
[36] C. Chimerel, C.M. Field, S. Pinero-Fernandez, U.F. Keyser, D.K. Summers, Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential, Biochim. Biophys. Acta 1818 (2012) 1590–1594.
[37] C. Lesterlin, N. Duabrry, Investigating bacterial chromosome architecture, Methods Mol. Biol. 1431 (2016) 61–72.
[38] J. Cayron, E. Prudent, C. Escoffier, E. Gueguen, M.A. Mandrand-Berthelot, D. Pignol, et al., Pushing the limits of nickel detection to nanomolar range using a set of engineered bioluminescent *Escherichia coli*, Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 24 (2017) 4–14.
[39] S.E. Davis, R.A. Mooney, E.I. Kanin, J. Grass, R. Landick, A. Z. Ansari, Mapping *E. coli* RNA polymerase and associated transcription factors and identifying promoters genome-wide, Methods Enzymol. 498 (2011) 449–471.
[40] M. Maes, E. Messens, Phenol as grinding material in RNA preparations, Nucleic Acids Res. 20 (1992) 4374.
[41] B. Thornton, C. Basu, P.C.R. Real-time, (qPCR) primer design using free online software, Biochem. Mol. Biol. Educ. 39 (2011) 145–154.
[42] S. Leonhartsberger, A. Huber, F. Lottspeich, A. Bock, The hydH/G genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system, J. Mol. Biol. 307 (2001) 93–105.
[43] P.J.A. Cock, T. Antao, J.T. Chang, B.A. Chapman, C.J. Cox, A. Dalke, et al., Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics, Bioinformatics 25 (2009) 1422–1423.
[44] G.E. Crooks, G. Hon, J.M. Chandonia, S.E. Brenner, WebLogo: a sequence logo generator, Genome Res. 14 (2004) 1188–1190.

Les bactéries sont exposées aux perturbations externes causées par les changements environnementaux ou la présence d'agents antibactériens nocifs. L'enveloppe bactérienne forme une barrière entre le milieu externe et l'intérieur de la cellule et se trouve donc potentiellement exposée aux dommages causés par les perturbations et forme la première ligne de défense pour les bactéries. Pour survivre à ces conditions, les bactéries ont développé des systèmes à deux composantes (TCS) qui détectent et permettent la réponse à ces stress.
Bien qu'ils soient associés à la protéine périplasmique ZraP, ZraSR constitue un de ces TCS. La présence de cette protéine accessoire associé au système ZraSR montre une homologie avec le système CpxPAR qui capte un grand nombre de stress d'enveloppe. Le système Zra est activé en présence de zinc et cause l'expression de *zraP*, *zraS* et *zraR*. Les protéines ZraP et ZraR ont été étudiées mais aucun travail n'a encore impliqué l'étude de la protéine membranaire ZraS et son mécanisme d'activation. En effet, l'étude des senseurs de TCS s'est beaucoup focalisée sur la compréhension de la partie cytoplasmique mais très peu sur le domaine périplasmique. Dans le cas du système Zra, il y a encore des interrogations sur l'activation ainsi que la régulation de ce système. Lors de ma thèse j'ai concentré mes recherches sur le domaine périplasmique de ZraS. Nous avons d'abord voulu comprendre comment le zinc active le système Zra mais aussi par quel moyen la protéine ZraP influe sur cette activation par le zinc. Pour cela, la caractérisation biochimique du domaine périplasmique de ZraS a été effectué et l'effet du zinc sur ce domaine a été observé. De ce fait, nous avons aussi tenté de déterminer quels sont les résidus de ce domaine qui permettent la liaison du zinc. Par une approche *in vivo* et *in vitro*, nous avons voulu comprendre le rôle régulateur de ZraP sur le système Zra. Ce travail s'inscrit dans l'objectif de mieux comprendre les différents mécanismes d'activation des différents systèmes de réponse aux stress bactériens.

Bacteria are exposed to external perturbations due to environmental changes or to the presence of noxious agents. Because the bacterial cell envelope forms the barrier between the inside and the outside of the cell, it is highly susceptible to be damaged by these perturbations but it is also the first line of defense. To survive gram-negative bacteria have developed two component systems (TCS) that detect and respond to these envelope stresses.
ZraSR is one of these TCS, although it is atypical because associated with ZraP, a periplasmic protein. The presence of an accessory protein associated with ZraSR system shows that it is functionally homologous to the CpxPAR system, a sensor of a variety of envelope stress signals. In presence of zinc, Zra system is activated and allows the expression of zraP, zraS and zraR. The periplasmic protein ZraP and the response regulator ZraR have been studied but the activation of the membrane histidine kinase by zinc has not been studied yet. Indeed, studying of TCS sensors was focused on the understanding of the cytoplasmic domain and less on the periplasmic part. During my thesis, I tried to concentrate my study on the periplasmic domain of ZraS. We first tried to understand how the zinc is activating the Zra system but also how ZraP is regulating this activation. For that purpose, we characterized ZraS periplasmic domain and analyzed the effect of zinc binding on it. Hence, we also tried to identify all of ZraS residues that are coordinating the zinc. By combining *in vitro* and *in vivo* assays, we tried to determine ZraP role in the regulation of Zra system. This study could help for the understanding of the mechanisms important for the activation of bacterial stress response systems.