



**Etude des interactions entre trois types de
nanoparticules métalliques et une bactérie du sol,
*Bacillus subtilis***

Elise Eymard- Vernain

► **To cite this version:**

Elise Eymard- Vernain. Etude des interactions entre trois types de nanoparticules métalliques et une bactérie du sol, *Bacillus subtilis*. Microbiologie et Parasitologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV065 . tel-02063178

HAL Id: tel-02063178

<https://theses.hal.science/tel-02063178v1>

Submitted on 11 Mar 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

« **Elise EYMARD-VERNAIN** »

Thèse dirigée par **Dr Cécile LELONG, UGA**
et par **Dr Géraldine SARRET, UGA**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (CEA/Grenoble/BIG)** et de **l'Institut des Sciences de la Terre (Grenoble)**
dans **l'École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

Etude des interactions entre trois types de nanoparticules métalliques et une bactérie du sol, *Bacillus subtilis*.

Thèse soutenue publiquement le « **10 novembre 2017** »,
devant le jury composé de :

Pr Christophe DEN AUWER

Professeur à l'Université Nice Sophia Antipolis, Rapporteur

Dr Etienne DERVYN

Chargé de recherche INRA, Institut Micalis, Jouy en Josas, Rapporteur

Dr Marie CARRIERE

Directeur de recherche au CEA-Grenoble, Membre

Dr Cécile LELONG

Maitre de conférences à l'Université Grenoble Alpes, Directrice de thèse

Dr Géraldine SARRET

Directeur de recherche CNRS, Directrice de thèse

Dr Michel HEBRAUD

Directeur de recherche, INRA, Saint-Genès-Champanelle, Président du jury



A mes parents.
A mon mari.

Remerciements

Ce mémoire marque l'aboutissement de ces trois années passionnantes de thèse, qui auraient été bien fades sans la participation de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Tout d'abord je souhaite remercier tous les membres du jury, Christophe Den Auwer et Etienne Devryn pour avoir accepté d'être mes rapporteurs, Marie Carrière pour avoir accepté de venir examiner mes travaux et Michel Hebraud pour avoir présidé ce jury. Je souhaite remercier également les membres de mon comité de suivi de thèse Agnès Richaume et Françoise Rul, qui m'ont permis de faire avancer ma réflexion sur les résultats obtenus.

Je remercie le Labex Serenade pour son financement ainsi que tous ses membres pour leurs discussions lors des séminaires annuels.

Je souhaite remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer : Romain SOULAS ainsi que Benoît Gallet pour la microscopie, Castillo-Michel Hiram, Olivier Proux et Vanessa Tardillo Suarez pour les expériences au synchrotron, Yohann Couté et Annie Adrait pour la spectrométrie de masse et également Delphine Boutry qui m'a permis de participer à l'élaboration de mon premier brevet.

Je remercie Claude SENEBIER ainsi que Christelle ALDOUÏT pour leur efficacité dans les démarches administratives, pas toujours très simples, voir jamais simples ☺, entre ce qu'impose le CEA ainsi que la fac.

Je remercie mes deux directrices pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement Cécile Lelong qui m'a fait découvrir la recherche et plus particulièrement la microbiologie en 3^{ème} année de licence, qui fut une révélation pour moi. Un immense merci pour son encadrement, pour ses nombreux conseils, pour sa disponibilité ainsi que pour son soutien au quotidien. Je la remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé suffisamment d'autonomie pour gérer ces recherches. Notre rapport très amical et chaleureux m'a apporté un soutien bien plus que professionnel durant ma thèse et qui va désormais beaucoup me manquer. Tu es une encadrante vraiment exceptionnelle. Je remercie également ma co-directrice Géraldine Sarret qui m'a permis d'étendre mes connaissances hors de mon

domaine de formation, je la remercie pour son encadrement ainsi que ses nombreux conseils.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir au sein d'ISTerre, je tiens tout particulièrement à remercier Sarah Bureau de m'avoir aidé lors de mes expériences d'ICP dont la mise au point n'a pas toujours été évidente ;), je la remercie pour sa gentillesse ainsi que pour ses nombreux services. Un grand merci à Ana Pradas Del PRES pour son investissement hors norme lors de mes expériences au synchrotron, pour sa présence et son soutien de nuit comme de jour 😊.

Merci également à tous les membres du LCBM, en particulier à Mireille Chevallet pour son aide lors nos expériences d'ICP. Un grand merci à tous les membres de ProMD ; à Serge Candéias, à Isabelle TESTARD ainsi qu'à Véronique Collin-Faure pour leur sympathie au quotidien. Merci également à Catherine Aude-Garcia ainsi qu'à Babeth Chartier-Garcia pour leur gentillesse et leurs encouragements durant la pause repas bien méritée 😊. Je tenais tout particulièrement à remercier Bastien Dalzon, il est toujours plus facile de se confier à quelqu'un qui est dans la même situation, merci pour ta présence ainsi que pour ton soutien.

Un grand merci à Thierry Rabilloud pour m'avoir accueilli dans son équipe depuis mon stage de licence. Merci pour ses nombreux conseils avisés ainsi que sa bonne humeur, mais également pour les nombreuses pauses gourmandises 😊. Un immense merci pour son côté paternel, pour sa capacité à détecter mes moments de doutes même si je faisais tout pour les cacher 😊. Merci d'avoir toujours eu les bons mots pour me redonner confiance en moi dans les moments difficiles.

Un immense merci à Sylvie Luche, ma colocataire de bureau 😊, mais surtout une amie. Merci pour sa présence, pour nos fous-rires, pour tous ces bons moments passés, pour son soutien professionnel comme personnel. Un immense merci pour avoir su déclencher la sonnette d'alarme dans mes moments de doutes 😊 et pour avoir su détendre l'atmosphère quand je prenais trop les choses à cœur. Merci d'avoir été là, tout simplement.

Merci à mes amis qui m'ont soutenu durant ces trois années de thèse, je remercie Kevin Bronda pour m'avoir sorti du laboratoire lors de nos pauses repas. Merci à Magali FIDON pour son écoute ainsi que pour ses conseils et son soutien. Je souhaite remercier également Anaïs Courtier, ma copine de

bus qui est devenue bien plus lors de ces trois années 😊, merci pour sa présence ainsi que pour ses nombreuses corrections 😊.

Je tiens à remercier du fond du cœur ma famille. Je remercie mon frère pour son soutien ainsi que son aide lors de la dernière ligne droite, durant la rédaction de ce mémoire. Merci à mon papa ainsi qu'à ma maman pour leurs encouragements, pour avoir toujours cru en moi pendant cette thèse, mais surtout tout au long de ma scolarité. Merci d'avoir tout fait pour que je puisse réaliser mes rêves, même si cela n'a pas toujours été facile durant les dix dernières années, avec les heures passées à me faire réciter mes devoirs, du vrai charabia pour vous par moment 😊 et mes nuits d'insomnie insupportables la veille d'un contrôle 😊. Une chose est sûre je n'en serais pas là aujourd'hui sans vous deux ... Merci d'être des parents aussi parfaits !

Pour terminer, je souhaite remercier Frederic Louis mon conjoint qui est devenu mon mari lors de ma troisième année de thèse ! Que dire... son soutien, sa patience et surtout son amour fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir soutenue durant ces 8 années, de m'avoir donné confiance en moi, même si cela n'a pas toujours été facile. Merci de m'avoir attendue toutes ces années 😊 et d'avoir su me faire sortir la tête du travail lorsque j'étais à bout. Un immense merci pour la personne que tu es.

Résumé

Les nanoparticules métalliques sont utilisées dans une large gamme de produits, ce qui a pour conséquence un rejet croissant de ces nanoparticules et de leurs produits secondaires dans l'environnement. Il est donc nécessaire d'évaluer leur devenir et leurs impacts dans l'environnement. Les bactéries constituent l'une des premières cibles des nanoparticules. La plupart des études se limitent à des analyses de mortalité et ne prennent pas en compte les transformations des nanoparticules dans l'environnement. Cette étude se concentre sur un modèle bactérien, *Bacillus subtilis*, dont les biotopes principaux incluent la rhizosphère du sol et le tractus gastro intestinal, et sur trois nanoparticules : Ag-NPs, ZnO-NPs et TiO₂-NPs. Nous évaluons d'une part l'impact des nanoparticules sur le métabolisme de *Bacillus subtilis*, et d'autre part celui de l'activité bactérienne et en particulier des molécules sécrétées par *Bacillus subtilis* sur les nanoparticules, les deux étant interdépendants.

Abstract

Metallic nanoparticles are used in variety of consumer products (solar screen, paint or medicine), which results in an increasing release of nanoparticles in the environment. There is a need of better evaluating their fate and impacts in the environment. Microorganisms are one of the first targets of nanoparticles in the environment. Most studies on microorganisms and bacteria have focused on cellular mortality, and did not take into account possible transformations of NPs in the environment, which modify their toxicity. This study is focused on model bacteria, *Bacillus subtilis* and three nanoparticles: Ag-NPs, ZnO-NPs and TiO₂-NPs. We evaluate on one hand the impact of nanoparticles on the metabolism on the metabolism of *Bacillus subtilis*, and on the other hand the impact of *Bacillus subtilis* and of its secretome on the nanoparticles, both being mutually dependent.

Sommaire

Sommaire	11
Table des Figures	15
Principales abréviations	17
Introduction Générale.....	21
 Synthèse Bibliographique.....	 25
 Partie 1 : Les nanomatériaux : enjeux, propriétés et impact sur l'environnement.....	 27
1. Définitions	27
2. Un marché en plein essor	29
3. Les nanoparticules : Propriétés et applications.....	33
3.1 Les nanoparticules de TiO ₂	33
3.2 Les nanoparticules de ZnO.....	35
3.3 Les nanoparticules d'argent	36
4. Le cycle de vie des nanoparticules et le rejet dans l'environnement.....	37
5. Le devenir des nanoparticules dans l'environnement.....	41
5.1 Agrégation/agglomération.....	41
5.2 Charge de surface.....	43
5.3 Forme de la nanoparticule.....	44
5.4 Dissolution	44
5.5 Changement de spéciation des Ag-NPs et ZnO-NPs	45
5.6 Changement de spéciation des ZnO-NPs.....	50
5.7 Interactions avec des biomolécules	50
6. Choix du modèle bactérien : <i>Bacillus subtilis</i>	53
7. Le poly-γ-glutamate-interaction biologique	57

7.1	Définition et propriétés biologiques	57
7.2	Mécanisme de synthèse du γ -PGA.....	59
7.3	Production et application du γ -PGA en industrie.....	63

Partie 2 : Effets des nanoparticules sur *Bacillus subtilis* 65

1.	Effets antibactériens des nanoparticules	66
1.1	Rôles des ions métalliques libérés par les NPs sur l'activité antibactérienne.....	67
1.2	Génération de ROS et perméabilité membranaire	68
1.3	Interaction des nanoparticules d'argent avec la membrane, les protéines et l'ADN ...	70
2.	Réponse cellulaire de <i>Bacillus subtilis</i> à un stress aux nanoparticules.....	73
2.1	Le stress Oxydant.....	73
2.2	Modifications du métabolisme central du carbone.....	77
2.3	La réponse stringente	85
2.4	La compétence génétique et la sporulation	91

Matériels et Méthodes.....103

Partie 1 : Caractérisation physico-chimique des nanoparticules et internalisation. 104

1.	Taille et diamètre hydrodynamique	104
1.1	Définition	104
1.2	Outils de mesures : TEM et DLS	105
2.	Agglomération et agrégation	106
3.	Composition chimique et spéciation.....	108
3.1	TEM/EDX.....	108
3.2	NanoXRF	111
3.3	Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS).....	112
4.	Détection et/ou quantification des nanoparticules intracellulaires.....	114

Partie 2 : Approche protéomique de la réponse au stress par *Bacillus subtilis* 115

1. Protéomique définition.....	115
2. Stratégie	116
2.1 Préparation de l'échantillon	117
2.2 Séparation protéique	117
2.3 Identification protéique par spectrométrie de masse	119
Résultats et Discussions	125
Partie 1 : Effets de <i>Bacillus subtilis</i> sur la biodisponibilité des nanoparticules d'argent.....	127
1. Impact de <i>Bacillus subtilis</i> ainsi que son sécrétome sur le devenir des nanoparticules d'argent	129
1.1 Introduction	129
1.2 Article 1.....	131
1.3 Conclusion.....	162
2. Interaction entre les molécules sécrétées par <i>Bacillus subtilis</i> et les nanoparticules d'argent	163
2.1 Introduction	163
2.2 Article 2.....	165
2.3 Conclusion.....	188
Partie 2 : Effets des nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc sur <i>Bacillus subtilis</i>	191
1. Induction de la réponse stringente et réorientation du métabolisme de <i>Bacillus subtilis</i> après un stress aux nanoparticules ZnO	193
1.1 Introduction	193
1.2 Article 3.....	195
1.3 Conclusion.....	227
2. Effet des nanoparticules sur la compétence chez <i>Bacillus subtilis</i> : Impact des nanoparticules sur le transfert horizontal des gènes.....	229

2.1	<i>Introduction</i>	229
2.2	<i>Article 4</i>	231
2.3	<i>Conclusion</i>	250
Discussions et perspectives		253
1.	<i>Discussion méthodologique</i>	254
1.1	<i>A propos des nanoparticules</i>	254
1.2	<i>A propos des concentrations et des modalités d'exposition aux nanoparticules</i>	254
1.3.	<i>A propos des techniques utilisées</i>	256
2.	<i>Discussion Générale sur les résultats</i>	259
2.1	<i>Effets de Bacillus subtilis sur la biodisponibilité des nanoparticules d'argent</i>	259
2.2	<i>Effets des nanoparticules de TiO₂-NPs et de ZnO-NPs sur Bacillus subtilis</i>	263
Conclusion Générale et perspectives		271
Références bibliographiques		277
Annexes		305
1.	<i>Annexe 1 : Article 3, format publication</i>	307
2.	<i>Annexe 2 : Principe de l'ICP-AES</i>	319
3.	<i>Annexe 3 : Communications scientifiques</i>	321
4.	<i>Annexe 4 : Poster de la conférence Bacilli Gram+ 2017</i>	323
5.	<i>Annexe 5 : Poster de la conférence Nanosafe 2016</i>	325
6.	<i>Annexe 6 : Poster de la conférence Bacilli Gram+ 2015</i>	327

Table des Figures

Figure 1 : Nombre total de produits répertoriés contenant des nanoparticules au cours du temps.....	29
Figure 2 : Distribution des produits contenant des nanoparticules en fonction de leurs domaines d'application	30
Figure 3 Nombre de produits répertoriés en mars 2015 en fonction de la région de production.	31
Figure 4: Composition revendiquée des nanomatériaux répertoriés en mars 2015.....	32
Figure 5 : Schéma de la structure cristallographique du TiO ₂	33
Figure 6 : Cycle de vie des nanomatériaux manufacturés rejetés dans l'environnement.....	37
Figure 7 : Rejet et répartition globale des nanomatériaux dans l'environnement en 2010 (en tonnes par an) suite à leur production et leur utilisation.	40
Figure 8 : Définition d'agglomération et d'agrégation.....	41
Figure 9 : Impact de la charge des nanoparticules d'argent sur la toxicité bactérienne.....	43
Figure 10 : Impact de la température et du pH sur la dissolution des nanoparticules d'argent.	44
Figure 11 : Eh-pH diagramme pour les systèmes Ag-S-Cl-H ₂ O.....	46
Figure 12 : Eh-pH diagramme pour les systèmes Ag-S-Cl-Cyst-H ₂ O.....	48
Figure 13 : Constante de solubilité entre 18 et 25°C de différents composés.	49
Figure 14 : Image prise par microscopie électronique de <i>Bacillus subtilis</i> en cours de division.....	53
Figure 15 : Différences entre les parois Gram ⁻ et Gram ⁺	54
Figure 16 : Vision schématique des interactions entre les racines des plantes et <i>Bacillus subtilis</i>	56
Figure 17 : La formule structurale du Poly-γ-glutamate.	57
Figure 18 : Modèle structural en hélice alpha proposé par Zanuy et Alemán.....	58
Figure 19 : Biosynthèse du PGA par <i>Bacillus subtilis</i>	59
Figure 20 : Mécanisme de polymérisation pour la fabrication du γ-PGA.	60
Figure 21 : Complexe protéique de polymérisation du γ-PGA.....	61
Figure 22 : Organisation génétique des gènes de production du γ-PGA.	61
Figure 23 : Les mécanismes antibactériens des nanoparticules.	66

Figure 24 : Les espèces réactives à l'oxygène.	69
Figure 25 : Formation de radical hydroxyle par les réactions d'Haber-Weiss (A) et de Fenton (B).	69
Figure 26 : La détoxification des ROS par la cellule.	74
Figure 27 : Détoxification de l'H ₂ O ₂ via les thiol peroxydases.	75
Figure 28 : Les trois voies du métabolisme du carbone chez <i>Bacillus subtilis</i>	79
Figure 29 : Voie des pentoses phosphates chez <i>Bacillus subtilis</i>	81
Figure 30 : Cycle de Krebs chez <i>Bacillus subtilis</i>	83
Figure 31 : Régulation du niveau basal de GTP par le (p)ppGpp.	86
Figure 32 : Les mécanismes d'actions du (p)ppGpp lors de la réponse stringente.	88
Figure 33 : Inactivation de CodY lors de la réponse stringente suite à l'inhibition du niveau basal de GTP par le (p)ppGpp.	89
Figure 34 : Cycle de sporulation chez <i>Bacillus subtilis</i>	92
Figure 35 : L'absorption d'ADN chez <i>Bacillus subtilis</i>	93
Figure 36 : Régulation de la sporulation chez <i>Bacillus subtilis</i>	95
Figure 37 : Régulation de la compétence chez <i>Bacillus subtilis</i>	98
Figure 38 : Diamètre des nanoparticules mesuré en TEM et DLS.	104
Figure 39 : Schéma représentatif de la mesure du diamètre hydrodynamique par DLS.	106
Figure 40 : Emission d'un photon X suite à l'excitation de l'atome.	109
Figure 41: Exemple d'un spectre EDX.	110
Figure 43 : Exemple de cartographie obtenue en NanoXRF.	111
Figure 45 : Schéma représentatif de la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.	118
Figure 46: Schéma des composants d'un spectromètre de masse.	119
Figure 47: Principe d'un analyseur, (A) quadripôle, (B) TOF, (C) piégeage d'ions.	121
Figure 48; Exemple d'interprétation d'un spectre MS/MS.	123
Figure 49: La chambre de nébulisation cyclonique.	319
Figure 50: Les différents états de la matière.	320

Principales abréviations

Acétyl-CoA	Acétyl-coenzymeA
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
app	A-peptide-perméase
B. S	<i>Bacillus subtilis</i>
BEPI	Branched polyethyleneimine
CSF	Competence and sporulation stimulating factor
DHAP	Dihydroxyacétone-phosphate
DLS	Dynamic light scattering
DW	Distilled water
EDX	Energy Dispersive X-ray
EPS	Extracellular polymeric substances
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
EU	Union européenne
EXAFS	Extended X-Ray Absorption fine structure
FAD	Flavin adenine dinucleotide
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
ICP	Inductively Coupled plasma
ICP-AES	Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
LB	Lysogeny Broth (milieu culture riche bactérien)
LDH	Lactate déshydrogénase

MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization
LCF	Linear combination fitting
MIC	Concentration minimale d'inhibition
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NanoXRF	Nano-X-ray fluorescence
NPs	Nanoparticules
O₂⁻	Ion superoxyde
OD ou DO	Densité optique
OH.	Radical d'hydroxyle
OH	Hydroxyle
opp	Oligo-Peptide-Perméase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PGA ou γ-PGA	Poly-γ-glutamate
(p)ppGpp	ppGpp et pppGpp
ppGpp	Guanosine tétraphosphate
pppGpp	Guanosine penta phosphate
PTS	Phosphotransférase
PVP	Polyvinylpyrrolidone
ROS	Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
SDS	Sodium dodecylsulfate
SN	Surnageant
SO₂H	Sulfonique
SO₃H	Sulfinique
SOD	Superoxyde dismutase
SOH	Acide sulfénique
STEM	Scanning transmission electron microscopy
TCA	Trichloroacetic acid
TEM	Transmission electron microscopy
TiO₂	Dioxyde de titane

TOF	Time-of-flight (analyseur de temps de vol)
UV	Ultraviolets
XANES	X-Ray Absorption Near Edge Structure
XAS	Spectroscopie d'absorption X
XRD	X-ray diffraction
XRF	X-ray fluorescence
ZnO	Oxyde de zinc

Introduction Générale

En raison des propriétés physiques, biologiques et chimiques des nanoparticules (NPs), cette dernière décennie est marquée par une augmentation de leur production et de leur utilisation dans l'industrie et la recherche. Les nanoparticules sont utilisées dans un très grand nombre de domaines d'application, comme les cosmétiques, le textile, les produits phyto-sanitaires, les aliments, les emballages, l'électronique ou encore la médecine. Les nanoparticules métalliques et d'oxydes métalliques ont des propriétés spécifiques qui justifient leur utilisation. Ainsi, les nanoparticules d'argent (Ag-NPs) et de cuivre (Cu-NPs) sont de puissants antibactériens ; les nanoparticules d'or sont très stables et peu toxiques, elles sont intéressantes en électronique et en nano-médecine, les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) et d'oxyde de zinc (ZnO) sont photo-catalytiques et absorbent les UV.

L'utilisation croissante des nanomatériaux soulève aujourd'hui de nombreuses questions, non seulement d'un point de vue toxicologique pour évaluer l'impact de l'exposition aux NPs sur l'homme, mais aussi d'un point de vue écotoxicologique pour ce qui concerne l'impact sur les écosystèmes. En effet, suite à leur utilisation, les nanoparticules sont rejetées dans l'environnement où leur devenir ainsi que leurs impacts sont mal connus. Concernant l'impact sur les communautés microbiennes des sols, les nombreuses études réalisées jusqu'à présent se limitent à des analyses de mortalité cellulaire, dans des conditions relativement éloignées des conditions environnementales (fortes doses, milieux simplifiés). Ces études révèlent tout de même un impact réel sur les communautés microbiennes suite à l'induction d'une mort cellulaire, essentiellement suite à l'induction d'un stress oxydatif. Cependant, les impacts et les mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité des nanoparticules, dans des conditions réalistes restent à élucider. Par ailleurs, ces études prennent rarement en compte les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules et leurs modifications dans l'environnement. En effet, compte tenu de leur réactivité physico-chimique, les nanoparticules vont interagir avec les composants des milieux naturels et donc être modifiées au cours de leur cycle de vie, depuis leur production (elles seront dites « intactes ») jusqu'à leur élimination ou fin de vie (elles seront dites « vieilles »). Nous savons par exemple que les NPs d'Ag présentes dans les eaux usées subissent une sulfuration lors du traitement des eaux (Kaegi et al. 2011), ce qui diminue leur solubilité et donc potentiellement leur toxicité. A l'inverse, une dissolution des NPs peut être observée et conduire à une exposition des organismes à des formes ioniques,

potentiellement toxiques. Ces transformations chimiques sont encore rarement prises en compte lors des études de toxicité, alors qu'elles conditionnent cette toxicité.

Compte tenu de tous ces éléments, cette thèse a pour but d'évaluer le devenir des nanoparticules lors d'une incubation avec une bactérie du sol, tout en évaluant la réponse de cette même bactérie à l'exposition aux nanoparticules. Pour cela nous avons choisi comme modèle bactérien *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* est une bactérie Gram ⁺, modèle dont les mécanismes généraux ainsi que les mécanismes de réponse au stress sont bien connus. Elle nous permettra donc d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité des nanoparticules. Ensuite, un des biotopes principaux de *Bacillus subtilis* est le sol, qui est, selon les modèles de flux, un compartiment majeur d'accumulation des nanoparticules, *via* les retombées atmosphériques, les eaux de ruissellement et l'épandage de boues des stations d'épuration. *Bacillus subtilis* est donc un des premiers organismes vivants à être exposé aux nanoparticules disséminées dans l'environnement. En plus de ces aspects, une particularité très intéressante de cette bactérie est sa capacité à sécréter de nombreuses molécules, telles que les lipoprotéines ou le poly- γ -glutamate, impliquées dans différents processus biologiques comme la résistance aux environnements hostiles. Cette particularité fait de *Bacillus subtilis* une bactérie essentielle pour la rhizosphère. Par exemple, elle est capable de protéger les plantes contre des infections *via* la sécrétion d'antibactériens et d'antifongiques (Vlamakis et al. 2013). Notre hypothèse de travail est que cette capacité de sécrétion de nombreuses molécules agit également sur le devenir des nanoparticules dans les sols.

Concernant les nanoparticules étudiées dans ces travaux, le choix s'est porté sur les nanoparticules d'argent (Ag-NPs), d'oxyde de zinc (ZnO-NPs) et de titane (TiO₂-NPs) en raison de leurs utilisations croissantes en industrie, de leur dissémination dans les sols, ainsi que de leurs propriétés antibactériennes. En effet, les nanoparticules de TiO₂ et d'oxyde de zinc font partie des nanoparticules industrielles les plus accumulées dans les sols, les nanoparticules d'argent sont quant à elles à des concentrations bien inférieures mais ont une activité antibactérienne très élevée.

La première partie de ce travail concerne l'impact de *Bacillus subtilis* ainsi que son sécrétome, sur les modifications physico-chimiques des nanoparticules. La seconde partie est

consacrée à l'impact des nanoparticules sur *Bacillus subtilis*. Afin d'aller le plus loin possible dans la compréhension des mécanismes, nous avons choisi un milieu de culture simplifié plutôt qu'un sol. Néanmoins, contrairement aux nombreuses études réalisées jusqu'à présent, les doses des nanoparticules appliquées ainsi que la phase de croissance bactérienne (phase stationnaire) ont été choisies pour être au plus proche des conditions environnementales. Les approches utilisées incluent la microscopie électronique, la spectroscopie d'absorption des rayons X, la chimie analytique (ICP-AES : Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry) et la DLS (dynamic light scattering) pour la caractérisation des nanoparticules, la protéomique et la biochimie pour l'étude des mécanismes de toxicité des nanoparticules.

Synthèse Bibliographique

Partie 1 : Les nanomatériaux : enjeux, propriétés et impact sur l'environnement

1. Définitions

Il existe de nombreuses définitions des nanomatériaux. La Commission Européenne en a proposé une en octobre 2011 dans le cadre d'une recommandation : "un nanomatériau est un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ". Parmi ces nanomatériaux, nous pouvons distinguer deux grandes familles : les matériaux nano-structurés et les nano-objets. Les matériaux nano-structurés sont des matériaux qui ont une structure de surface ou interne à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire inférieure à 100 nm. Les nano-objets sont quant à eux des matériaux qui ont une, deux ou trois dimensions externes nanométriques.

Concernant les nanoparticules (NPs), aucune définition unique n'existe à ce jour, la plus couramment retenue est la suivante : les nanoparticules sont des particules dont au moins une de leurs dimensions est inférieure à 100 nm. Il existe différentes sources de production de ces nanoparticules : les sources naturelles (incendie, éruption volcanique, érosion du sol), les sources « accidentelles » (chauffage au bois, gaz d'échappement, freinage...) et les sources industrielles (nanoparticules). Dans cette étude, nous nous focaliserons sur les nanoparticules manufacturées.

2. Un marché en plein essor

Les nanotechnologies permettent de manipuler la matière, atome par atome, de la fabriquer, ou d'en modifier ses propriétés chimiques, physiques et électroniques. Associées à des technologies existantes, les nanoparticules permettent d'améliorer leurs performances. L'utilisation des nanoparticules dans les produits de consommation est en plein essor. Au niveau mondial, en mars 2005, 54 produits contenant des nanoparticules ont été répertoriés, contre 1814 en mars 2015 (Vance et al. 2015). Le nombre de produits contenant des nanoparticules a donc été multiplié par 30 en 10 ans. Si cette tendance se poursuit, ce nombre pourra s'élever à plus de 4800 produits d'ici 2025 (Figure 1).

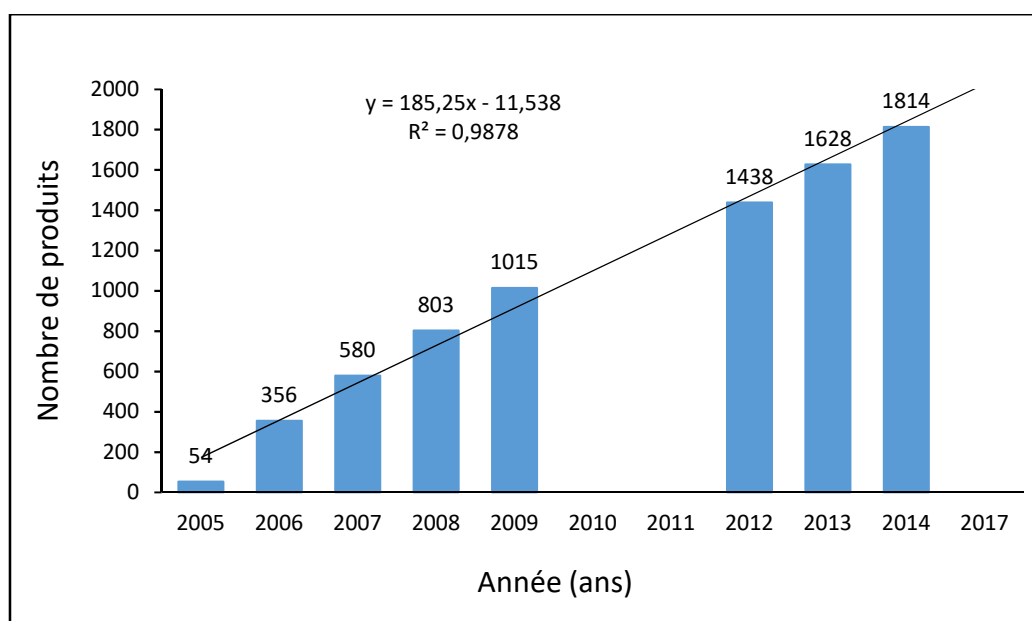


Figure 1 : Nombre total de produits répertoriés contenant des nanoparticules au cours du temps. (Adapté d'après (Vance et al. 2015)).

Ces différents produits peuvent être classés par application (Figure 2). Cette classification met en évidence une utilisation massive des nanoparticules en santé et bien-être. En effet, de nombreux produits en médecine (médicament, équipement chirurgical, pansement...), en cosmétique (crème, gel douche, dentifrice, crème solaire...) et en textile (chaussette, vêtement de sport...) contiennent des nanoparticules. Cependant, d'autres domaines d'application profitent de cette avancée majeure apportée par les nanoparticules, tels que l'électronique, l'automobile, l'électroménager et l'alimentation.

Les nanoparticules sont donc de plus en plus utilisées dans des domaines très variés. Notre exposition à celles-ci est donc croissante et se fait dès le plus jeune âge. En effet, des nanoparticules ont été retrouvées dans des produits pour enfant, tels que les jouets ou les biberons. Par exemple les TiO_2 -NPs sont largement utilisées dans les bonbons, ce qui fait des enfants la catégorie la plus exposée aux nano TiO_2 -NPs (Weir et al., 2012).

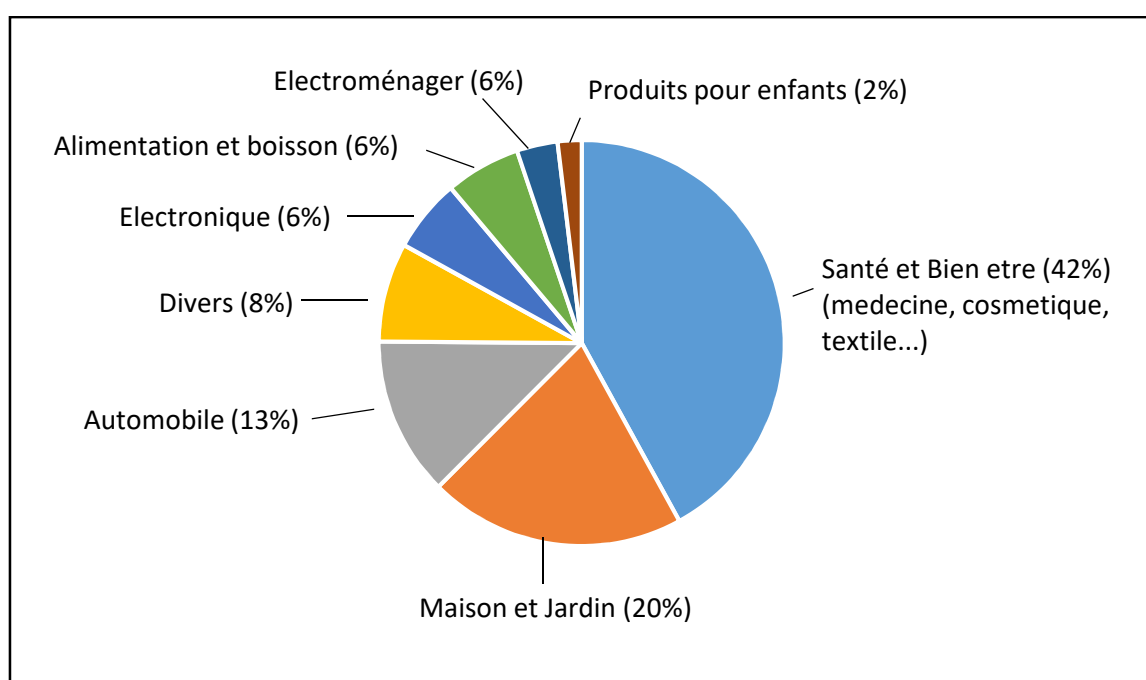


Figure 2 : Distribution des produits contenant des nanoparticules en fonction de leurs domaines d'application (Adapté d'après (Vance et al. 2015)).

La commercialisation des nanoparticules est très inégale selon les pays. En mars 2015, les trois acteurs majeurs étaient les Etats-Unis avec 773 produits, suivis de l'Europe avec 612 produits puis de l'Asie de l'Est avec 304 produits (Figure 3). Au sein de l'Europe, seuls certains pays occidentaux en produisent avec principalement l'Allemagne (328 produits) et le Royaume-Uni (104 produits). Quant à la France, 34 produits contenant des nanomatériaux ont été répertoriés.

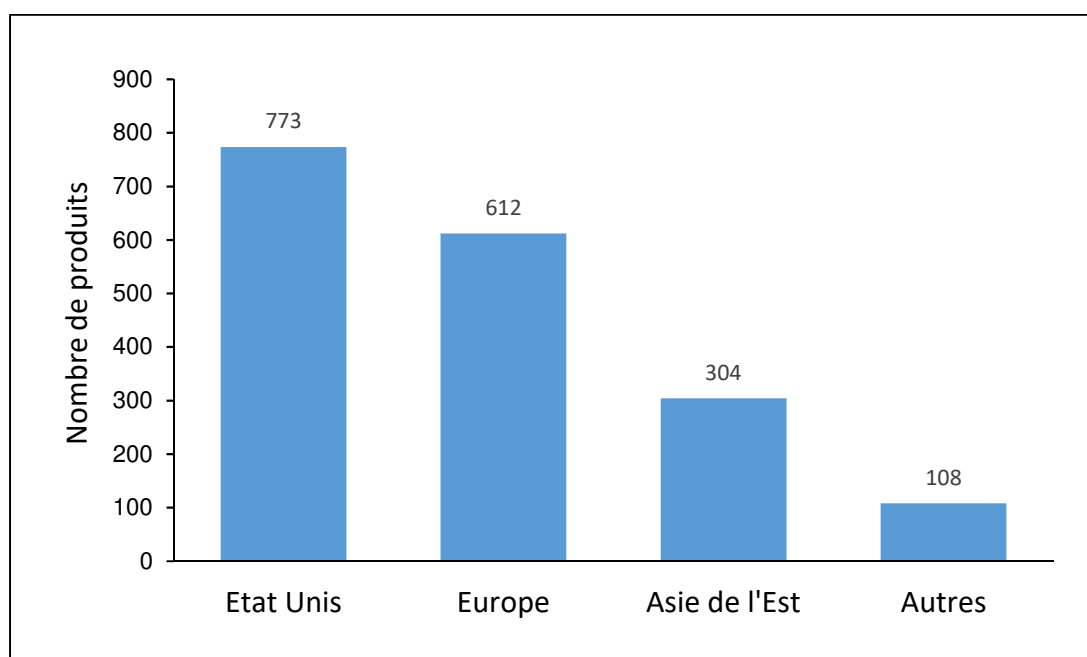


Figure 3 Nombre de produits répertoriés en mars 2015 en fonction de la région de production.(Adapté d'après (Vance et al. 2015)).

Sur les 1814 produits contenant des nanoparticules, nous connaissons leur composition pour seulement la moitié, et il s'agit en majorité de nanoparticules métalliques (Figure 4). Parmi ces nanoparticules métalliques, le métal le plus représenté est l'argent avec plus de 400 produits répertoriés. D'autres métaux sont également beaucoup utilisés, comme le dioxyde de titane ou l'oxyde de zinc mais avec un nombre de produits bien inférieur (<100 produits).

Concernant les quantités de nanoparticules produites (en masse), le dioxyde de titane (TiO_2) et l'oxyde de zinc sont les plus produits dans le monde alors que la production annuelle mondiale des nanoparticules d'argent représente seulement 2% de la production. Les nanoparticules d'argent sont donc utilisées dans de nombreux produits mais en faible quantité, contrairement au dioxyde de titane (TiO_2) et à l'oxyde de zinc qui eux sont utilisés dans un nombre plus restreint de produits mais en quantité plus importante.

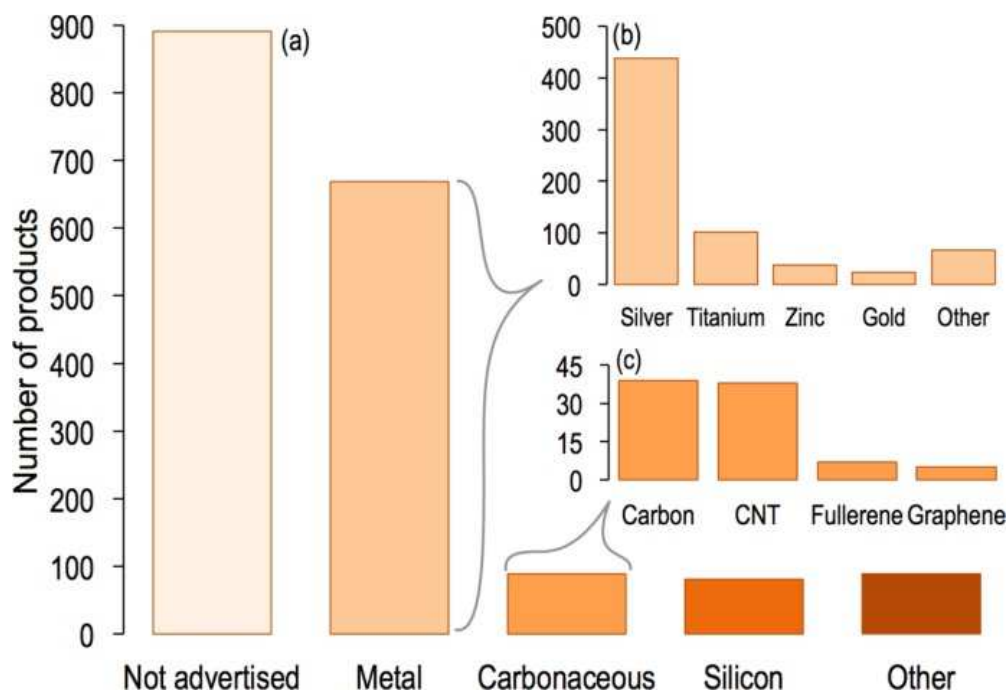


Figure 4: Composition revendiquée des nanomatériaux répertoriés en mars 2015.
(D'après (Vance et al. 2015)).

3. Les nanoparticules : Propriétés et applications

Du fait de leur petite taille (<100 nm), les nanoparticules ont une surface spécifique plus importante que les mêmes matériaux à échelle supérieure. De plus, en dessous d'une taille de 20 nm environ, apparaît une réactivité de surface accrue du fait de l'énergie de surface (Auffan et al., 2009). C'est cette particularité qui leur confère de nouvelles propriétés intéressantes pour l'industrie. Suivant le type de nanoparticules utilisées, une variété d'applications est possible. Elles peuvent apporter aussi bien des propriétés optiques, mécaniques, électriques, magnétiques que biologiques. Les propriétés et applications des différentes nanoparticules étudiées dans cette étude (TiO_2 -NPs, ZnO-NPs, Ag-NPs) sont détaillées ci-dessous.

3.1 Les nanoparticules de TiO_2

Le TiO_2 est un constituant naturel de la croûte terrestre et du sol. Cependant, suite à son utilisation en industrie (sous forme de micro et de nanoparticules), sa concentration dans les sols agricoles est en augmentation. Les nanoparticules de TiO_2 utilisées en industrie peuvent être sous deux formes cristallines : la forme rutile et la forme anatase (Figure 5). Suivant la forme cristallographique, les propriétés et donc les applications seront différentes.

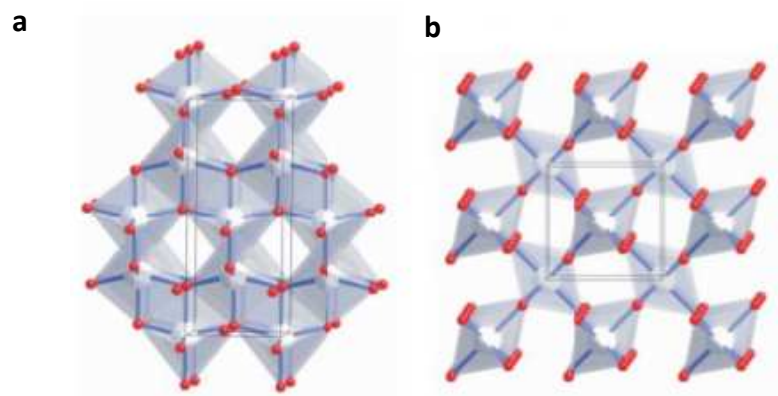


Figure 5 : Schéma de la structure cristallographique du TiO_2 sous forme anatase (a) et rutile (b). (D'après (Arroyo-de Dompablo et al. 2011)).

Les TiO_2 -NPs possèdent plusieurs propriétés intéressantes pour l'industrie :

- Photocatalyseur : les TiO_2 -NPs sont capables d'accélérer certaines réactions à l'aide de l'énergie lumineuse. Parmi ces réactions, nous pouvons citer les réactions d'oxydation réduction, ainsi le TiO_2 permet la réduction du NO_2 ou du NO_3 (des gaz provenant des pots d'échappements) mais également la production d'espèces radicalaires par oxydoréduction de l'eau, qui elles, permettront une oxydoréduction des polluants atmosphériques et/ou une activité bactéricide (Fujishima & Honda 1972). Pour ses propriétés de photocatalyse, les TiO_2 -NPs sous forme anatase sont donc utilisées comme dépolluant, comme antibactérien et comme désodorisant dans les peintures, les vitres et le béton.
- Absorbeur des UV : les TiO_2 -NPs sont capables d'absorber les UV, elles sont utilisées sous forme rutil comme protecteur solaire dans les crèmes solaires (Sambandan & Ratner 2011), tout en ayant pour avantage d'être transparentes contrairement au TiO_2 micrométrique.

Malheureusement, ce sont ces mêmes propriétés qui font des TiO_2 -NPs des éléments toxiques pour l'homme et l'environnement. En effet, le TiO_2 par photocatalyse produit des espèces réactives de l'oxygène ($\text{OH}^\cdot$ et $\text{O}_2^\cdot$), qui génèrent un stress oxydant pouvant induire des lésions jusqu'à la mort cellulaire autant chez les procaryotes que les eucaryotes. L'impact du TiO_2 sur les bactéries sera détaillé en partie 2 chapitre 1.

Le TiO_2 micrométrique, du fait de son indice de réfraction et de sa blancheur, est un matériau très largement utilisé comme pigment ou opacifiant dans les peintures, les revêtements, les plastiques, l'alimentation (sous le nom d'additif E171), les médicaments, les dentifrices, etc.... Ce micro- TiO_2 doit être pris en compte dans l'évaluation des risques liés aux nanoparticules car il contient une fraction nanométrique. Par exemple, Yang et al (2014) ont montré que l'additif E171 contenait 17 à 35% de particules avec une dimension <100 nm.

3.2 Les nanoparticules de ZnO

Parmi les nanoparticules contenant des métaux, les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO-NPs) constituent le troisième volume de production annuelle mondiale le plus élevé, après les SiO₂ et les TiO₂ (Piccinno et al. 2012). En effet, les ZnO-NPs sont produites et incorporées dans une large gamme de produits pour leurs propriétés :

- Électriques : le ZnO est un semi-conducteur piézoélectrique. La piézoélectricité est la capacité que possèdent certains corps à se polariser électriquement sous l'action d'une contrainte mécanique et réciproquement à se déformer lorsqu'on leur applique un champ électrique. Dans le cas du ZnO, sa propriété piézoélectrique lui permet de transformer un signal électrique en ondes acoustiques, comme dans les premiers récepteurs radio sans fil de 1920. De nos jours les ZnO-NPs sont utilisées pour le développement de nano-générateurs piézoélectriques ou de composants pour l'optoélectronique. Les propriétés électromagnétiques des ZnO-NPs font d'elles des bonnes candidates dans les panneaux photovoltaïques.
- Absorbeurs des UV : La capacité des ZnO-NPs à absorber les UV est la propriété la plus exploitée en industrie. Comme pour les TiO₂-NPs, les ZnO-NPs agissent comme filtre vis-à-vis des rayons UV et permet une protection solaire dans les crèmes solaires (Serpone et al. 2007).
- Photocatalytiques et photo-oxydantes : Ces deux propriétés sont largement exploitées dans la dégradation et la minéralisation de polluants environnementaux (Hoffmann et al. 1995).
- Antibactériens et antifongiques : Les ZnO-NPs sont utilisées pour la fabrication de textiles, d'emballages alimentaires et de matériels médicaux pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (Dastjerdi & Montazer 2010; Ma, Williams, et al. 2013). Leur mode d'action antibactérien sera détaillé en partie 2 chapitre 1.
- Mécaniques : Les ZnO-NPs sont utilisées pour la fabrication de polymères (plastique et caoutchouc) ou de ciments en raison de la stabilité et de la résistance qu'elles leur confèrent.

La taille nanométrique du ZnO permet d'améliorer les propriétés du ZnO micrométrique et d'en amener de nouvelles. Il permettra par exemple d'avoir des produits plus fluides et plus homogènes dans les crèmes solaires, ou bien d'être transparent dans les composants électroniques.

3.3 Les nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'argent sont les nanoparticules métalliques utilisées dans le plus grand nombre de produits : en effet sur 1814 produits contenant des nanoparticules, 442 contiennent des nanoparticules d'argent. Cependant, sur une grande partie de ces 442 produits, il est important de noter que les nanoparticules d'argent sont combinées avec un autre type de nanoparticules pas toujours connu.

Les nanoparticules d'argent sont utilisées en industrie pour diverses raisons :

- Antibactérien : C'est la propriété la plus utilisée pour les Ag-NPs. Ces nanoparticules sont présentes dans de nombreux produits de notre quotidien comme les enrobages alimentaires, les crèmes pour le corps, les textiles, les sprays désodorisants, la lessive, l'électro-ménager (intérieur des frigos, des machines à laver ...). Elles sont également utilisées pour ces mêmes raisons en médecine, et comme produit phytosanitaire (antibactérien et antifongique) en agriculture.
- Conducteur : L'argent est un très bon conducteur thermique et électrique, il a donc toujours été très populaire dans l'électronique. En effet, les nanoparticules d'argent sont largement utilisées pour la fabrication de transistors, de batteries et de circuits électroniques.
- Catalyseurs : Les nanoparticules d'argent sont également de très bons catalyseurs. Elles sont utilisées par exemple, pour réaliser de nombreuses réactions catalytiques comme l'oxydation du benzène en anhydride maléique (utilisé dans la synthèse de certains polymères), la réduction du 4-nitrophenol en 4-aminophenol (élément utilisé pour la fabrication du paracétamol) ou la réduction de la rhodamine B.

4. Le cycle de vie des nanoparticules et le rejet dans l'environnement

Cette utilisation croissante des nanoparticules en industrie, en raison des nouvelles propriétés qu'elles apportent, induit un rejet de plus en plus important dans l'environnement. Ces rejets ont lieu au cours des différentes étapes du cycle de vie des NPs, lors de leur production, de leur incorporation dans les produits, de leur utilisation et lors de leur fin de vie (Figure 6).

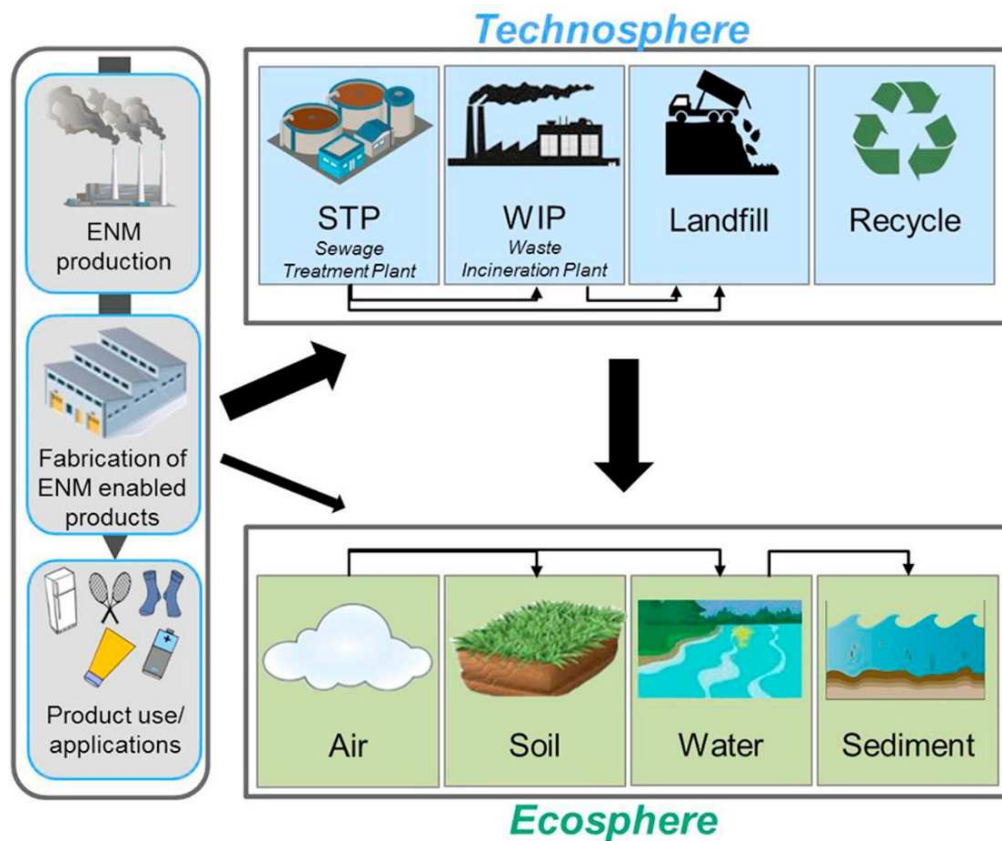


Figure 6 : Cycle de vie des nanomatériaux manufacturés rejetés dans l'environnement. ENM: engineered nanomaterial, STP: sewage treatment plant, WIP: waste incineration plant. (D'après (Sun et al. 2014)).

Une fois rejetées les nanoparticules peuvent s'accumuler dans les différents compartiments environnementaux (l'air, l'eau, les sols et les sédiments). Il est donc important d'évaluer ces rejets au cours du cycle de vie des nanoparticules. Les rejets sont volontaires, involontaires ou accidentels. Les rejets volontaires sont réalisés lors de l'épandage des nano-fertilisants et des nano-pesticides en agriculture, ou lors de leur utilisation dans le traitement des eaux usées en raison de leurs propriétés de bioremédiation des métaux. Les rejets involontaires font suite à l'utilisation des produits les contenant, comme lors du lavage des textiles ou l'utilisation des peintures et des cosmétiques. Les rejets accidentels sont possibles lors de la production ou du transport des matériaux. Actuellement, les données sur les rejets sont très parcellaires. Par exemple, concernant les rejets involontaires, seulement 20% des NPs et 36% des différents types de produits ont été étudiés (Caballero-Guzman & Nowack 2016). En raison de limites techniques, la concentration environnementale de chaque nanoparticule est mal connue.

Cependant, des modélisations ont été réalisées afin de déterminer leurs concentrations approximatives dans chaque compartiment écologique. Les rejets des trois nanoparticules étudiées, TiO₂-NPs, ZnO-NPs et Ag-NPs sont détaillés ci-dessous :

- Les nanoparticules de TiO₂ sont les nanoparticules les plus rejetées (en masse) dans l'environnement (Keller et al. 2013). Ce rejet est en grande partie la conséquence de l'utilisation des peintures et des produits d'hygiène personnelle contenant des TiO₂-NPs. En effet, Kaegi et al montrent que les peintures, dans des conditions météorologiques naturelles, rejettent de forte concentration de TiO₂-NPs (3.5.10⁷ TiO₂-NPs/L) (Kaegi et al. 2008). Keller et al (2013) estiment que 75 à 95% des nanoparticules contenues dans les cosmétiques sont rejetées dans l'environnement suite à une douche ou une baignade. Les nanoparticules de TiO₂ entrent donc involontairement dans les écosystèmes aquatiques et terrestres (Figure 7).
- Les nanoparticules de zinc sont rejetées essentiellement en raison de leurs utilisations en médecine, en cosmétique, en électronique, mais également dans les peintures. Une part importante des ZnO-NPs se retrouve dans les eaux usées puis dans les stations d'épuration, suite à leurs utilisations dans les cosmétiques ou dans les

peintures. Au niveau des stations d'épuration, il est estimé que 90% des nanoparticules de zinc, d'argent ou de TiO_2 seront retenues dans les boues d'épuration. Or certains pays comme la France utilisent ces boues d'épuration comme fertilisant en agriculture. Une part importante des nanoparticules de zinc rejetées dans les eaux usées finit donc dans les sols agricoles. Les autres compartiments d'accumulation sont les décharges et les eaux (Figure 7).

- Les nanoparticules d'argent sont rejetées dans le sol avec des concentrations bien inférieures à celles des TiO_2 -NPs ou même des ZnO -NPs (Keller et al. 2013). Cependant, cela n'est pas forcément représentatif des conséquences écologiques. En effet, les nanoparticules d'argent ont une activité bactéricide bien supérieure. Le rejet dans les sols se fait essentiellement via l'épandage de boues de station d'épuration. En effet, suite à l'utilisation des produits contenant des Ag-NPs (par exemple après le lavage de textile), celles-ci sont rejetés dans les eaux usées, puis finissent dans les boues d'épuration qui seront alors utilisées comme fertilisant en agriculture. L'apport par les produits phytosanitaires est encore mal quantifié. Une autre voie de rejet de nanoparticules d'argent dans l'environnement se fait *via* les décharges après le rejet de l'électroménager et des outils médicaux. Comme pour les TiO_2 et ZnO , les écosystèmes terrestres et aquatiques sont touchés par les rejets, alors que l'atmosphère accumule une très faible proportion des rejets (Figure 7).

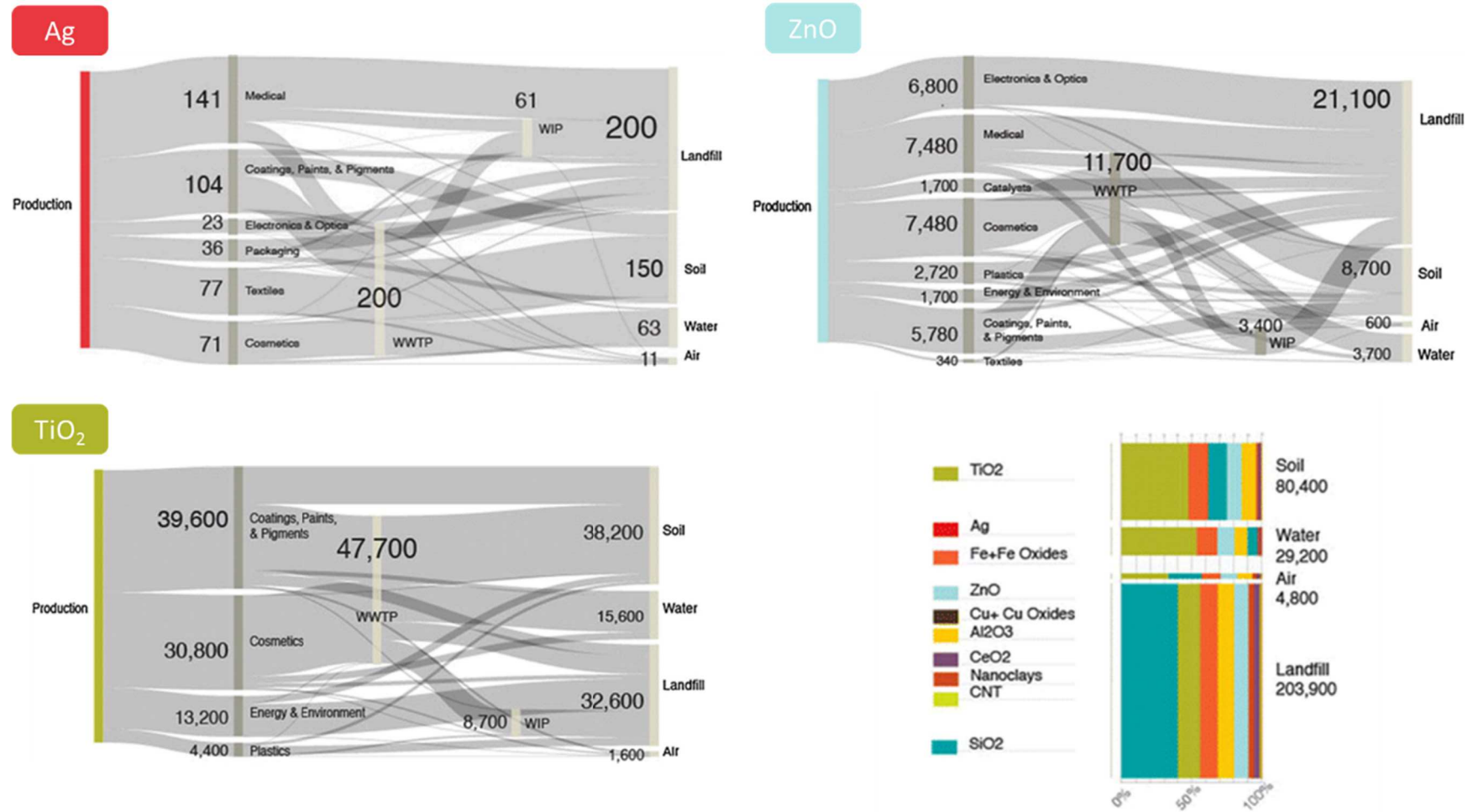


Figure 7 : Rejet et répartition globale des nanomatériaux dans l'environnement en 2010 (en tonnes par an) suite à leur production et leur utilisation.

(D'après(Keller et al., 2013))

5. Le devenir des nanoparticules dans l'environnement

Une fois rejetées dans les sols, les nanoparticules vont interagir avec les composés et les organismes du sol, et subir des modifications physico-chimiques. Les modifications peuvent être l'agrégation ou agglomération, l'interaction avec les particules et colloïdes présents dans le milieu (matière organique, minéraux), la dissolution et la transformation chimique (formation d'AgCl ou Ag₂S pour les nano Ag). Ces transformations détermineront la toxicité ainsi que la biodisponibilité des nanoparticules dans le sol, il est donc essentiel de les étudier (Fabrega, Fawcett, et al. 2009).

5.1 Agrégation/agglomération

Définition : L'agrégation est l'association de nanoparticules entre elles ou avec d'autres particules par un lien fort (liaison covalente), alors que l'agglomération est l'association des nanoparticules par un lien faible comme les forces de Van der Waals, électrostatiques ou de tensions de surface (Figure 8) (Jiang et al. 2009). Il est à noter que dans la littérature ces deux termes ne sont pas toujours bien employés. La formation d'agglomérat et d'agrégat est influencée par des forces physiques comme les mouvements browniens, la gravité ou le mouvement des fluides qui permettent la rencontre entre deux nanoparticules. Quand l'énergie du mouvement ou d'attraction est supérieure à l'énergie de répulsion, une agglomération/agrégation se produit. La taille importante des agrégats ou des agglomérats peut conduire à des phénomènes de sédimentation.

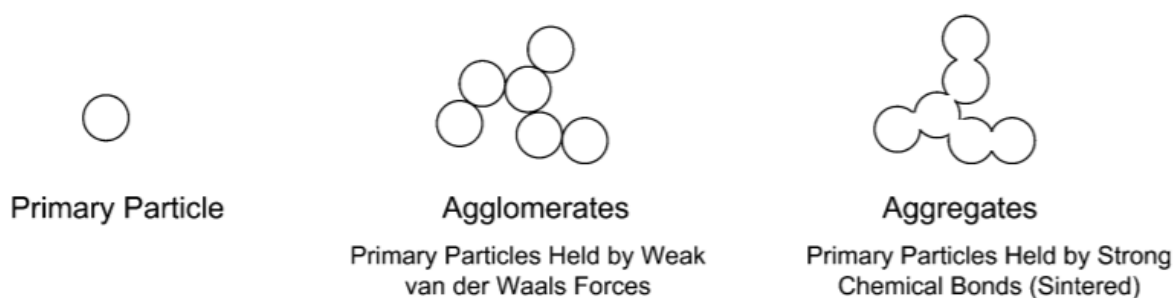


Figure 8 : Définition d'agglomération et d'agrégation.
(D'après(Jiang et al. 2009)).

L'agrégation/agglomération est un paramètre majeur qui influence la toxicité des nanoparticules. En effet, Kvitek et al. montrent une corrélation nette entre l'agrégation et la toxicité antibactérienne (Kvítek et al. 2008). D'autres études le confirment et montrent que l'agrégation/agglomération des nanoparticules d'argent tend à faire diminuer leurs activités antibactériennes (Levard et al. 2012; Lok et al. 2007). Le plus souvent, les nanoparticules sont synthétisées avec un enrobage comme le PVP (polyvinylpyrrolidone) ou BEPI (branched polyethyleneimine) qui limite cette agrégation/agglomération (El Badawy et al. 2012). Cependant, le milieu peut également modifier l'état d'agrégation/agglomération *via* différents paramètres qui influenceront sur la charge nanoparticulaire comme : la présence d'ions, d'électrolytes ou le pH. Pour exemple, Fang *et al* montrent une corrélation négative, entre l'agglomération des nanoparticules de TiO₂ et la présence de matière organique dans le sol, et une corrélation positive, entre l'agglomération et le pH ou la présence d'ion (Fang et al. 2009).

5.2 Charge de surface

La charge de surface est un autre paramètre qui intervient dans la toxicité des nanoparticules. El Badawy et al montrent que la charge de surface des nanoparticules d'argent affecte leur toxicité vis-à-vis de *Bacillus subtilis*. Ils ont testé quatre enrobages qui induisent des charges de -38mV à +40mV et montrent que plus la charge est négative moins les nanoparticules sont toxiques (Figure 9) (El Badawy et al. 2011). Une autre étude montre le même phénomène avec des nanoparticules d'or (Leonov et al. 2008). Une des hypothèses formulées est une répulsion des particules par la paroi, elle-même chargée négativement. Cependant, ces observations ne sont pas toujours transposables à tous les milieux et organismes. En effet, une autre étude sur *E.coli* ne montre pas d'effet de la charge des nanoparticules d'argent sur leur toxicité (Dror-Ehre et al. 2009). D'autres paramètres de surface semblent donc jouer un rôle sur la toxicité des nanoparticules comme l'hydrophobicité inhérente à certains enrobages organiques. Dutta et al montrent en effet que l'hydrophobicité des enrobages nanoparticulaires augmente leur toxicité chez *Bacillus subtilis* (Dutta et al. 2011).

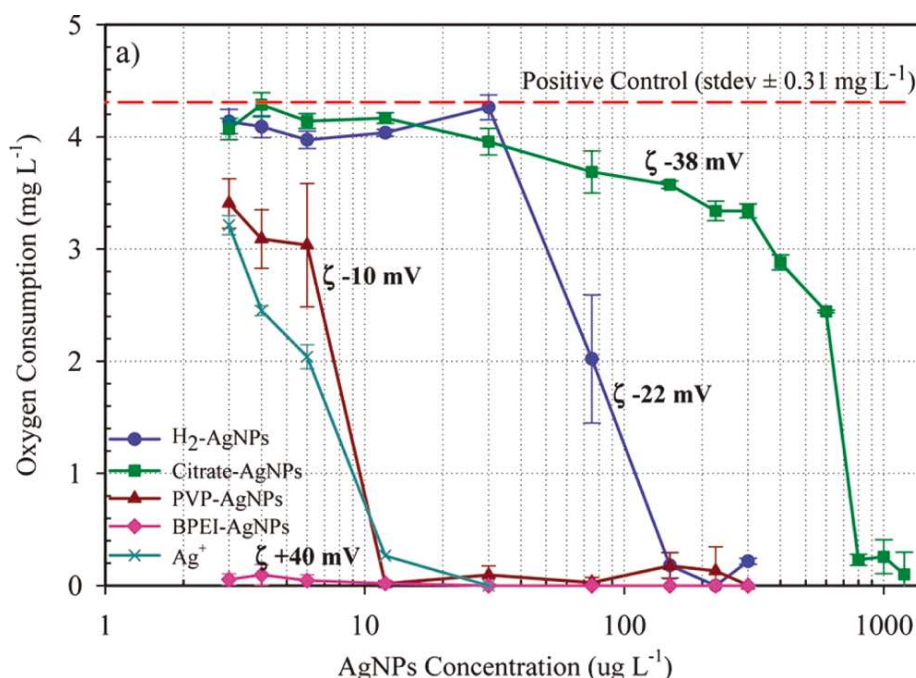


Figure 9 : Impact de la charge des nanoparticules d'argent sur la toxicité bactérienne.
(D'après (El Badawy et al. 2011)). L'inhibition de la croissance de bactérie Gram+ est évaluée en observant la consommation d'oxygène après exposition aux nanoparticules d'argent).

5.3 Forme de la nanoparticule

La morphologie des nanoparticules peut également influencer leur toxicité. Deux nanoparticules de même surface mais de formes différentes peuvent avoir une activité bactéricide différente (Pal et al. 2007). Ce paramètre est donc également important à évaluer dans les études d'écotoxicologie.

5.4 Dissolution

La dissolution des nanoparticules métalliques est un paramètre majeur qui détermine leur toxicité (Ma, Williams, et al. 2013; Mijndendonckx et al. 2013). Cette dissolution est dépendante aussi bien des paramètres physico-chimiques intrinsèques de la nanoparticule (taille, composition chimique, enrobage) (Meulenkamp 1998; Angel et al. 2013) que des paramètres du milieu (pH, température, matière organique) (Borm et al. 2006). Par exemple, la dissolution des Ag-NPs (conformément aux constantes thermodynamiques de l'argent métallique) augmente avec la température mais diminue lorsque le pH augmente (Figure 10) (Liu & Hurt, 2010 ; Miao et al., 2010).

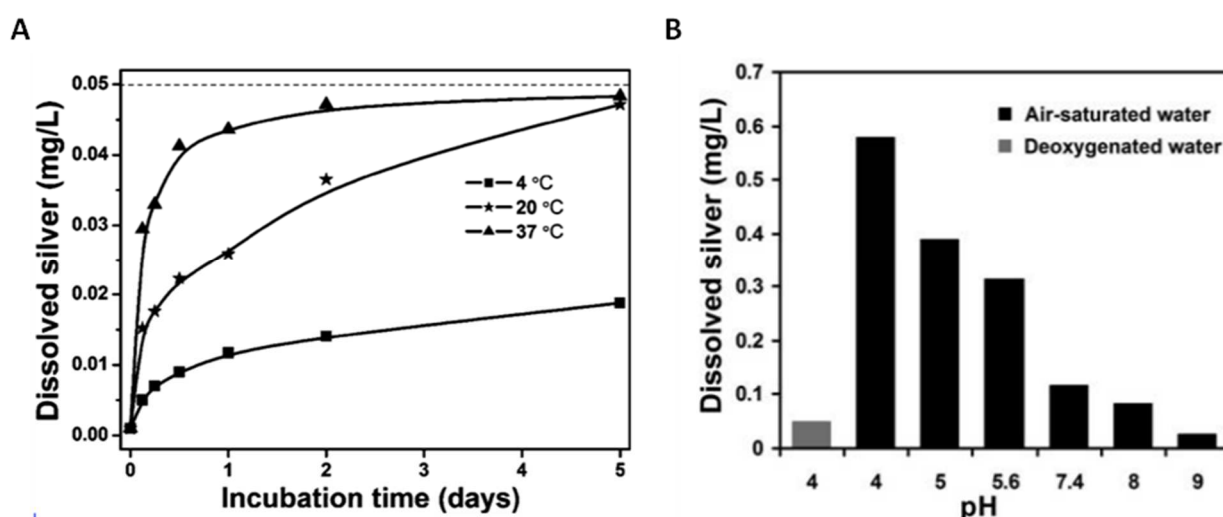


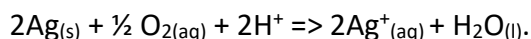
Figure 10 : Impact de la température et du pH sur la dissolution des nanoparticules d'argent. (D'après (Liu & Hurt 2010)).

5.5 Changement de spéciation des Ag-NPs et ZnO-NPs

Un autre type de transformation va également déterminer la toxicité des nanoparticules, c'est la transformation chimique. Alors que les TiO₂-NPs peuvent être considérées comme plutôt inertes dans l'environnement, les Ag-NPs et de ZnO-NPs subissent des transformations chimiques, susceptibles de modifier leur toxicité telles que l'oxy-sulfuration et la dissolution-reprécipitation, respectivement. La partie suivante concernera donc essentiellement ces deux types de nanoparticules.

5.5.1 Oxydation des Ag-NPs

En condition aérobie, les Ag-NPs réagissent avec l'oxygène et forment de l'Ag₂O. Cependant, cette formation d'Ag₂O ne semble pas être thermodynamiquement favorable en présence de soufre et de chlore (Becking et al. 1960). Elle se produit le plus souvent en surface des nanoparticules lorsque la quantité d'O₂ est bien supérieure aux quantités de S et de Cl, et est favorisée lorsque la taille des NPs diminue (Cai et al. 1998). La présence d'une couche superficielle d'Ag₂O, et donc l'état d'oxydation de ces NPs conditionne leur toxicité (Gunawan et al. 2009). Ceci est la conséquence d'une dissolution des ions argent de la couche superficielle d'Ag₂O qui, contrairement à l'argent métallique, se dissout dans l'eau pure (Johnston et al. 1933). Au fur et à mesure de la dissolution de cette couche, l'oxydation progresse vers le centre de la particule. Elzy et Grassian montrent que cette dissolution est favorisée à bas pH (Elzey & Grassian 2010). Suite à cela la réaction suivante de dissolution oxydative est proposée :



5.5.2 Chloration des Ag-NPs

Les réactions avec le chlore impliquent les ions Ag⁺, elles ne sont donc possibles qu'après oxydation des Ag-NPs. Li et al montrent que la dissolution des Ag-NPs est corrélée au rapport Cl/Ag (Li et al. 2010). Une faible quantité de Cl⁻ permet de piéger les substances

toxiques d' Ag^+ de la solution, formant ainsi des précipités AgCl , alors qu'une quantité élevée de Cl^- induit la formation de complexes biodisponibles (AgCl_2^- , AgCl_3^{2-} et AgCl_4^{3-}) (Xiu et al. 2011 ; Bielmeyer et al. 2008). Dans l'environnement nous pouvons observer ces deux types de réactions, le diagramme Eh-pH réalisé par Levard et al. (2012) l'illustre bien (Figure 11). Sur ce diagramme nous observons qu'une forte concentration en Cl^- , comme dans l'eau de mer, conduit à la formation d' AgCl_2^- alors qu'une concentration plus faible en Cl^- dans l'eau douce conduit à la formation d' AgCl solide. L'effet des ions Cl^- sur la toxicité des Ag-NPs est donc ambivalent, une quantité faible tend à la diminuer alors qu'une quantité forte tend à l'augmenter.

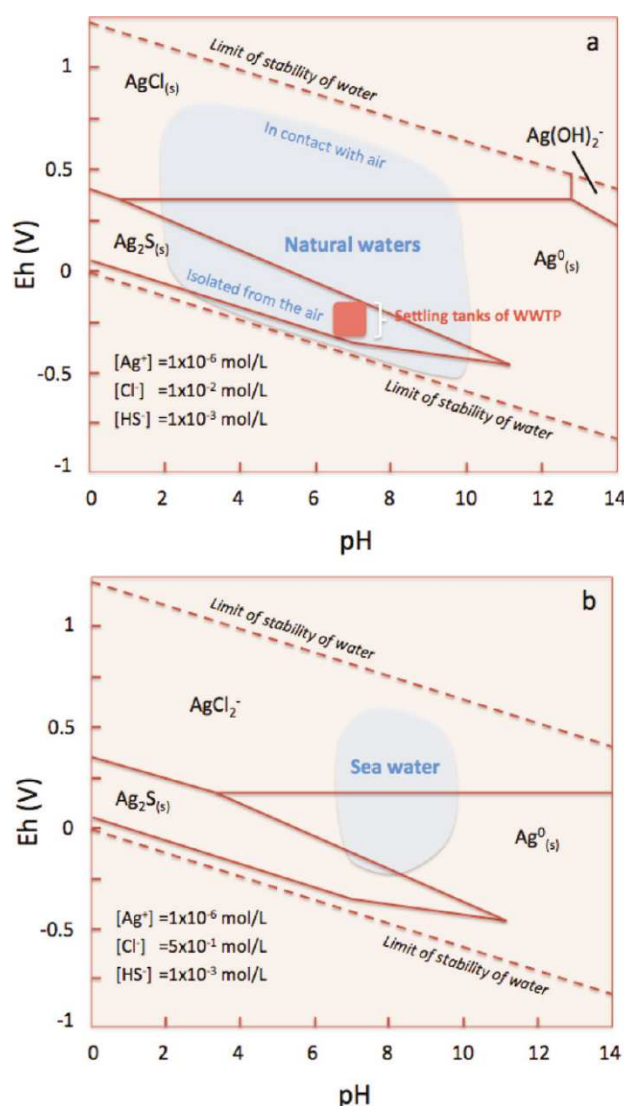


Figure 11: Eh-pH diagramme pour les systèmes Ag-S-Cl-H₂O. (D'après (Levard et al. 2012)). Les concentrations utilisées dans ces deux diagrammes miment les concentrations de (a) l'eau douce et de (b) l'eau de mer.

5.5.3 Sulfuration des Ag-NPs

La sulfuration de l'argent est un phénomène qui a longtemps été étudié en raison de son impact sur la conductivité de l'argent en électronique. Une étude montre qu'une heure d'incubation à 0.2 ppb d'H₂S suffit pour voir apparaître une couche d'Ag₂S sur de l'argent métallique. Cette même expérience est complètement inhibée en absence d'O₂ comme accepteur d'électrons (Bennett et al. 1969 ; Volpe & Peterson 1989). Comme pour la chloration, l'oxydation préalable de l'argent est donc indispensable pour la sulfuration, il s'agit d'une oxy-sulfuration. Cette sulfuration se fait selon deux mécanismes qui dépendent de la concentration en soufre dans le milieu : l'oxy-sulfuration in situ des Ag-NPs en Ag₂S-NPs (concentration élevée de soufre) ou la sulfuration indirecte qui nécessite une oxydation-dissolution de l'argent puis une reprécipitation (concentration faible de soufre). La concentration en soufre dans l'environnement reste faible, c'est donc la sulfuration indirecte qui est majoritairement observée. La sulfuration directe est quant à elle possible dans certaines zones où la concentration en soufre est bien plus élevée comme dans les stations d'épuration (Liu et al. 2011).

Dans l'environnement, il existe différentes sources de soufre telles que :

- Les gaz : comme le sulfure d'hydrogène qui est naturellement présent dans l'air
- Les composés organo- sulfurés (exp : bacillithiol, glutathion...) : Ces composés sont omniprésents dans la nature, et résultent de l'activité biologique des organismes. Le complexe Ag-cystéine présente une constante de stabilité élevée (logK = 11.9). Ce type d'interaction entre l'Ag et les composés organo-sulfurés est donc attendue. Dans leurs études Levard et al. montrent qu'en présence de concentrations équimolaires de cystéine et d'argent et deux concentrations de Cl⁻ différentes, l'Ag se lie fortement à la cystéine, malgré le fait que Cl⁻ soit à des concentrations de 4 à 5 ordres de grandeur supérieurs à la cystéine (Figure 12). Ces composés organo-sulfurés, en se liant aux nanoparticules d'argent, vont les protéger et se protéger de l'oxydation.

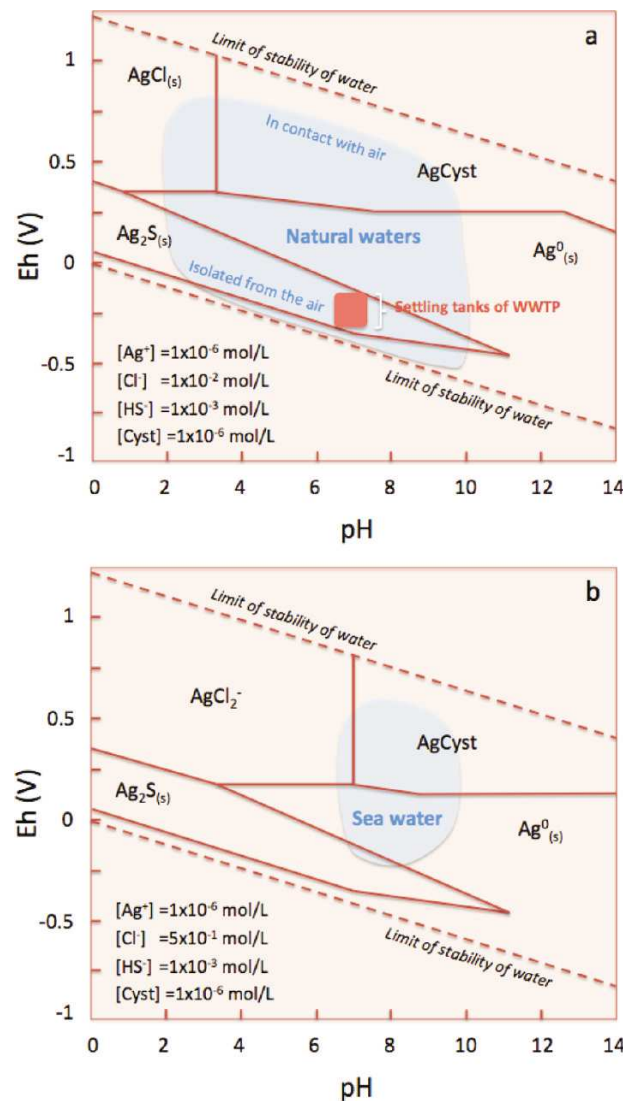


Figure 12 : Eh-pH diagramme pour les systèmes Ag-S-Cl-Cyst-H₂O.

Les concentrations utilisées dans ces deux diagrammes miment les concentrations de (a) l'eau douce et de (b) l'eau de mer. (D'après (Levard et al. 2012)).

- les sulfures métalliques comme le ZnS ou le FeS : les ions argent remplacent rapidement les ions zinc ou fer dans les sulfures ZnS ou FeS pour former de l'Ag₂S en raison de sa stabilité plus importante (Thalmann et al. 2014). En effet, la constante de solubilité de l'Ag₂S ($K_{ps} = 8.0 \times 10^{-51}$) est bien plus faible que celles du ZnS et FeS (3×10^{-23} et 8.0×10^{-19} respectivement) (Figure 13).

	Constante de solubilité (Kps)
AgCl	1.8×10^{-10}
Ag₂S	6.3×10^{-50}
ZnS	3.0×10^{-23}
FeS	6.3×10^{-18}

Figure 13 : Constante de solubilité entre 18 et 25°C de différents composés.
(Adapté de « Lange's Handbook of Chemistry » de John A. Dean (Dean 1998)).

Même si nous ne connaissons pas la constante de solubilité de l'Ag₂S sous forme nanométrique, la valeur extrêmement faible connue pour la forme macrocristalline (Figure 13) suggère une très faible biodisponibilité des ions Ag. Une étude montre qu'une sulfuration partielle suffit à fortement limiter la dissolution des Ag-NPs et la libération d'ions Ag⁺. Dans cette étude ils montrent qu'un rapport S/Ag de 0.019 réduit de 7 fois la dissolution des Ag-NPs et qu'un rapport supérieur à 0.433 l'empêche totalement (Levard et al. 2011). Les premières études montrent que la sulfuration des nanoparticules d'argent diminue leur toxicité pour de nombreux organismes eucaryotes aquatiques et terrestres (Levard et al. 2013) et procaryotes dont *Bacillus subtilis* (Suresh et al. 2011). Concernant les plantes, les différents études montrent également une toxicité réduite après sulfuration, cependant une partie de l'Ag₂S reste assimilée par la plante entraînant une phytotoxicité (Wang et al. 2015).

La sulfuration semble donc être, pour la plupart des organismes, un antidote naturel contre la toxicité aigüe des nanoparticules d'argent (Levard et al. 2013). Il reste cependant des inconnues sur la nature et la structure exacte des espèces formées au cours de leur cycle de vie, ainsi que sur leur stabilité. Pour exemple Pradas del Real et al. montrent la formation d'une forme minoritaire d'Ag₂S amorphe et/ou Ag-thiol dans une boue de station d'épuration et dans un sol amendé par la boue (Pradas del Real et al. 2016), une forme qui pourrait être moins stable que la forme cristalline Ag₂S.

5.6 Changement de spéciation des ZnO-NPs

Les ZnO-NPs, comme les nanoparticules d'argent, se dissolvent facilement et peuvent donc subir diverses modifications chimiques. Les réactions les plus souvent observées sont celles avec le phosphate, le soufre et les oxydes de fer, qui aboutissent ainsi à la formation de $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, ZnS et de Zn absorbé sur les oxyde de Fer (Lv et al. 2012 ; Ma, Levard, et al. 2014). Ces réactions ont été observées dans les stations d'épuration et les produits ont été identifiés dans les boues d'épuration. L'importance de ces trois types de réactions est dépendante des conditions environnementales comme l'humidité, le pH, la teneur en phosphate ou en sulfure inorganique, ainsi que de la présence de protéines avec des groupements thiol (Lombi et al. 2012). La sécrétion bactérienne pourrait donc avoir une influence sur ces réactions. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour les mettre en évidence.

Ces transformations chimiques tendent à diminuer la toxicité des ZnO-NPs en raison d'une diminution de la dissolution des ions zinc (Ma, Levard, et al. 2014) (Ma et al., 2014). Cependant, cette diminution de toxicité reste réduite car contrairement aux nanoparticules d'argent sulfurées, le complexe ZnS possède une constante de solubilité bien supérieure, il est donc moins stable (Tableau 1).

5.7 Interactions avec des biomolécules

Toutes ces modifications physico-chimiques peuvent être la conséquence des interactions entre les molécules biologiques du sol et les nanoparticules. En raison de la complexité biologique du sol, l'influence de celle-ci sur les transformations physico-chimiques des nanoparticules reste peu connue.

Cependant, il a été montré que la biotransformation la plus courante est l'adsorption de bio-macromolécules (exp : protéines, polysaccharides) à la surface des nanomatériaux. Cette adsorption peut avoir pour conséquence de modifier la charge, la dissolution et/ou l'agglomération des nanoparticules. Prenons pour exemple les nanoparticules d'oxyde de

zinc qui sont très toxiques en raison d'une dissolution rapide dans l'environnement, cette dissolution et donc cette toxicité sont grandement diminuées en présence de matières organiques suite à une recomplexation des ions zinc (Li, Pokhrel, et al. 2011).

Un autre type de transformation ressort de ces études, elle fait suite aux réactions redox du vivant (Lowry et al. 2012). Les réactions redox, sont des réactions fondamentales pour la croissance de tous les systèmes biologiques, qui sont réalisées grâce à des enzymes ou grâce à la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Les ROS et les enzymes peuvent réagir avec les nanoparticules et transformer leur charge, leur agrégation et leur réactivité, ce qui peut affecter leur biodisponibilité et donc leur toxicité. Pour exemple, il a été vu que les nanotubes de carbone étaient oxydés et carboxylés par une enzyme nommée la peroxydase (Allen et al. 2008). Cette biotransformation peut également se faire aussi bien sur la nanoparticule métallique que sur son revêtement.

Les études préliminaires montrent que les organismes du sol ont un impact direct sur le devenir des nanoparticules dans le sol et donc sur leur toxicité. Les NPs peuvent interagir avec de nombreuses molécules biologiques et changer de leur biodisponibilité. En raison d'une variété importante d'espèces et donc de molécules biologiques présentes dans l'environnement, ces interactions sont mal connues. Elles sont pourtant essentielles dans la détermination de la toxicité des nanoparticules dans le sol. Dans ce travail, nous avons décidé d'étudier les interactions potentielles entre ces nanoparticules et une bactérie du sol, *Bacillus subtilis*. Le paragraphe suivant, explique les raisons du choix de cette bactérie.

6. Choix du modèle bactérien : *Bacillus subtilis*

En raison de la complexité des interactions biologiques avec les nanoparticules, nous avons fait le choix de simplifier le modèle et d'étudier une bactérie du sol modèle, *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis est une bactérie de la classe des *Bacilli*, elle a une forme de bâtonnet de quelques micromètres de long (Figure 14). Cette bactérie est aérobie stricte car elle a besoin de dioxygène pour vivre.

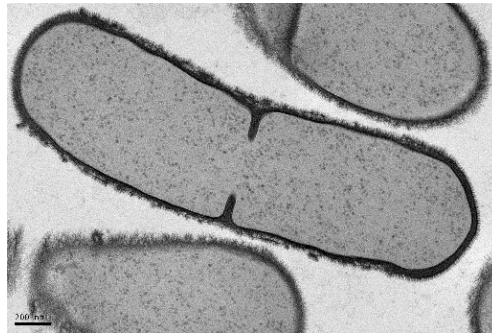


Figure 14 : Image prise par microscopie électronique de *Bacillus subtilis* en cours de division.

Bacillus subtilis est Gram⁺, ce qui signifie que sa membrane est constituée de trois grandes parties :

- Une couche de peptidoglycane (composant de la paroi cellulaire)
- Un espace périplasmique
- Une membrane plasmique

Contrairement aux Gram⁻, les Gram⁺ n'ont qu'une seule membrane et un seul espace périplasmique, mais possèdent une couche de peptidoglycane bien plus épaisse (Figure 15).

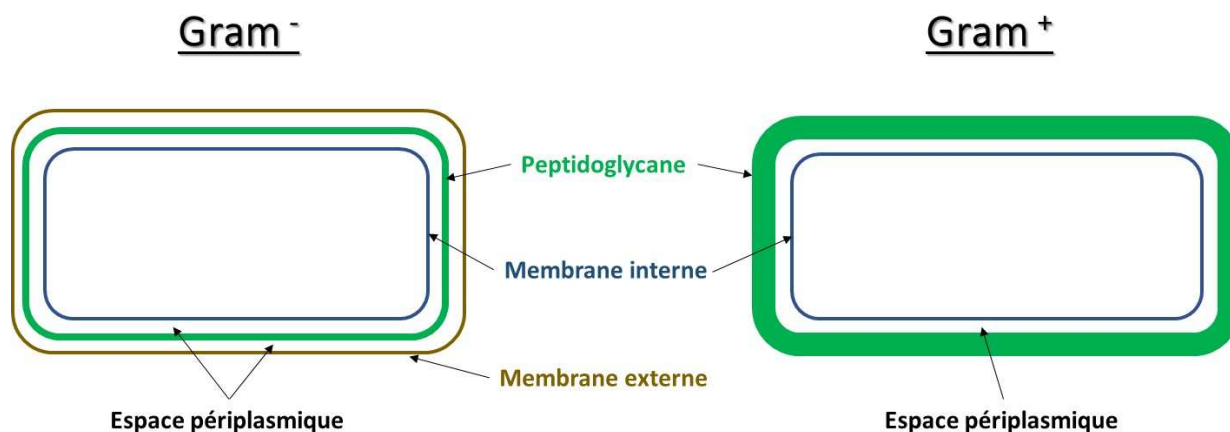


Figure 15 : Différences entre les parois Gram⁻ et Gram⁺.

Deux souches sont classiquement utilisées en laboratoire, la souche 168 dite souche « de laboratoire » et la souche 3610 dite souche « ancêtre ». La souche 3610 est la descendante connue la plus proche de la souche environnementale découverte par Ferdinand Conn en 1872. Cette souche a ensuite servi de parent pour les premières modifications génétiques qui ont donné lieu à la souche standard de laboratoire 168 (Zeigler et al. 2008). Cette souche a été sélectionnée pour sa croissance rapide ainsi que sa compétence améliorée (mécanisme de compétence détaillé en partie 2 chapitre 2). Elle a cependant perdu de nombreuses capacités. En effet, pour exemple la souche 3610 présente un swarming (capacité de se mouvoir en milieu solide) et une capacité à former un biofilm bien plus efficace (Branda et al. 2001 ; Kearns & Losick 2003).

Le choix de *Bacillus subtilis* pour l'étude des interactions NPs-bactérie s'est fait pour plusieurs raisons :

- Biotopes : *Bacillus subtilis* a pour biotope principal le sol, mais en raison de sa grande capacité d'adaptation physiologique, elle peut vivre dans une large variété d'habitats tels que l'eau douce, l'eau de mer, les aliments, les composts, le tractus gastro-intestinal... Elle est également capable de survivre dans des environnements hostiles grâce à la formation de spores. *Bacillus subtilis* n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme, cependant elle peut contaminer les aliments, entrer dans la chaîne alimentaire et exceptionnellement provoquer des intoxications. Compte tenu de la

diversité de ses biotopes, *Bacillus subtilis* fait partie des organismes en contact avec les nanoparticules rejetées dans l'environnement.

- Bactérie Gram + modèle : *Bacillus subtilis* est un organisme modèle des bactéries Gram+ pour plusieurs raisons : tout d'abord, *Bacillus subtilis* est naturellement compétente, c'est-à-dire qu'elle est capable d'intégrer une molécule d'ADN libre dans son environnement. Cela a permis d'en faire un outil génétique aisément manipulable et d'établir les bases de la régulation cellulaire. Ensuite, son génome a entièrement été séquencé par Kunst et ses collaborateurs en 1997 puis révisé par Zeigler et ses collaborateurs en 2008, ce qui a permis de mettre en place de nouvelles approches expérimentales très intéressantes (telles que la protéomique ou la transcriptomique) et donc de mieux connaître son métabolisme et ses régulations cellulaires. Enfin, sa capacité à croître rapidement et à excréter un grand nombre de molécules à large activité biologique en a fait un outil essentiel pour l'industrie pharmaceutique et alimentaire.
- Capacité de sécrétion : Une des particularités très intéressantes de *Bacillus subtilis* est sa capacité à sécréter de nombreuses molécules à impact environnemental tels que l'ADN, les protéines, les lipopeptides, les exopolysaccharides, les exoprotéases ou le poly-gamma-glutamate. Ces molécules ont en effet, des fonctions diverses et impressionnantes. Elles permettent la dégradation de la plupart des matières organiques animales ou végétales (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...), la survie dans des environnements hostiles, ou même la lutte contre des bactéries et champignons pathogènes pour la plante. Ces molécules permettent aussi à *Bacillus subtilis* de vivre en interaction avec les plantes, avec des bénéfices des deux côtés (Figure 16). Les plantes apportent des nutriments à *Bacillus subtilis*, alors que *Bacillus subtilis* permet de promouvoir la croissance des plantes, d'une part, en les protégeant contre des infections par la sécrétion d'antifongiques et d'antibactériens et, d'autre part, *via* la sécrétion d'enzymes qui permet de fournir des nutriments à la plante en dégradant des matières organiques complexes. C'est principalement cette capacité à sécréter de nombreuses molécules, impliquées dans la rhizosphère, qui fait de *Bacillus subtilis* un organisme modèle très pertinent

pour l'étude de l'impact des nanoparticules dans le sol. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, les nanoparticules voient leurs caractéristiques modifiées *via* de nombreux paramètres environnementaux dont la présence de biomolécules. Ces molécules sécrétées peuvent potentiellement interagir avec les nanoparticules, modifier leur état et donc leur toxicité. De plus, ces interactions peuvent également perturber la fonction de ces molécules, et donc la fonction de *Bacillus subtilis* dans le sol.

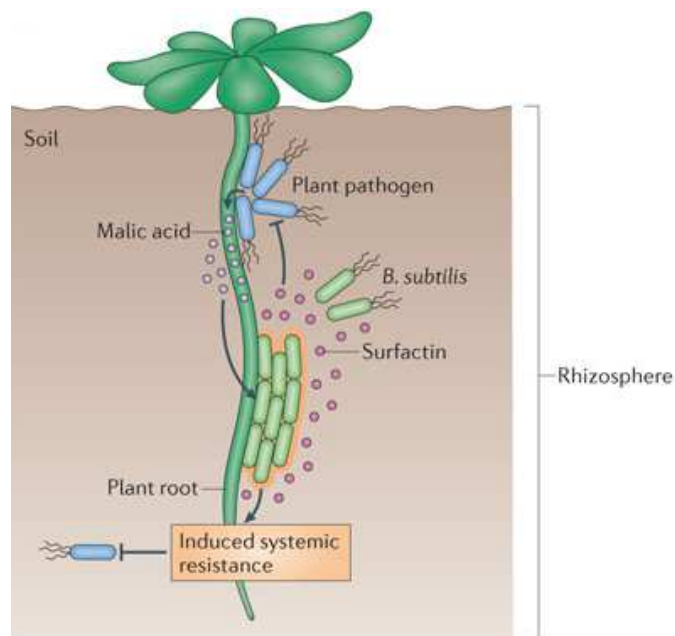


Figure 16 : Vision schématique des interactions entre les racines des plantes et *Bacillus subtilis*. (D'après (Vlamakis et al. 2013)).

7. Le poly- γ -glutamate-interaction biologique

En vue des connaissances actuelles sur la capacité de fixation des métaux du poly- γ -glutamate et ses applications en bioremédiation (Shih et al. 2001), nous avons décidé dans cette étude de nous concentrer essentiellement sur cette molécule du sécrétome et ses interactions potentielles avec les nanoparticules métalliques. La partie suivante détaillera sa production, ses propriétés et ses applications.

7.1 Définition et propriétés biologiques

7.1.1 Définition

Contrairement aux protéines qui sont composées de différents acides aminés reliés par des liaisons α , le poly- γ -glutamate est composé d'un seul type d'acide aminé, l'acide glutamique, relié par des liaisons γ , exposant ainsi deux groupements réactifs : COOH et le NH_2 (Figure 17) (Candela & Fouet 2006). Sa taille varie entre 160 kDa et 1500 kDa. Un modèle théorique de sa conformation a été établi par Zanuy and Aleman, qui suppose que le PGA en solution aqueuse (à $\text{pH} < 7$) forme une hélice alpha stabilisée par des liaisons hydrogène (Zanuy & Alemán 2001) (Figure 18). Cependant, cette conformation peut varier en fonction du pH, avec la formation d'un feuillet beta à $\text{pH} > 7$ (Joyce et al. 2006). Dans notre étude ces changements de conformation sont importants, en effet le feuillet β permet une meilleure exposition des charges négatives et donc potentiellement une meilleure affinité avec l'ion argent.

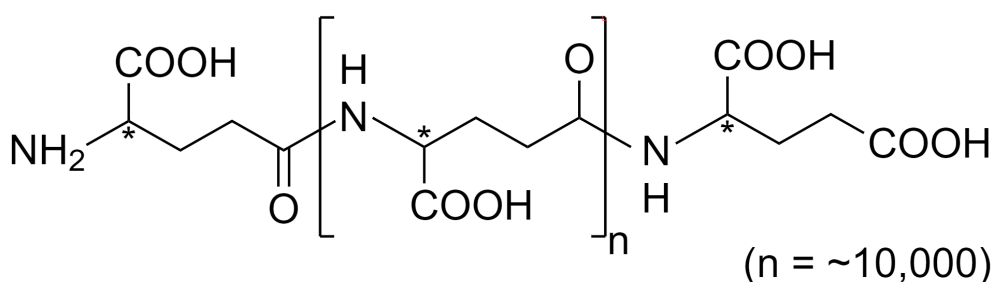


Figure 17 : La formule structurale du Poly- γ -glutamate.
(D'après (Ashiuchi 2011)).

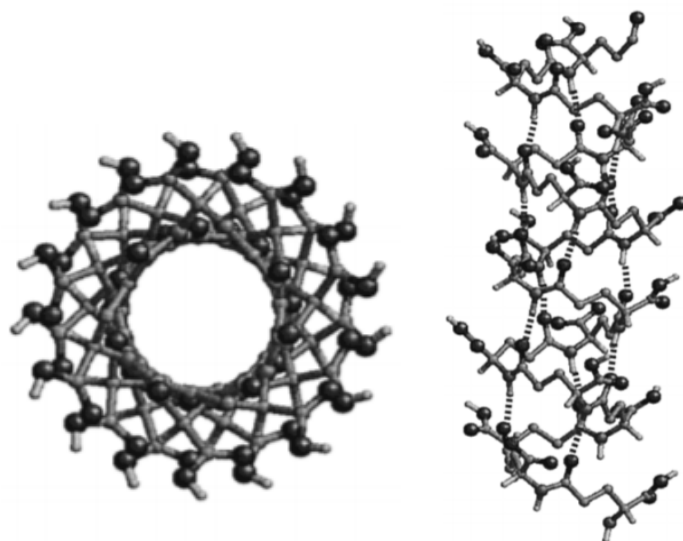


Figure 18 : Modèle structural en hélice alpha proposé par Zanuy et Alemán.
(D'après (Zanuy & Alemán 2001)).

7.1.2 Propriétés biologiques

Le poly-gamma-glutamate a été décrit pour la première fois au début du 20^{ème} siècle pour son rôle dans la pathogénie chez *Bacillus anthracis*. Le rôle physiologique du γ -PGA reste cependant encore mal connu et est dépendant de l'organisme ainsi que de l'environnement. Deux types de γ -PGA existent : celui qui est lié à la capsule bactérienne et celui qui est sécrété. Le γ -PGA lié à la capsule est connu pour son rôle protecteur contre les phages, les peptides antimicrobiens mais également pour permettre une meilleure virulence en échappant à la phagocytose (Kocianova et al. 2005). Le γ -PGA sécrété est connu pour diminuer la toxicité des métaux et la salinité en séquestrant les ions métalliques et les cations, être une source de carbone en cas de carence (Kimura et al. 2004), résister à des environnements hostiles et aider à l'absorption de certains nutriments (Zhang, Yang, et al. 2017). *Bacillus subtilis* produit ces deux types de γ -PGA, dans notre étude nous nous sommes intéressés uniquement au γ -PGA sécrété.

7.2 Mécanisme de synthèse du γ -PGA

Trois étapes sont nécessaires pour la synthèse du PGA : la racémisation, la polymérisation et la dégradation (Figure 19) (Ashiuchi 2013) .

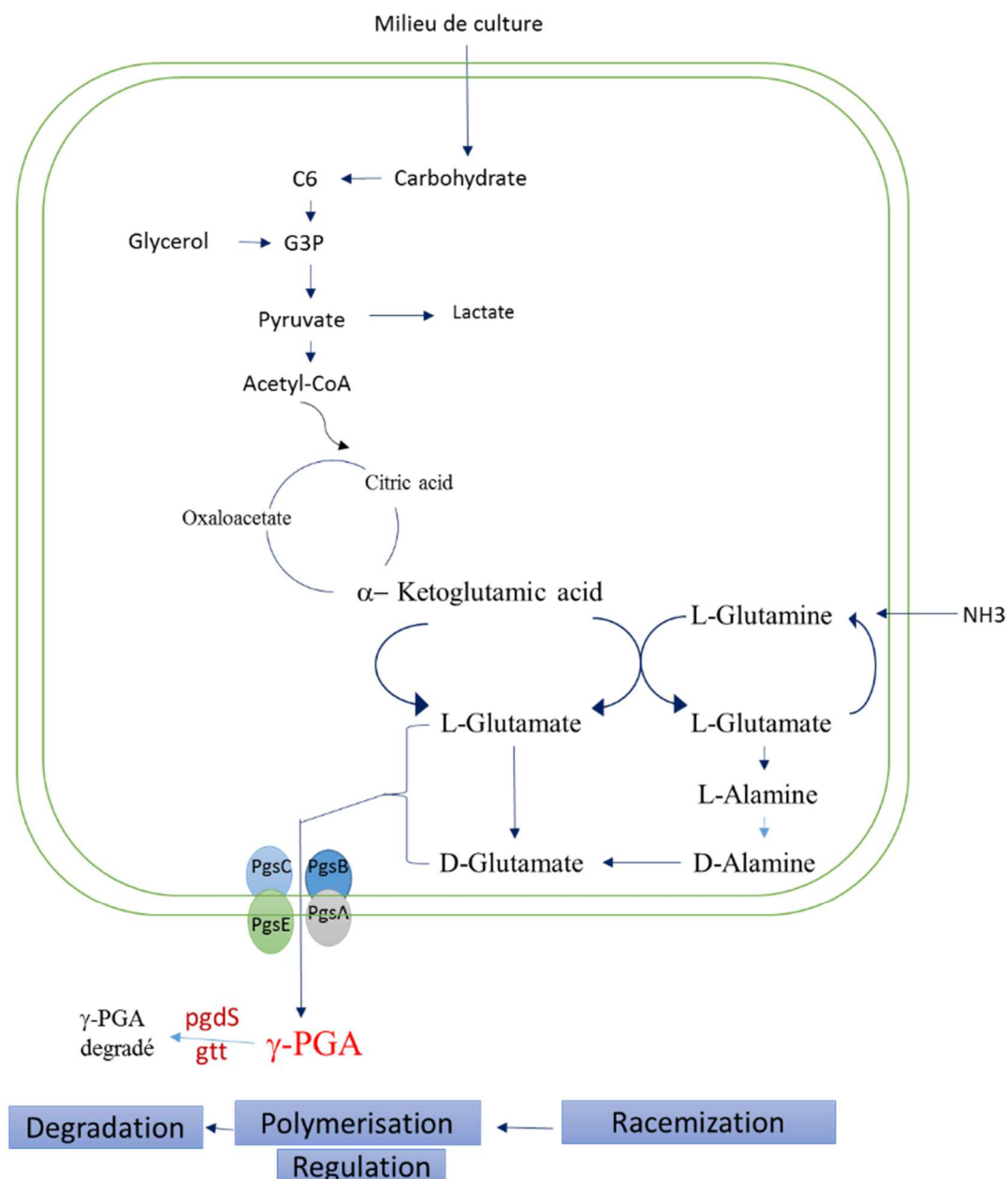


Figure 19 : Biosynthèse du PGA par *Bacillus subtilis*.
(Adapté de (Shih & Van 2001)).

7.2.1 Racémisation

Le γ -PGA provient des énantiomères L et/ou D glutamate. Concernant *Bacillus subtilis* le γ -PGA se forme à partir des deux énantiomères. La racémisation est le processus du passage du D en L ou du L en D glutamate, afin d'avoir les bons énantiomères pour produire le γ -PGA. Chez *Bacillus subtilis*, deux glutamates racémases ont été identifiées (RaceE et YrpC), cependant leur rôle exact reste mal connu.

7.2.2 Polymérisation

Le mécanisme de polymérisation du γ -PGA se fait en trois étapes (Figure 20). Etape (A) : transfert du groupement phosphoryle de l'ATP au groupement carboxyle du γ -PGA. Etape (B) : formation d'une liaison amide, après une attaque nucléophile du groupement carboxyle phosphorylé par le groupement amine d'un acide glutamique. Etape (C) clivage de la liaison entre site actif et la chaîne du γ -PGA, permettant ainsi l'ajout du monomère suivant ou la sécrétion du γ -PGA.

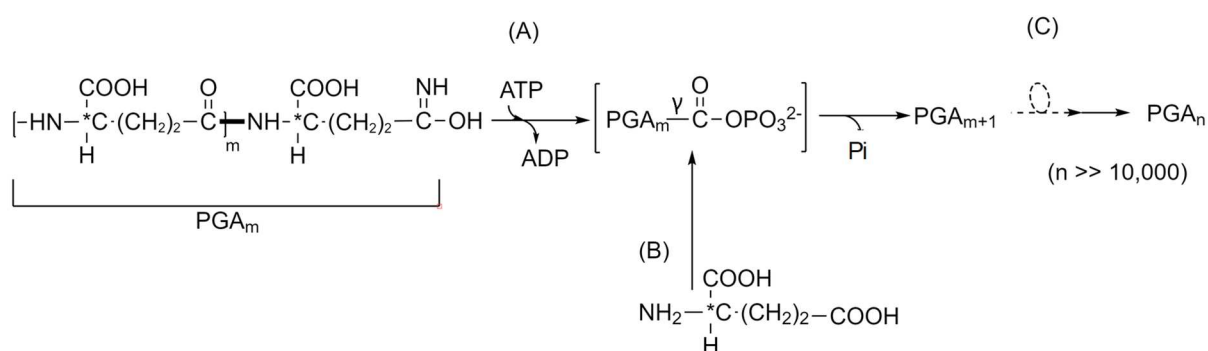


Figure 20 : Mécanisme de polymérisation pour la fabrication du γ -PGA.

(D'après (Ashiuchi 2013)).

Cette polymérisation est réalisée grâce à quatre protéines qui forment un complexe membranaire (Figure 19 et 21). Elles ont été identifiées pour la première fois chez *Bacillus anthracis* (CapBCAE) puis des homologues ont été trouvés chez *Bacillus subtilis* : PgsBCAE. Au sein de ce complexe membranaire, PgsB et PgsC forment le site catalytique qui permet les étapes A et B de la polymérisation, alors que PgsA réalise lui l'étape C.

Le rôle exact de PgsE reste lui mal connu, la production de γ -PGA sans PgsE a été identifiée comme possible, cependant une autre étude montre que la présence de Zn^{2+} rend la protéine PgsE essentielle pour la production du γ -PGA (Yamashiro et al. 2011). L'hypothèse est que PgsE permettrait de stabiliser le complexe membranaire PgsBCA.

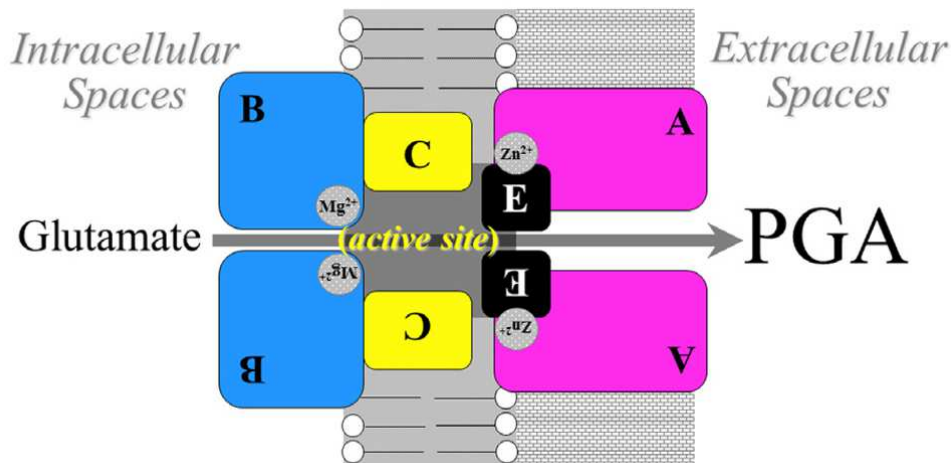


Figure 21 : Complexe protéique de polymérisation du γ -PGA.
(D'après (Ashiuchi 2013)).

Les différents gènes codant pour ces protéines sont sur le même opéron. Elles sont donc produites simultanément (Figure 22).

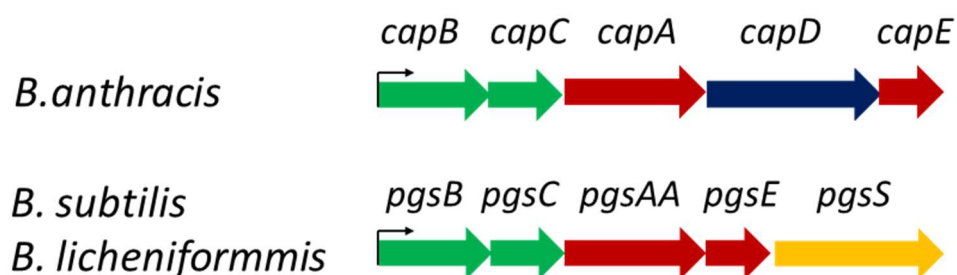


Figure 22 : Organisation génétique des gènes de production du γ -PGA.
(Adapté de (Candela & Fouet 2006)).

7.2.3 Dégradation

Deux enzymes sont capables de dégrader le γ -PGA, une endo- γ -glutamyl peptidase et une exo- γ -glutamyl peptidase (Figure 19) :

- L'endo- γ -glutamyl notée PgdS possède un groupement hydrophobe et une zone de clivage au niveau du N-ter qui lui permet d'être sécrétée dans l'environnement (Ashiuchi 2011). Une fois sécrétée, PgdS clive les longues chaînes de γ -PGA en fragment de 1000KDa à 20KDa. Le gène *pgdS* est sur le même opéron que les gènes de polymérisation de γ -PGA, il est donc exprimé simultanément.
- L'exo- γ -glutamyl (Ggt) clive le γ -PGA en glutamate qui est ensuite utilisé comme source de carbone en cas de famine. Elle est considérée comme indispensable pour la production du γ -PGA ancré dans la membrane mais pas pour le γ -PGA sécrété. Contrairement au *pgdS*, le gène *ggT* est localisé sur un cluster distant de l'opéron *pgdBCAE*. Il est essentiellement exprimé en phase stationnaire sous le contrôle du quorum sensing (ComQXPA).

7.3 Production et application du γ -PGA en industrie

Le γ -PGA est un polymère anionique soluble, biodégradable et non toxique pour l'environnement et pour l'homme, ce qui fait de lui un biopolymère intéressant pour divers domaines d'application comme (Bajaj & Singhal 2011; Shih & Van 2001):

- Assainissement des eaux usées : En raison de sa capacité à se lier à divers cations (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} or Mn^{2+}) (Ashiuchi 2013), le γ -PGA est un bioabsorbant potentiel pour l'élimination et la récupération des métaux lourds contenus dans les eaux usées par floculation. Plusieurs études montrent en effet l'efficacité de floculation du γ -PGA (Bajaj & Singhal 2011; Shih et al. 2001; Taniguchi et al. 2005). Le γ -PGA pourrait remplacer les floculants synthétiques actuellement utilisés dans le traitement des eaux usées, connus pour persister dans l'environnement. La littérature recense plusieurs mécanismes possibles qui utilisent le γ -PGA pour la dépollution des eaux. Pour exemple, Bhattacharyya et al ont développé des membranes de microfiltration des métaux, avec du γ -PGA. (Bhattacharyya et al. 1998). Bodnar et al. ont quant à eux décrit une préparation de nouvelles nanoparticules biodégradables basées sur la complexation du γ -PGA avec du plomb (Bodnár et al. 2008).

C'est cette capacité d'absorption pour de nombreux cations qui fait du γ -PGA un acteur potentiel du devenir des nanoparticules dans l'environnement.

Le γ -PGA est un polymère produit par *B. subtilis*. Au-delà de sa bonne représentation dans l'environnement, il peut aussi être considéré comme un modèle de biopolymère polycarboxylique et permettre d'évaluer les interactions des nanoparticules avec ce type de molécules produites par certains organismes.

- Médecine : Le γ -PGA est également utilisé en médecine, comme adjuvant pour la libération contrôlée des médicaments. Les groupements carboxyles de sa chaîne latérale offrent un point d'attachement pour la conjugaison de molécules thérapeutiques. Le médicament conjugué au γ -PGA permet par exemple une entrée plus facile au niveau des sites tumoraux puis une libération de la molécule thérapeutique grâce à ses propriétés biodégradables (Li et al. 1998 ; Singer 2005).

D'autres utilisations ont également été envisagées en médecine comme le remplacement de la fibrine dans les adhésifs chirurgicaux par le γ -PGA ou l'utilisation de celui-ci dans l'ingénierie tissulaire afin d'améliorer la résistance mécanique des tissus (Hsieh et al. 2005 ; Otani et al. 1999).

- Cosmétique : le γ -PGA est utilisé en cosmétique pour son pouvoir hydratant, son élasticité et sa miscibilité.
- L'industrie alimentaire : il permet d'améliorer la texture de certains produits, mais également d'augmenter la biodisponibilité de certains éléments comme le calcium. (Tanimoto et al. 2007).

En raison des nombreuses applications industrielles du γ -PGA, l'essentiel de la littérature le concernant étudie le rendement de production par fermentation bactérienne. En effet, malgré la possibilité de faire du γ -PGA synthétique, les industriels préfèrent utiliser la fermentation bactérienne. Ceci s'explique par l'impossibilité de produire du γ -PGA synthétique de grande taille. Le γ -PGA synthétique fait au maximum 100KDa alors que *Bacillus subtilis* est capable de faire du γ -PGA de plus de 10000KDa. Nous retiendrons de ces études que le milieu de culture influe sur la production ainsi que sur la taille du γ -PGA. Par exemple un milieu riche en carbohydrates va augmenter la production du glutamate et donc du γ -PGA (Figure 19) alors qu'un milieu riche en NaCl ou en sulfate d'ammonium va augmenter sa taille.

En raison de la capacité du γ -PGA à se lier aux métaux ainsi qu'à la présence de ses groupements réactifs (COOH), nous avons fait l'hypothèse dans cette étude que le γ -PGA pourrait former un complexe avec les Ag-NPs. Ce type d'interaction a déjà été identifiée comme possible dans l'étude de Nidya et ses coauteurs, qui montrent une interaction entre les groupements carboxyles de l'acide glutamique et les nanoparticules d'argent (Nidya et al. 2015). Pour donner suite à la première partie qui s'est concentrée essentiellement à l'impact de l'environnement sur les nanoparticules rejetées dans le sol, cette étude se poursuit dorénavant en s'intéressant à l'impact des nanoparticules sur les organismes biologiques du sol, et plus particulièrement sur le devenir de *Bacillus subtilis*.

Partie 2 : Effets des nanoparticules sur *Bacillus subtilis*

Afin d'étudier l'impact des nanoparticules sur *Bacillus subtilis*, une approche protéomique a été choisie et nous a permis de révéler de nombreuses modifications dans les mécanismes de réponse au stress.

Cette seconde partie de l'introduction a donc pour but de détailler dans un premier temps, les différents mécanismes antibactériens des nanoparticules, puis, dans un second temps, les différents mécanismes de réponse de *Bacillus subtilis* aux nanoparticules qui ont été observés lors de cette étude.

1. Effets antibactériens des nanoparticules

En raison de l'émergence des résistances aux antibiotiques, une autre stratégie de lutte contre les bactéries est nécessaire. Une de ces stratégies est l'utilisation des nanoparticules métalliques. Les paragraphes suivants détaillent donc les différents modes d'action antibactériennes des Ag-NPs, ZnO-NPs et des TiO₂-NPs. Les nanoparticules métalliques peuvent affecter les bactéries par l'intermédiaire de multiples mécanismes (Durán et al. 2016; Mijndonckx et al. 2013). Les plus connus sont : l'induction d'un stress oxydatif, l'interaction et/ou la perméabilisation de la membrane cellulaire, la génération d'ions métalliques, les interactions avec les protéines et /ou avec l'ADN (Figure 23). Ces différents mécanismes seront détaillés dans cette partie.

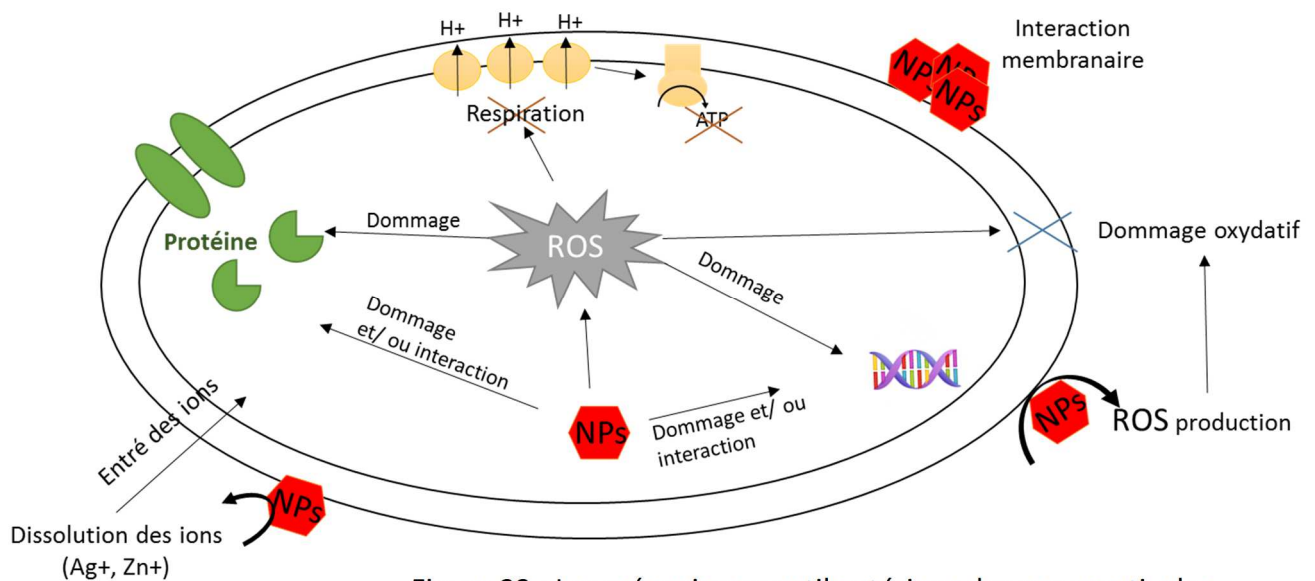


Figure 23 : Les mécanismes antibactériens des nanoparticules.
(Adapté de (Mijnendonckx et al. 2013)).

1.1 Rôles des ions métalliques libérés par les NPs sur l'activité antibactérienne

L'impact de la libération d'ions lors de la dissolution des NP sur la toxicité est bien connu (McShan et al. 2014). Lok et al montrent qu'une libération d'argent ionique par les Ag-NPs cause la mort cellulaire de *E.coli* suite à une déplétion d'ATP et une déstabilisation de la membrane (Lok et al. 2006). De même, Smetana et al. montrent que l'ajout de NaCl dans le milieu de culture diminue la toxicité des Ag-NPs, en induisant une réduction de la libération de l'argent ionique suite à la formation d'un complexe AgCl (Smetana et al. 2008). Pourtant, la libération d'ions Ag^+ ne peut expliquer à elle seule la toxicité des Ag NPs. Par exemple Radzig et al. montrent une valeur de MIC (concentration minimal d'inhibition) différente entre les ions argent et les nanoparticules d'argent, avec une toxicité plus importante pour les nanoparticules d'argent (Radzig et al. 2013).

Pour les ZnO-NPs, la toxicité semble essentiellement liée à la dissolution rapide et la libération de Zn^{2+} , sans effet supplémentaire dû à la forme nano (Franklin et al. 2007). Les ions Zn^{2+} perturberaient l'homéostasie de la cellule et provoqueraient des inhibitions d'activité enzymatique (Ma, Williams, et al. 2013; Xia et al. 2008).

Concernant les nanoparticules de TiO_2 leur dissolution est très faible, c'est en partie pour cela que leurs activités antibactériennes sont bien inférieures à celles des nanoparticules d'argent et de zinc (Adams et al. 2006).

1.2 Génération de ROS et perméabilité membranaire

Le stress majoritairement observé suite à l'entrée d'ions métalliques après dissolution des nanoparticules est le stress oxydatif. Ce stress est induit par la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS).

1.2.1 Les espèces réactives à l'oxygène

Les trois principaux ROS sont le superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^\cdot$) (Figure 24). En conditions physiologiques de croissance, l'ion superoxyde (O_2^-) est issu de la respiration, puis est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par dismutation. Cette réaction est soit spontanée soit réalisée par la superoxyde dismutase (SOD). Quant au radical d'hydroxyle ($OH^\cdot$), il est produit en présence de fer, grâce à l'ion superoxyde et au peroxyde d'hydrogène, *via* les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Figure 25).

Parmi ces trois ROS, l'hydroxyle ($OH^\cdot$) est le composé le plus réactif et le plus toxique (Zuber 2009). En effet, il induit la formation de nouvelles espèces radicalaires, comme la malondialdéhyde et le 4-hydroxyl-nométal (*via* la peroxydation lipidique) qui modifient l'ADN et les protéines (Esterbauer et al. 1991). La réactivité de l' H_2O_2 est quant à elle spécifique des résidus cystéines et méthionines des protéines (Gilbert 1990). L'oxydation de la cystéine par l' H_2O_2 conduit à la formation d'acide sulfénique (SOH), qui pourra ensuite être oxydé en sulfonique (SO_2H), ou en sulfinique (SO_3H), ou réagir avec une autre cystéine et faire des ponts disulfures modifiant ainsi la structure et/ou l'activité protéique. Enfin l'anion superoxyde O_2^- réagit avec le Fer. Il peut induire soit la réduction du Fer(III) en Fer(II) (réaction d'haber-Xeiss) soit la destruction des centres Fer-Soufre après oxydation du Fer(II) en Fer(III). La destruction des centres Fer-Soufre qui est responsable en grande partie de la toxicité de l'ion superoxyde (O_2^-), aura pour conséquence non seulement d'inactiver les enzymes à centre Fer-Soufre, parmi lesquelles se trouvent des activités essentielles au métabolisme cellulaire, mais également de déclencher une augmentation de la quantité de Fer libre dans la cellule, ce qui participera à la production d' $OH^\cdot$ (Réaction de Fenton, Figure 25).

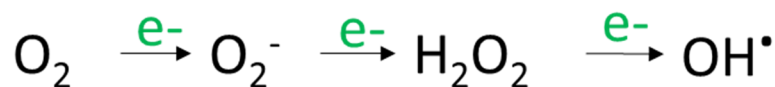


Figure 24 : Les espèces réactives à l'oxygène.

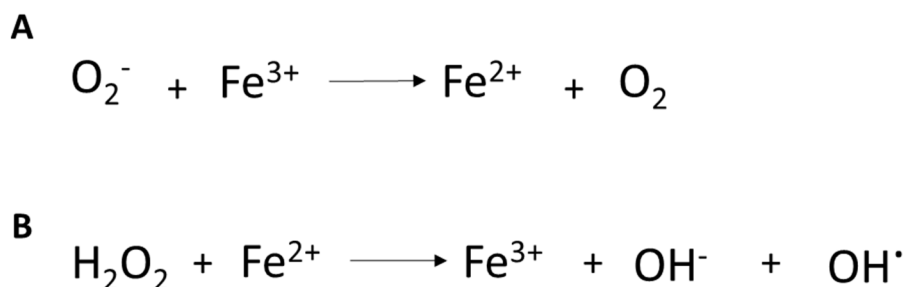


Figure 25 : Formation de radical hydroxyle par les réactions d'Haber-Weiss (A) et de Fenton (B).

1.2.2 Induction du stress oxydant après un stress aux nanoparticules

Une première étude montre qu'en absence d'oxygène ou en présence d'un antioxydant les nanoparticules d'argent ne sont plus toxiques pour *E.coli* (Xu et al. 2011). Cela suggère un rôle des ROS, mais cela pourrait aussi être dû à une inhibition de l'oxydation-dissolution des Ag-NPs. Dans une autre étude Kora et al. montrent que les lésions membranaires produites après un stress Ag-NPs sont similaires à celles produites par un stress H₂O₂, ce qui favorise l'hypothèse du rôle des ROS (Kora & Sashidhar n.d.). Par la suite de nombreuses études sur d'autres types de nanoparticules métalliques, vont confirmer le rôle du stress oxydatif sur l'effet antibactérien aussi bien chez les Gram⁺ que les Gram⁻, à l'aide de différents marqueurs de stress (Kim, Lee, et al. 2011; Marambio-Jones & Hoek 2010; Park et al. 2009).

L'induction du stress oxydatif peut avoir plusieurs effets délétères pour la bactérie, comme une déstructuration de sa membrane qui entraîne une perméabilité, ou des dommages à l'ADN (Figure 23) (Cabiscol et al. 2000; Radzig et al. 2013).

Le mécanisme de défense mis en place par la bactérie suite à un stress oxydatif est détaillé en partie 2 chapitre 2.

Pour certaines nanoparticules métalliques comme le TiO_2 , la production de ROS se fait par photocatalyse et nécessite donc des rayonnements UV (Wei et al. 1994). Ces nanoparticules apportent un intérêt industriel important en raison de leur possibilité d'activer et de désactiver la production de ROS. Cependant, une mort bactérienne étant également possible dans le noir, ceci indique que d'autres mécanismes inconnus pourraient être impliqués (Adams et al. 2006)

1.3 Interaction des nanoparticules d'argent avec la membrane, les protéines et l'ADN

L'induction de ce stress oxydant fait suite à une interaction entre les ions libérés par les NPs et des composants cellulaires comme les protéines, l'ADN ou même la membrane. En raison d'une activité antibactérienne à large spectre des Ag-NPs (Lara et al. 2011), et donc de leur intérêt industriel, la littérature recense de nombreuses études sur leurs activités antibactériennes. Les interactions entre les ions métalliques et les composants cellulaires ont donc été mises en évidence essentiellement pour les ions Ag, ils seront donc détaillés dans cette partie.

Une des premières interactions observées est celle entre les nanoparticules et la membrane bactérienne. Cette interaction se fait grâce aux protéines membranaires par complexation entre les ions argent et les groupements carboxyle, phosphoryle, amine et thiols (McShan et al. 2014; Morones et al. 2005). Ces interactions semblent être en partie responsables de l'induction d'un stress oxydant conduisant à la perte d'intégrité de la membrane cellulaire, après un stress aux Ag-NPs. Plusieurs études expliquent cette perte d'intégrité par une modification de la composition membranaire en acide gras après un stress au Ag-NPs, augmentant ainsi leur rapport Trans/Cis (Hachicho et al. 2014; Anas et al. 2013). La membrane bactérienne est un élément essentiel au bon fonctionnement cellulaire de la bactérie, elle permet de la protéger tout en laissant entrer les nutriments nécessaires à sa

croissance. Cette modification a pour conséquence une augmentation de sa perméabilité et donc une perte de son intégrité pouvant conduire jusqu'à la lyse cellulaire (Jung et al. 2008).

D'autres interactions avec de nombreux composants essentiels pour la survie de *Bacillus subtilis* ont également été observées dans le cytoplasme, suite à l'entrée de l'argent ionique. Ces interactions sont possibles en raison d'une forte affinité entre l'argent et le soufre. L'argent est capable de se lier aux groupements thiols des protéines ce qui perturbera leurs fonctions. Pour exemple, l'argent ionique est capable d'interagir avec des protéines impliquées, dans la génération d'ATP, dans la chaîne respiratoire ou dans le métabolisme de sucre, perturbant ainsi la production d'énergie essentielle pour la croissance bactérienne (Lok et al. 2006 ; Holt & Bard 2005). Outre les interactions protéiques, les Ag^+ une fois dans le cytoplasme peuvent également interagir avec l'ADN (Morones et al. 2005) et s'insérer entre les paires de bases (entre la purine et pyrimidine), provoquant ainsi une dénaturation de l'ADN et/ou une perturbation de la transcription de certains gènes essentiels (Vishnupriya et al. 2013). Par exemple, il a été vu que les gènes de réparation peuvent être affectés, provoquant alors un arrêt de la division cellulaire et/ou un mort cellulaire (Yang et al. 2009). Hsueh et al. montrent qu'un stress Ag-NPs change la structure même de l'ADN passant d'un ADN condensé à un ADN beaucoup plus lâche, cette modification peut entraîner une perte de la capacité de réplication (Hsueh, Lin, et al. 2015).

De nombreuses autres interactions entre les Ag-NPs et les constituants intracellulaires sont possibles mais encore mal connues. Plusieurs paramètres peuvent modifier ces interactions comme le potentiel zeta des nanoparticules, le pH et la force ionique du milieu (Khan, Mukherjee, et al. 2011 ; Khan, Srivatsan, et al. 2011). Compte tenu de l'impact de ces interactions sur la toxicité des Ag-NPs et de l'influence du milieu sur celle-ci, il est essentiel lors des études de toxicité de mieux caractériser l'état des nanoparticules ainsi que le milieu d'exposition.

Ces différentes interactions ont essentiellement été observées pour les nanoparticules d'argent, en raison d'études plus approfondies. Cependant, au vu des toxicités des autres nanoparticules métalliques, il est fort possible qu'elles se produisent également. Concernant les nanoparticules de zinc, comme les nanoparticules d'Ag, elles se dissolvent facilement et ont une forte affinité avec le soufre. Nous pouvons donc faire

l'hypothèse qu'elles sont elles aussi capables de se lier aux groupements thiols des protéines. Une première étude tend à confirmer cette hypothèse, les auteurs montrent une diminution de la toxicité des ZnO-NPs en présence de matières organiques dans le sol suite à une complexation des ions zinc (Li, Pokhrel, et al. 2011). De plus Ma et al. montrent la formation de ZnS dans les boues des stations d'épuration induisant une diminution de la toxicité des ZnO-NPs (Ma, Levard, et al. 2013; Ma, Levard, et al. 2014). Ces interactions sont cependant moins probables pour les nanoparticules de TiO₂ qui sont beaucoup plus stables.

La dissolution des nanoparticules semble donc un facteur essentiel pour la toxicité de certaines nanoparticules métalliques. Il est donc important de caractériser l'état de celles-ci dans l'environnement afin de mieux évaluer leur toxicité (Fabrega, Fawcett, et al. 2009). Cependant, la toxicité intrinsèque des nanoparticules ne doit pas être négligée.

2. Réponse cellulaire de *Bacillus subtilis* à un stress aux nanoparticules

Suite à de telles activités antibactériennes, *Bacillus subtilis* est capable d'induire de nombreux mécanismes de défense. Le mécanisme le plus souvent identifié est la réponse au stress oxydant qui permet de se défendre contre les espèces réactives à l'oxygène. Cependant, notre étude montre aussi des modifications de nombreux autres mécanismes tels que : la réponse stringente, la compétence ou la sporulation. Ces différents mécanismes seront tous détaillés dans cette partie.

2.1 Le stress Oxydant

Le stress oxydant comme en partie 2 chapitre 1 est un des stress majoritairement induit par les nanoparticules suite à la production d'espèces réactives à l'oxygène. Les mécanismes de réponse de *Bacillus subtilis* seront détaillés dans cette partie.

2.1.1 La réponse métabolique au stress oxydant

La réponse au stress oxydant se caractérise par la modulation de l'expression d'un nombre important de gènes (Zheng et al. 2001; Pomposiello et al. 2001). Dans un premier temps, la cellule met en place des mécanismes de défense impliquant l'induction des protéines à activité antioxydante (Figure 26). Ces protéines comprennent les catalases, les superoxydes dismutases, les peroxydases mais également les enzymes de la voie des thiorédoxines et de la voie du glutathion (Ceragioli et al. 2010) ou du bacillithiol chez *Bacillus subtilis* (Gaballa et al. 2010).

- Les superoxydes-dismutases catalysent la conversion de deux molécules d' O_2^- en H_2O_2 et O . (Figure 26). Pour cela elles utilisent les propriétés d'oxydoréduction des cations bivalents comme le fer ou le manganèse. Il existe trois types de SOD, elles sont classées en fonction de la nature du métal de transition : les superoxydes-dismutases fer dépendantes,

les superoxydes-dismutases manganèse dépendantes et les superoxydes-dismutases cuivre dépendantes (Figure 26).

- Les catalases réduisent deux molécules d' H_2O_2 en H_2O et O_2 , en utilisant le pouvoir catalytique du Fer (Figure 26) (Dowds 1994).

- Les thiol-peroxydases catalysent la réduction de l' H_2O_2 en H_2O , grâce à une cystéine réactive dans son site actif qui réalise une attaque nucléophile de la fonction peroxyde (Figure 26). Cette réaction entraîne la libération d'une molécule d'eau, mais également la formation d'un acide sulfénique au niveau de son site catalytique. L'acide sulfénique ainsi formé est conjugué avec une autre cystéine, afin de former un pont disulfure. Les thiol-peroxydases sont ensuite régénérées par réduction de ses ponts disulfures. Cette réduction se fait grâce au pouvoir réducteur du NADPH.

Deux types de peroxydases existent (Figure 27) : les peroxyrédoxines de la voie des thiorédoxines et les glutathion peroxydases de la voie glutathion. La voie des thiorédoxines utilise les thiorédoxines pour réduire les ponts disulfures intermoléculaires des peroxydases, alors que la voie du glutathion utilise les glutarédoxines pour réduire les ponts disulfures entre une peroxydase et un glutathion (Lu & Holmgren 2014). Chez *Bacillus subtilis* le glutathion semblerait être remplacé par le bacillithiol (Gaballa et al. 2010).

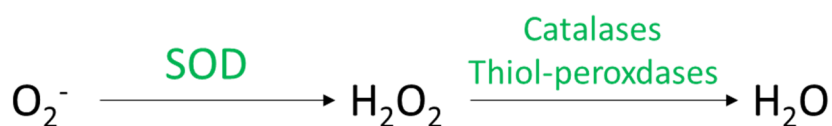


Figure 26 : La détoxification des ROS par la cellule.

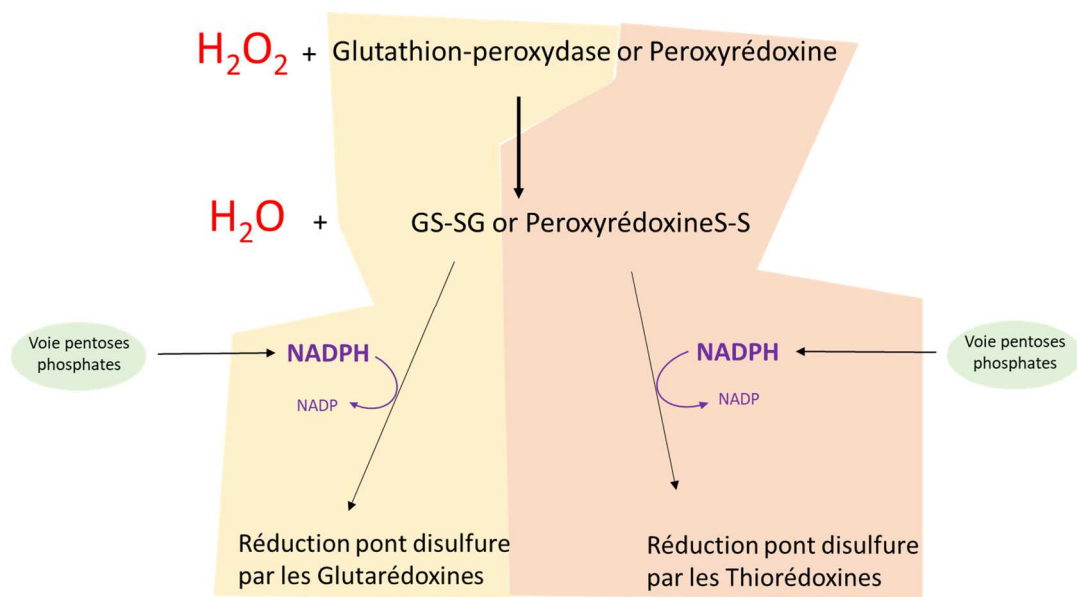


Figure 27 : Détoxification de l' H_2O_2 via les thiol-peroxydases.
Voie du glutathion en jaune, la voie des thiorédoxines en orange

De nombreux autres mécanismes de défense suite à un stress oxydant sont également mis en place par la cellule. La cellule va induire les mécanismes de réparation à l'ADN, les pompes à efflux, afin d'éliminer des toxines et peut réaliser une répression générale de l'anabolisme au profit du catabolisme.

2.1.2 Les gènes impliqués chez *Bacillus subtilis*

La réponse au stress oxydant chez *Bacillus subtilis* est contrôlée par au moins deux répresseurs, PerR et OhrR, dont l'inactivation permet l'induction d'antioxydant.

- PerR est un inhibiteur de l'expression de la catalase KatA qui est lui-même inhibé en présence d' H_2O_2 (Herbig & Helmann 2001).
- OhrR est un répresseur du gène *ohrA*, responsable avec *ohrB* de la majorité de la transcription des thiol-peroxydases (Fuangthong et al. 2001).

2.1.3 Les stress induisant un stress oxydatif

Différents stress, autres que l' H_2O_2 , sont connus pour induire un stress oxydatif, comme le paraquat, le sodium hypochlorite ou le diamide. Ces stress vont induire un stress oxydatif soit en générant des ROS, soit en perturbant la balance NAD^+/NADH , ou alors en induisant une peroxydation lipidique. Un autre paramètre d'induction d'un stress oxydatif a également été identifié suite à un stress à la diamide, c'est l'oxydation des groupements thiol (Leichert et al. 2003). Une autre étude confirme l'implication du stress thiol dans l'induction d'un stress oxydatif, dans cette étude les auteurs montrent que les gènes thiorédoxines, sont régulés par Spx, un régulateur du stress thiol (Nakano et al. 2003). D'autres stress comme la température, le pH et les sels peuvent induire le stress oxydant *via* la production d' O_2 , d' ONOO^- ou de NO.

2.2 Modifications du métabolisme central du carbone

Une réorientation du métabolisme central du carbone est un des autres mécanismes possibles de défense mis en place par *Bacillus subtilis* contre un stress. Cette partie a donc pour but de présenter brièvement : les mécanismes généraux du métabolisme du carbone, les différentes protéines impliquées, ainsi que les diverses possibilités de modulation.

Le métabolisme du carbone est essentiel pour la bactérie, il permet la production de son énergie *via* la production d'ATP. Il se compose de trois voies : la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates. Chacune de ces voies permet la production d'énergie et/ou d'intermédiaire anabolique essentiel pour le bon fonctionnement de la cellule.

2.2.1 La glycolyse

La glycolyse permet l'extraction de l'énergie *via* la dégradation des sucres. Elle a été identifiée et étudiée dès les années 1910 par Gustav Embden et Otto Meyerhof, c'est pourquoi elle est également nommée la voie d'Embden-Meyerhof. La glycolyse est une séquence métabolique comportant dix réactions qui transforment le glucose en pyruvate, permettant la production de l'énergie sous forme d'ATP. Elle est divisée en deux parties : une partie consommatrice d'énergie *via* la consommation de deux ATPs et une partie productrice d'énergie, *via* la production de pyruvate (Figure 28). La première partie transforme le glucose-6-phosphate (G6P) en dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), la seconde partie utilise le DHAP et le G3P ainsi produit pour donner du pyruvate (Figure 28).

Le bilan énergétique, si nous tenons compte de l'étape de phosphorylation du glucose, est de : 4 molécules d'ATPs produites - 2 molécules d'ATPs consommées + 2 molécules de NADH à pouvoir réducteur.

Cependant, le rendement énergétique du glucose va bien au-delà de la glycolyse. En effet, le pyruvate ainsi que le NADH(H⁺) produit lors de celle-ci sont ensuite utilisés comme source d'énergie. Le pyruvate est transformé en acétyl-CoA, puis entre alors dans le cycle de

Krebs (détaillé partie 2 chapitre 2.2.3), un cycle producteur d'énergie et d'intermédiaire anabolique. Le $\text{NADH}(\text{H}^+)$ est lui utilisé pour son pouvoir réducteur lors de la respiration aérobie afin de générer un gradient de protons converti en ATP.

Chez *Bacillus subtilis*, une des deux molécules de phosphoénolpyruvate (PEP) produites pendant la glycolyse est utilisée par le système phosphotransférase (PTS). Ce système est un transporteur qui permet l'entrée du glucose dans la cellule tout en le phosphorylant, pour cela il consomme un PEP et produit du pyruvate

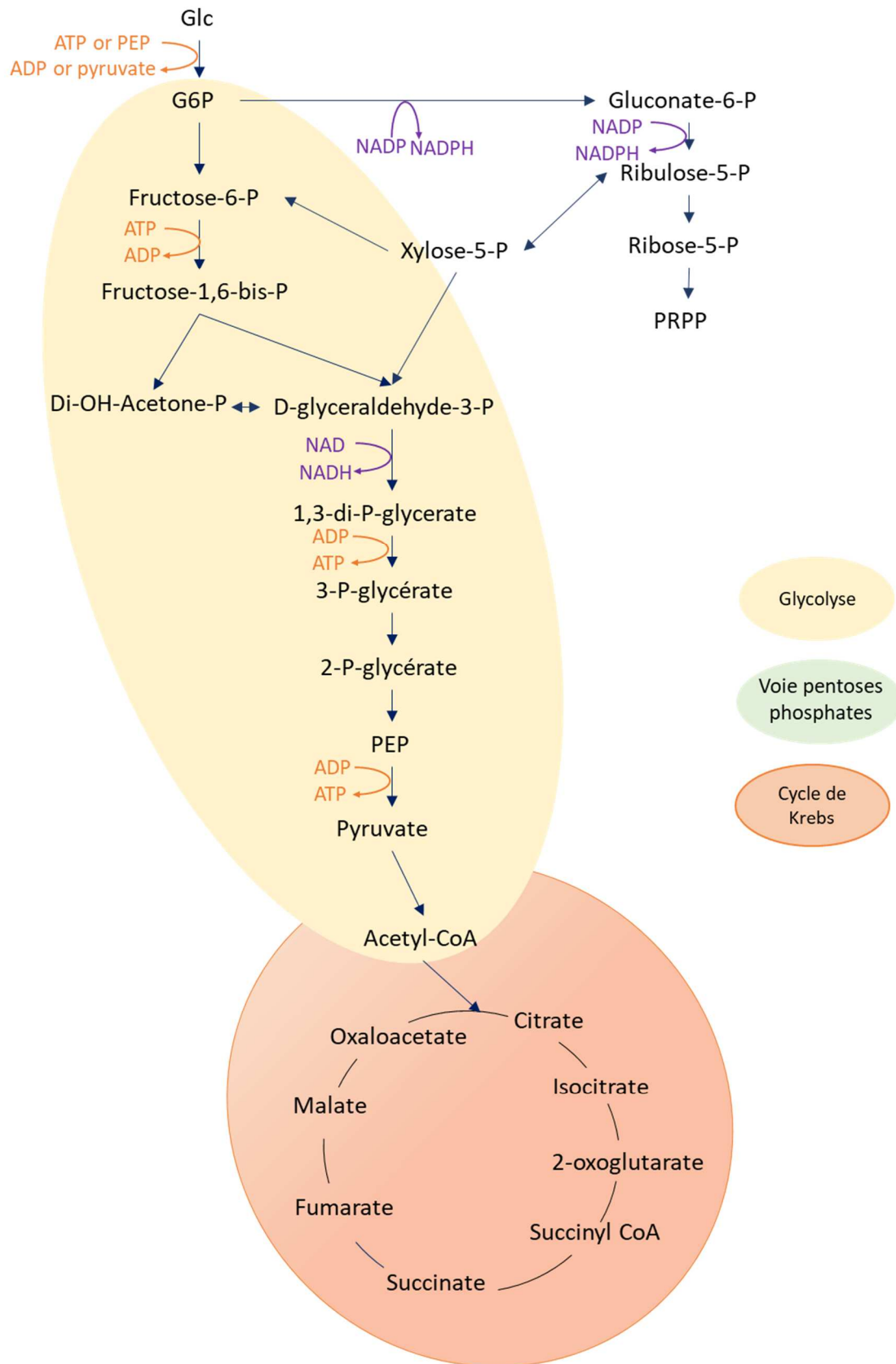


Figure 28 : Les trois voies du métabolisme du carbone chez *Bacillus subtilis*.
 PEP : phosphoénolpyruvate, PRPP : α-D-5-phosphoribosylpyrophosphate, PTS : phosphoénolpyruvate sucre phosphotransférase.

2.2.2 La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates peut être réalisée au début de la glycolyse et permet de convertir le G6P en F6P et G3P (Figure 29). Cette voie a trois rôles essentiels qui sont :

- La production de NADPH, utilisé dans les voies de biosynthèses.
- La production du ribose-5-phosphate utilisé lors de la biosynthèse des nucléotides.
- La production d'erythrose-4-phosphate, qui est un précurseur de la synthèse des noyaux aromatiques des acides aminés aromatiques.

La voie est divisée en deux phases, une phase oxydative et une phase non oxydative (Figure 29). La phase oxydative convertit le G6P en ribulose-5-phosphate permettant la formation de NADPH. La phase non oxydative convertit le ribulose-5-phosphate en F6P ou en G3P ou en erythrose-4-phosphate qui permettent d'intégrer dans la glycolyse.

Cette voie des pentoses phosphates peut aussi utiliser du gluconate, du ribose, de l'arabinose ou du xylose comme source de carbone. *Bacillus subtilis* peut répondre au stimulus environnemental ainsi qu'à ses besoins en choisissant de mettre en place la voie des pentoses phosphates ou d'utiliser uniquement la glycolyse.

Elle peut par exemple favoriser cette voie par rapport à la glycolyse après un stress, tout ceci dans le but d'augmenter la production NADPH, un élément essentiel pour se défendre par exemple contre un stress oxydatif.

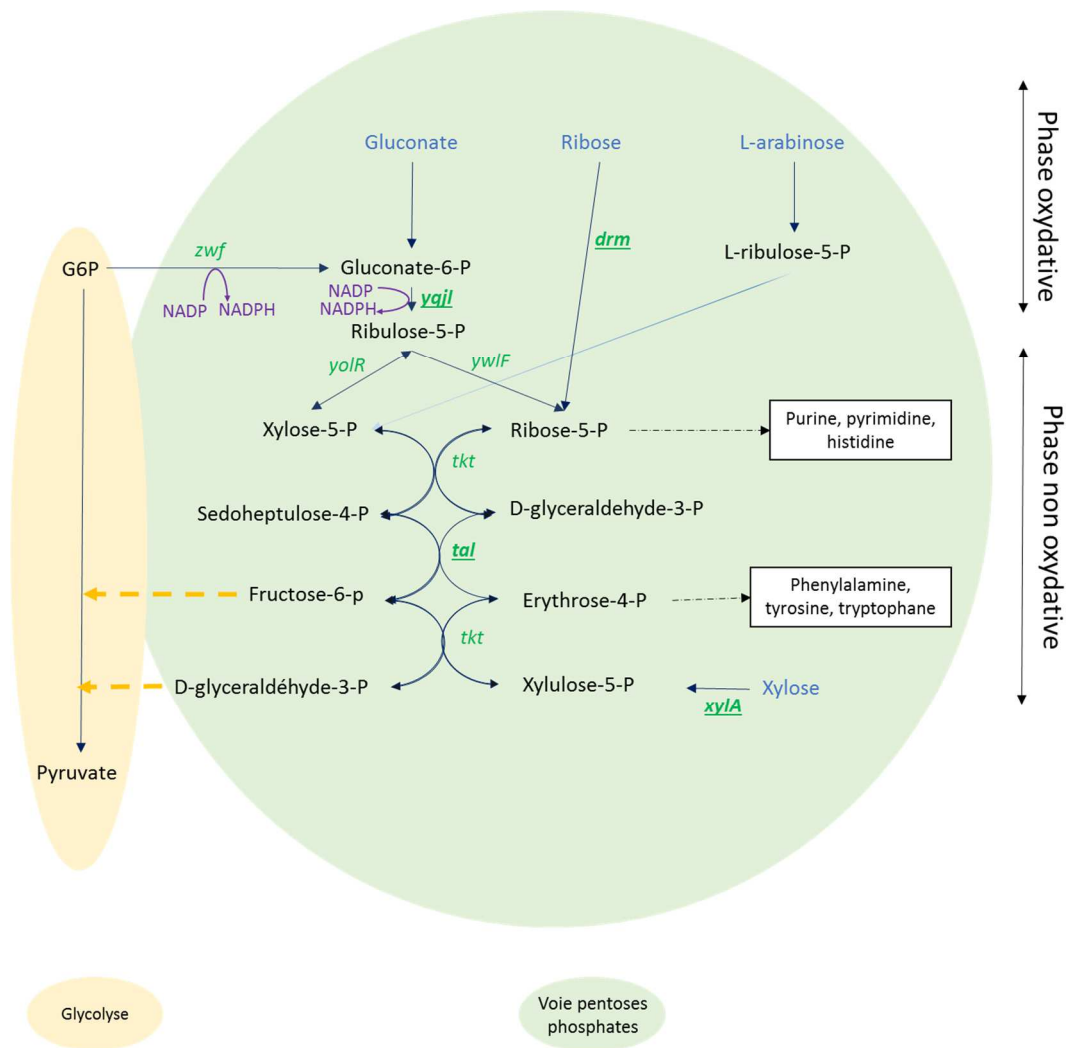


Figure 29 : Voie des pentoses phosphates chez *Bacillus subtilis*.

Les mots en bleu représentent les sources de carbone et en vert les gènes. Les gènes soulignés codent pour des protéines dont l'expression a été vue comme modifiée après un stress aux ZnO-NPs et ZnSO₄ (Article 3).

2.2.3 Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, qui fait suite à la glycolyse, est une séquence de neuf réactions qui utilisent de l'acétyl-coenzymeA (acétyl-CoA) et de l'oxaloacétate qui sera, quant à lui, régénéré à la fin du cycle (Figure 30). La première étape du cycle de Krebs consiste à transférer le groupement acétyle de l'acétyl-CoA sur l'oxaloacétate afin de former du citrate. Ce citrate sera ensuite transformé, conduisant ainsi à deux décarboxylations et une régénération de l'oxaloacétate. Le démarrage du cycle de Krebs est contrôlé par une quantité basale d'oxaloacétate. Chez *Bacillus subtilis*, deux enzymes majeures sont connues pour induire sa production : la pyruvate carboxylase (PckA) qui permet d'obtenir de l'oxaloacétate à partir du pyruvate et l'enzyme malique (YtsJ) qui permet d'obtenir du pyruvate à partir du malate.

Ce cycle a différents rôles dans le métabolisme du carbone. Tout d'abord, il permet la production d'énergie, soit directement sous forme d'ATP, soit indirectement en produisant du NADH. Ensuite, il permet la production de précurseurs pour la fabrication d'acides aminés, comme le 2-oxoglutarate un précurseur du glutamate. Comme décrit précédemment dans la partie 1 chapitre 7, le glutamate est un métabolite essentiel chez *Bacillus subtilis* pour la fabrication de nombreuses molécules. Celui-ci peut également être produit lors de l'assimilation d'une source d'azote comme l'ammonium ou la glutamine. Le 2-oxoglutarate fait donc le lien entre le métabolisme du carbone et le métabolisme de l'azote.

Pour conclure un cycle complet de Krebs permet :

- La production de nombreux précurseurs anaboliques.
- La production d'un ATP
- La production de quatre pouvoirs réducteurs sous forme de nucléotides réduits (tel que : NADH et FADH₂).

Lors d'une croissance avec un excès de glucose, la glycolyse se suffit à elle-même pour produire l'énergie nécessaire pour la cellule. De plus si besoin, la conversion de l'acétyl-CoA en acétate permettra de fournir un ATP supplémentaire. Le cycle de Krebs est donc essentiellement utilisé pour produire des précurseurs anaboliques et des molécules à pouvoir réducteur (NADPH, FADH₂).

Le cycle de Krebs est un mécanisme finement régulé en fonction des besoins. En effet, en cas de stress oxydants, *Bacillus subtilis* est capable de dévier le cycle de Krebs (Figure 30 flèches marrons) pour permettre de transformer directement le 2-oxoglutarate en oxaloacétate afin d'augmenter la production de NADPH.

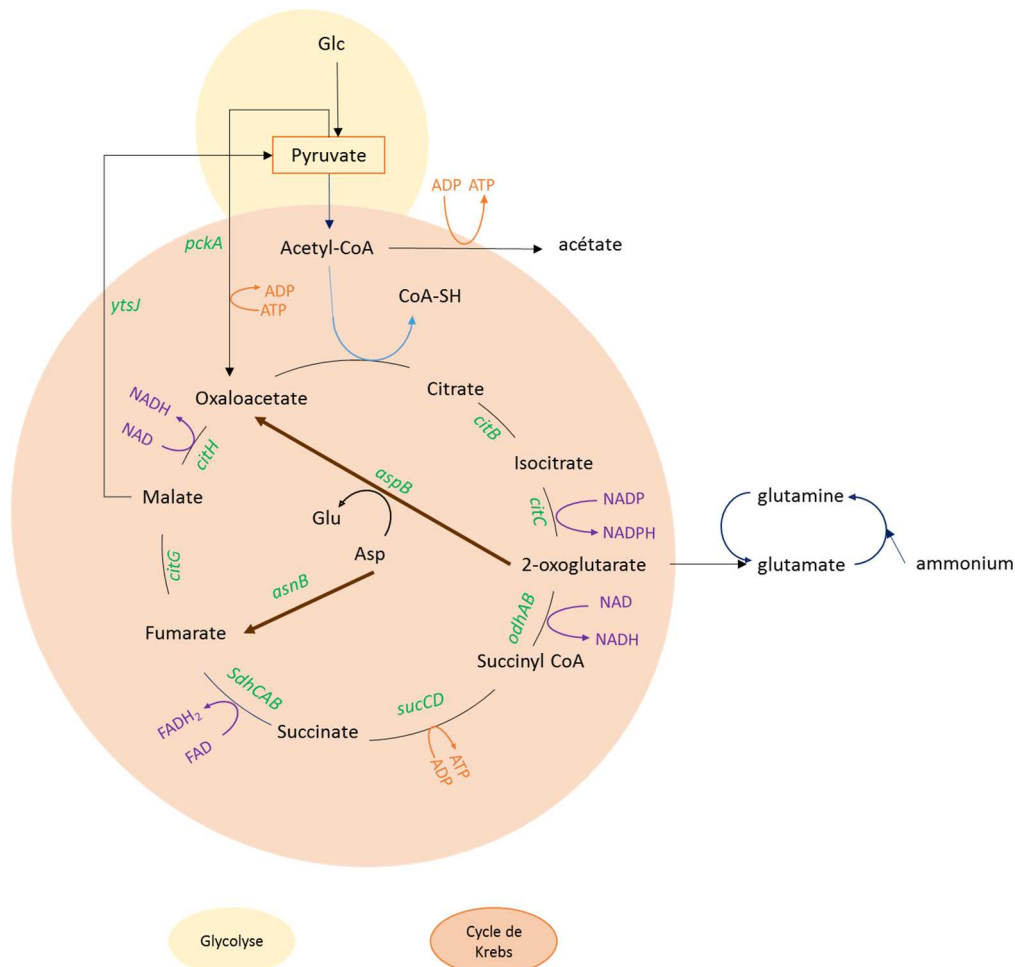


Figure 30 : Cycle de Krebs chez *Bacillus subtilis*.

Les mots en vert sont les gènes. Les gènes soulignés codent pour des protéines dont l'expression a été vue comme modifiée après un stress aux ZnO-NPs et ZnSO₄ (Article 3).

Pour conclure, *Bacillus subtilis* possède plusieurs possibilités pour la production d'énergie et de précurseurs anaboliques. En fonction des stress environnementaux, des besoins cellulaires ainsi que des mécanismes de défenses choisis, *Bacillus subtilis* est capable de choisir une voie plutôt qu'une autre mais également de réaliser des réorientations au sein

même de ces voies afin de produire les éléments essentiels pour répondre aux différents stimuli.

Bacillus subtilis possède également plusieurs autres mécanismes de défense contre un stress. Parmi ces mécanismes, trois ont été ciblés dans cette étude, la réponse stringente, la sporulation et la compétence.

2.3 La réponse stringente

La réponse stringente est un mécanisme de réponse aux stress induit par différents signaux. Les plus connus sont les signaux de carence nutritionnelle. En effet, lorsqu'une bactérie est confrontée à des carences nutritionnelles, que l'apport d'acides aminés est insuffisant pour assurer une synthèse protéique normale, la réponse stringente permet de modifier l'expression globale de ses gènes afin d'économiser de l'énergie et d'assurer sa survie. Cette réponse peut également être un moyen de défense mis en place par *Bacillus subtilis* en réponse à un stress environnemental. Cette partie détaillera ce type de réponse et mettra en évidence les différentes protéines impliquées.

Les mécanismes mis en place par la réponse stringente pour économiser de l'énergie sont une réduction massive de la synthèse d'ARN, tout en augmentant la dégradation protéique et la synthèse d'acides aminés. Les effecteurs principaux de la réponse stringente sont les nucléotides guanosine penta (pppGpp) et tétra phosphate (ppGpp), regroupés sous l'abréviation (p)ppGpp.

2.3.1 La synthèse du (p)ppGpp

Les (p)ppGpp, aussi appelés phéromones, sont accumulés lors de la réponse stringente. Ils sont synthétisés à partir du GTP et du GDP tout en utilisant de l'ATP comme donneur de phosphate. Le niveau de (p)ppGpp est inversement proportionnel au taux de croissance : il augmente rapidement quand la croissance diminue (lors de carence) et diminue rapidement quand les conditions redeviennent favorables à la croissance (Cashel & Gallant 1969). Chez *Bacillus subtilis*, trois (p)ppGpp synthases ont été identifiées : RelA, YwaC et YjbM (Nanamiya et al. 2008). RelA, également notée RSH, a la double fonction de synthèse et de dégradation du (p)ppGpp, comme SpoT chez *E. coli*. YwaC et YjbM sont quant à elles uniquement des (p)ppGpp synthases, leurs rôles dans la réponse stringente ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant, ce qui a été identifié, c'est que le gène *yjbM* est essentiellement exprimé lors de la phase exponentielle, alors que le gène *ywaC* est lui sous le contrôle du facteur sigma M (Eiamphungporn & Helmann 2008).

Le facteur Sigma M est un facteur d'activé suite à différents stress comme : la salinité, l'éthanol, la température, le pH mais également les stress antibiotiques qui perturbent la membrane. Même si le rôle de ces deux (p)ppGpp synthases est mal connu, leur impact sur la réponse stringente a bien été identifié (Nanamiya et al. 2008).

2.3.2 Mécanisme d'action du (p)ppGpp

Ce (p)ppGpp produit lors de la réponse stringente est une alarmone qui possède de nombreuses fonctions, dont le mode d'action varie d'un organisme à l'autre. Ces différentes fonctions sont des modifications de la transcription, de la traduction ainsi que de la réplication de nombreux gènes. Chez *Bacillus subtilis*, ces différentes fonctions sont la conséquence d'une diminution du niveau basal du GTP. Ce niveau basal est régulé par le (p)ppGpp de deux manières : d'une part suite à sa consommation lors de la synthèse de (p)ppGpp et d'autre part par l'inhibition de sa production (Figure 31). En effet, le (p)ppGpp est capable d'inhiber plusieurs enzymes impliquées dans la production de GTP : l'IMP déshydrogénase (GuaB) (Lopez et al. 1981), l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (Hpt) (Beaman et al. 1983) et peut-être même une troisième enzyme récemment identifiée, la guanylate kinase (Gmk) (Kriel et al. 2012) (Figure 31).

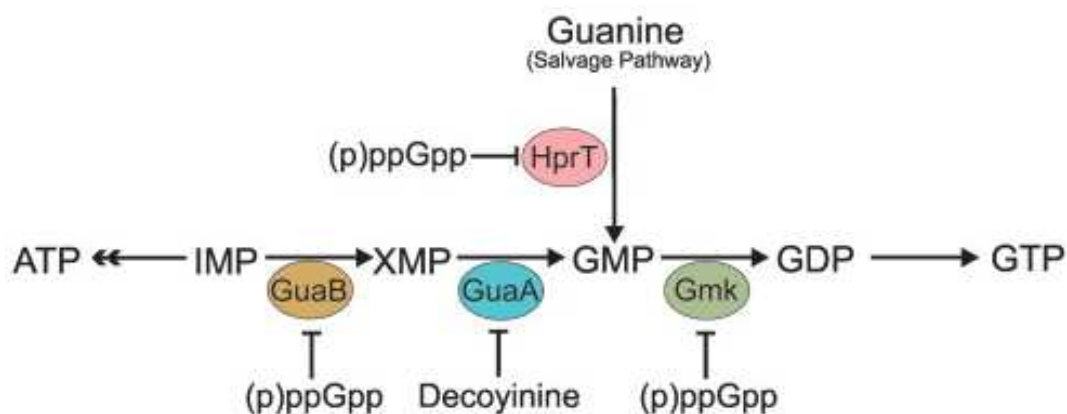


Figure 31 : Régulation du niveau basal de GTP par le (p)ppGpp.
(D'après (Geiger & Wolz 2014)).

La production de (p)ppGpp *via* le niveau basal de GTP qu'il induit peut avoir de multiples actions (Figure24) :

- Action sur la transcription : la transcription de nombreux gènes est régulée par le GTP. Les gènes dits iGTP sont activés par le GTP (Krásný & Gourse 2004; Tojo et al. 2008; Tojo et al. 2010; Krásný et al. 2008). D'autres sont régulés négativement par le GTP, notamment les gènes régulés par CodY, un régulateur essentiel de la réponse stringente en raison de son large champ de régulation génétique (Handke et al. 2008). Cette régulation sera donc détaillée dans le paragraphe suivant. Lors de la réponse stringente, en raison d'une diminution du niveau basal de GTP, les gènes iGTP verront donc leur transcription diminuer alors que les gènes régulés négativement par le GTP verront leur transcription augmenter.
- Action sur la traduction : Parmi les ARNs dont la transcription est régulée positivement par le GTP, il y a les ARNs ribosomiques (Krásný & Gourse 2004). Lors de la réponse stringente, la transcription des ARNs ribosomiques sera donc diminuée, provoquant ainsi une diminution du nombre de ribosomes disponibles et donc une diminution de la traduction.
- Action sur la réplication : Chez *B. subtilis*, le (p)ppGpp peut provoquer un arrêt des fourches de réplication, en agissant sur une primase, induisant ainsi un arrêt de la réplication (Wang et al. 2007).
- Action sur le métabolisme des acides aminés : Chez *B. subtilis*, le (p)ppGpp permet une activation de la biosynthèse des acides aminés grâce à l'induction d'une diminution du niveau de GTP.

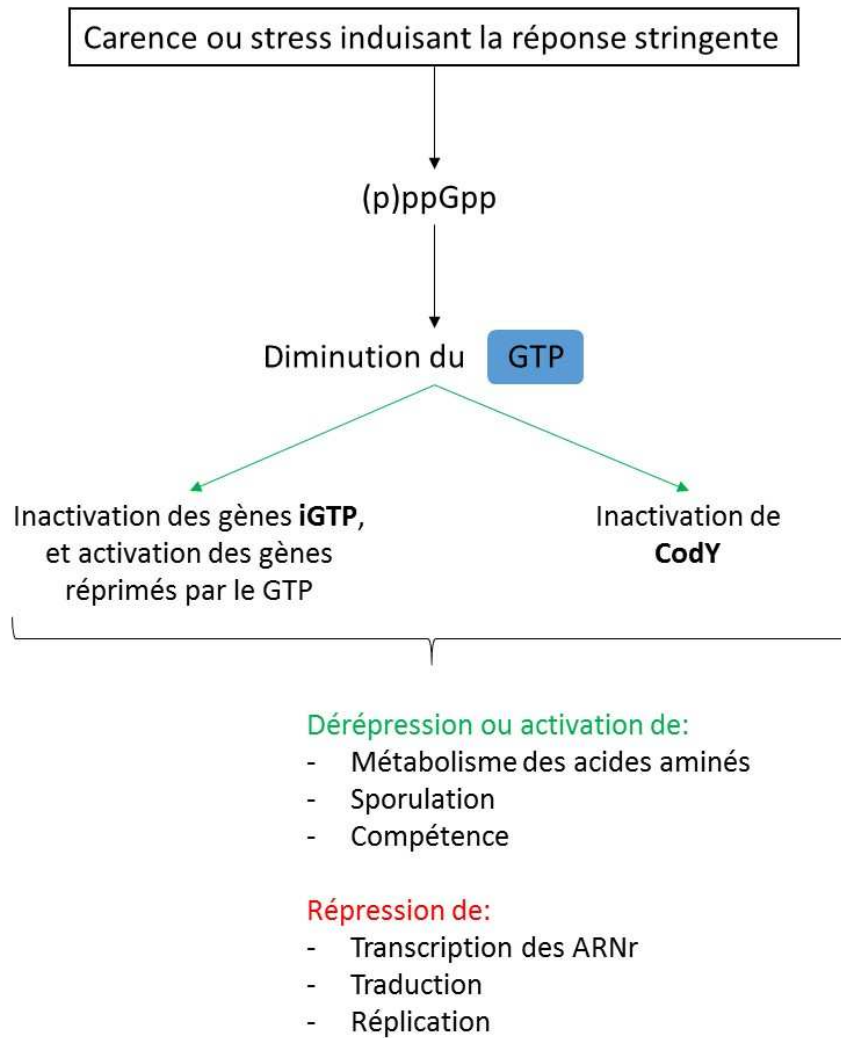


Figure 32 : Les mécanismes d'actions du (p)ppGpp lors de la réponse stringente.

2.3.3 Rôle du répresseur CodY dans la réponse stringente et lien avec la sporulation et la compétence

Parmi les gènes dont la transcription est régulée lors de la réponse stringente, nombre d'entre eux sont sous le contrôle du régulateur CodY. CodY est connu pour la répression de nombreux gènes par fixation de celui-ci sur l'ADN, empêchant ainsi la fixation de l'ARN polymérase (Belitsky & Sonenshein 2013). Cette fixation de CodY est régulée négativement lors de la réponse stringente en raison d'une diminution de GTP qui est un régulateur positif de cette fixation de CodY (Figure 33) (Handke et al. 2008).

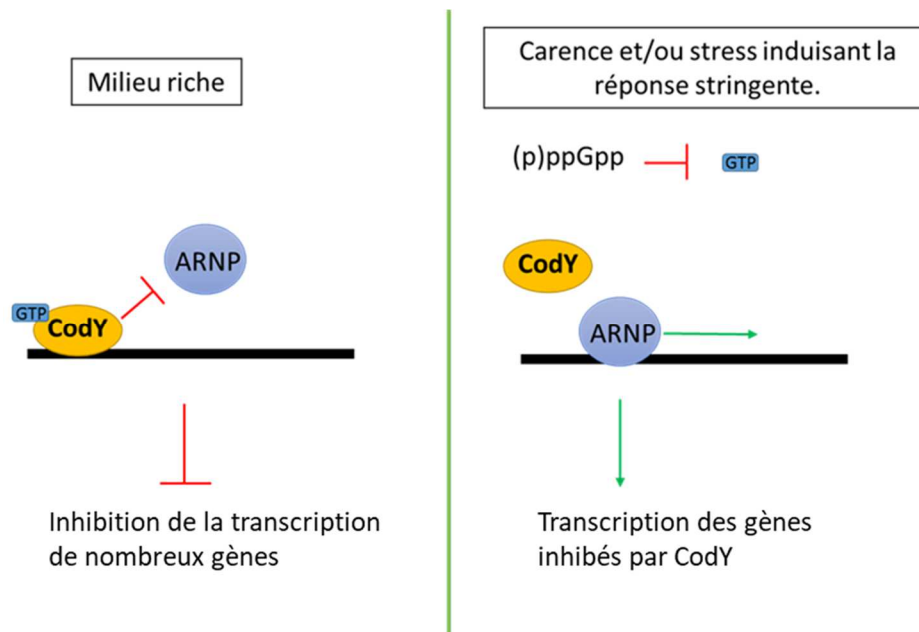


Figure 33 : Inactivation de CodY lors de la réponse stringente suite à l'inhibition du niveau basal de GTP par le (p)ppGpp.

Parmi les processus cellulaires régulés par CodY, deux ont été également vus comme modifiés dans nos études suite à un stress aux nanoparticules. Ces deux processus sont la sporulation et la compétence génétique. En effet, Inaoka et ces co-auteurs montrent qu'une perte de la capacité de sporulation et de la compétence génétique chez le mutant *rsh* peut être restaurée après l'ajout d'une mutation dans le gène CodY (Inaoka & Ochi 2002; Maamar & Dubnau 2005). L'hypothèse formulée est que la réponse stringente serait capable de réguler la sporulation et la compétence génétique, *via* la production de (p)ppGpp, un inhibiteur de la production de GTP lui-même un activateur du répresseur CodY. Ces deux processus cellulaires restent cependant régulés par d'autres mécanismes indépendants de la réponse stringente (exp : ComX pour la compétence) (Lazazzera et al. 1999), l'induction de la réponse stringente n'est donc pas toujours corrélée avec l'induction de ces deux processus cellulaires.

2.4 La compétence génétique et la sporulation

Parmi les mécanismes qui semblent être régulés par la réponse stringente il y a la compétence génétique et la sporulation. Ces deux mécanismes sont en effet des mécanismes qui peuvent être mis en place par *Bacillus subtilis* suite à un stress environnemental.

La sporulation et la compétence sont des processus cellulaires bien distincts, mis en place en cas de stress. Cependant, ces deux processus empruntent chez *Bacillus subtilis* des voies de régulation comparables *via* des peptides signaux, c'est pourquoi ils seront présentés en parallèle.

2.4.1 Mécanismes généraux de la sporulation et de la compétence.

- Sporulation : Certaines bactéries, comme *Bacillus subtilis* sont capables dans des conditions défavorables, de former des spores. Les spores bactériennes sont un type de cellules différenciées, métaboliquement inactives mais surtout très résistantes à différents agents physiques et chimiques (Figure 34). De plus, elles ont une longévité importante, elles permettent à *Bacillus subtilis* de « mettre à l'abri » son génome face à des conditions extrêmes, jusqu'à ce que des conditions de croissance favorables soient restaurées (Tan & Ramamurthi 2014). La formation d'une spore se déroule en plusieurs étapes contrôlées par un ensemble de régulateurs transcriptionnels (facteur σ) qui conditionnent le passage d'une étape à l'autre. Lorsque la spore détecte des conditions environnementales favorables, elle germera et reprendra alors son cycle végétatif.

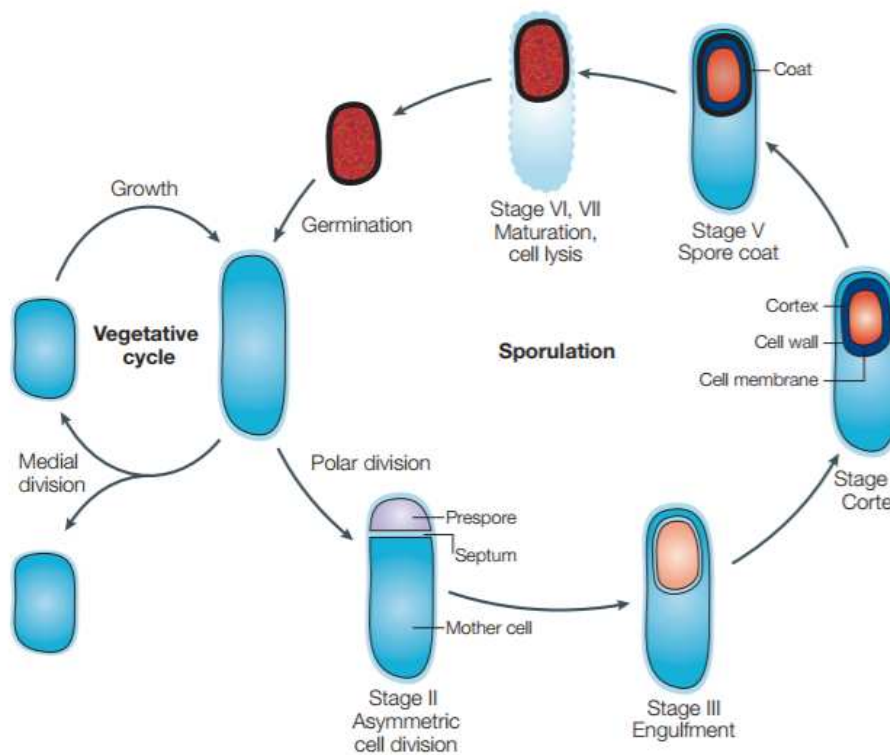


Figure 34 : Cycle de sporulation chez *Bacillus subtilis*.
(D'après (Errington 2003)).

- Compétence génétique : La compétence est la capacité d'une bactérie à faire entrer de l'ADN exogène. Certaines bactéries comme *Bacillus subtilis* sont capables d'absorber de l'ADN naturellement (Hamoen, Venema, et al. 2003). Cette absorption, qui sera suivie d'une recombinaison et/ou d'une réplication, est un mécanisme naturel mis en place par la bactérie afin d'adapter son génome aux modifications environnementales. En effet, nous avons vu dans notre étude (Article 4) que *Bacillus subtilis* induisait ce type de processus cellulaire, en réponse à un stress aux nanoparticules. Chez *B. subtilis*, l'internalisation de l'ADN exogène nécessite la mise en place d'une machinerie de transport constituée de nombreuses protéines (Figure 35) (Hamoen, Venema, et al. 2003). La compétence débute par la formation d'un complexe protéique (ComGC à ComGG) qui forme le pseudopilus (Chen & Dubnau 2004) permettant la fixation puis l'entrée de l'ADN dans la cellule. Cette formation du pseudopilus est aidée par deux autres protéines, ComGB et la NTPase ComGA (Dubnau & Provvedi 2000).

Une fois l'ADN fixé au pseudopilus celui-ci se rétracte afin d'amener l'ADN exogène vers une protéine membranaire ComEC (Maier et al. 2004) qui, aidée par ComEA (Provvedi & Dubnau 1999; Inamine & Dubnau 1995), transmet l'ADN à une nucléase NucA (Provvedi et al. 2001). NucA dégrade un brin d'ADN afin que seulement un des deux brins d'ADN entre dans la cellule. Ce brin d'ADN sera ensuite transféré dans le cytosol par la translocase ComFA (ATP dépendante) au travers d'un canal. Enfin, une fois dans le cytosol, l'ADN entrant est rapidement lié par une liaison simple aux protéines de liaisons (ssb), qui facilite le chargement de RecA à ADN (Yadav et al. 2012). RecA est un médiateur pour la recherche de séquences chromosomiques homologues à l'ADN entrant afin de réaliser une recombinaison.

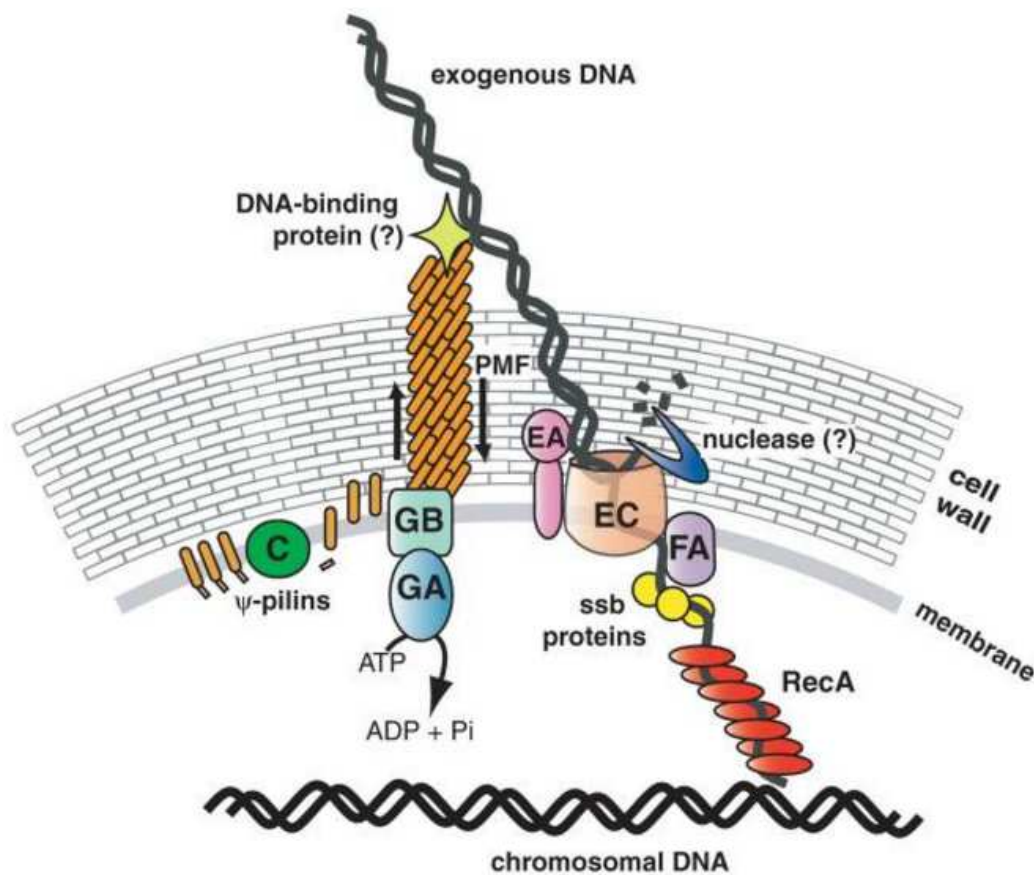


Figure 35 : L'absorption d'ADN chez *Bacillus subtilis*.
(D'après (Chen et al. 2005)).

2.4.2 Induction de la sporulation et de la compétence chez *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est capable de sentir et de répondre aux stimuli environnementaux, comme par exemple un stress nutritionnel ou une augmentation de la densité cellulaire. Une des réponses possibles à ces stimuli peut être l'induction de la compétence et de la sporulation.

Régulation de la sporulation (Figure 36) :

La transcription des gènes impliqués dans la sporulation est induite par le facteur de transcription Spo0A, qui est activé par phosphorylation. Suivant son degré de phosphorylation, Spo0A déterminera l'entrée en sporulation ou l'induction d'autres stratégies de survie. En effet, un faible degré de phosphorylation de Spo0A conduira plutôt à la formation de biofilm ou à du cannibalisme alors qu'un degré élevé de phosphorylation entraînera la sporulation, sachant que la sporulation est souvent l'ultime recours en raison de son coût en énergie. La phosphorylation de Spo0A est effectuée *via* plusieurs protéines « relais » dont les kinases Kin A, B, C, D, le régulateur Spo0F et la phosphotransférase Spo0B. Plusieurs régulateurs sont connus pour empêcher cette cascade de phosphorylation tels que les régulateurs Rap A, B, E. L'induction de la sporulation est donc possible qu'après l'inhibition de l'activité des phosphatases Rap *via* les phéromones PhrA, PhrC (aussi appelée CSF pour compétence and sporulation stimulating Factor) et PhrE. Ces phéromones sont produites sous forme inactive dans le cytoplasme, puis passent sous forme active lors de leur sécrétion. Sous leur forme mature, ces phéromones sont détectées par les bactéries voisines et entrent dans leur cytoplasme *via* le transporteur Opp. Une fois dans le cytoplasme, elles activeront la sporulation *via* l'inactivation des phosphatases Rap.

L'induction de la sporulation chez *Bacillus subtilis* est donc un phénomène complexe, contrôlé d'une part par des systèmes d'export de peptides de signalisation et d'autre part par un système d'import de ces mêmes peptides matures. Ce système d'import est le transporteur Opp, il est également connu pour être impliqué dans la régulation d'un autre phénomène, la compétence.

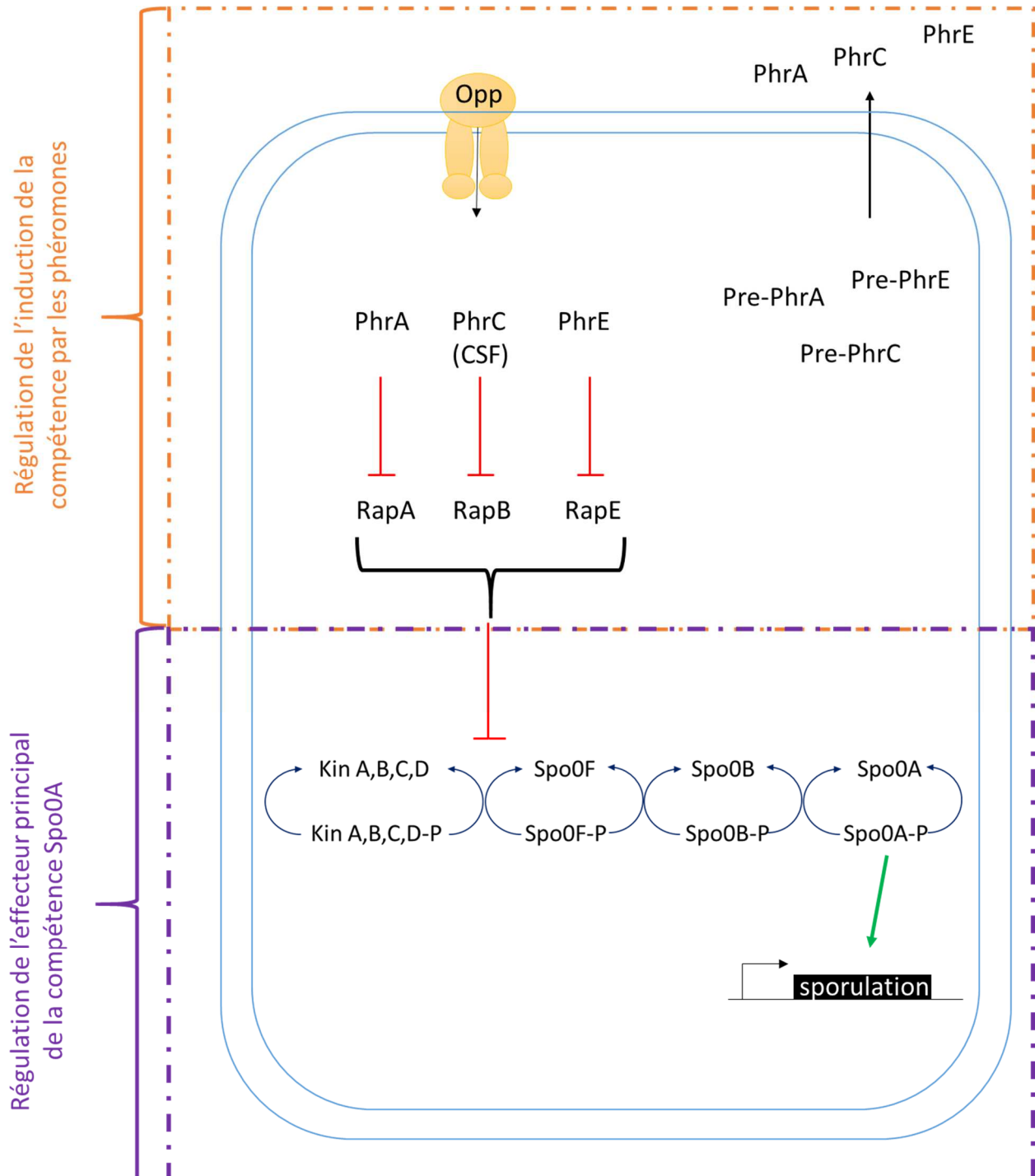


Figure 36 : Régulation de la sporulation chez *Bacillus subtilis*.

Régulation de la compétence (Figure 37) :

L'induction de l'expression des gènes impliqués dans le processus de compétence se fait *via* l'activation du régulateur transcriptionnel ComK (Hamoen et al. 1995). Celui-ci adopte sa conformation active en présence de ComS, dont l'expression dépend du régulateur ComA (Roggiani & Dubnau 1993). Pour induire la transcription de ComS, ComA doit être phosphorylé. Cette phosphorylation est soumise à deux types de régulations impliquant deux phéromones, ComX et PhrC (Tortosa et al. 2001; Magnuson et al. 1994) :

- La phéromone ComX qui est codée par l'opéron *comQ comX comP* sous une forme inactive, qui ne peut être sécrétée. Sa sécrétion est possible qu'après maturation et clivage protéolytique par une protéine membranaire ComQ (Schneider et al. 2002). Le peptide ComX sous sa forme mature, est alors sécrété puis détecté par les bactéries voisines, grâce à une protéine membranaire ComP (Comella & Grossman 2005). L'interaction ComX/ComP induit une autophosphorylation de ComP, qui transmettra ensuite son phosphate au régulateur ComA pour induire la compétence.
- Le CSF noté également PhrC est un pentapeptide qui intervient à la fois dans la régulation de la compétence mais également dans la régulation de la sporulation. Son activité va dépendre de sa concentration. À de faibles concentrations, il va stimuler la phosphorylation de ComA en inhibant l'activité de la phosphatase RapC (Solomon et al. 1996). Alors qu'à de fortes concentrations, il inhibera la phosphorylation de ComA par un mécanisme encore mal connu, probablement en interagissant avec ComP. L'internalisation de PhrC par les bactéries voisines est réalisée grâce à un transporteur Opp.

L'activation du régulateur transcriptionnel ComK induit par ces deux phéromones est régulée également par de nombreuses autres protéines :

- DegU : DegU sous sa forme déphosphorylée induit l'accumulation de ComK, en augmentant l'affinité de ComK sur son propre promoteur afin qu'il puisse s'auto stimuler (Hamoen et al. 2000).

- La protéine CodY (comme nous l'avons vu dans la partie 2.6.3) est un régulateur impliqué dans de nombreuses voies de réponses au stress. Concernant la compétence, CodY agit comme répresseur en réprimant les systèmes de transport de dipeptide (Slack et al. 1995) ainsi que le régulateur global de la compétence : ComK (Serror & Sonenshein 1996).
- Protéine Rok est un répresseur de la compétence *via* l'induction d'une protéine membranaire qui permet l'export de la subtilisine, un antibiotique qui agit comme répresseur direct de ComK (Hoa et al. 2002).
- La protéine AbrB possède deux rôles dans la compétence, d'une part elle inhibe l'expression de la protéine Rok et d'autre part, elle réprime l'expression de ComK (Hamoen, Kausche, et al. 2003).
- ComK : ComK est capable d'autoactiver sa transcription (Hahn et al. 1995).
- Le complexe protéolytique MecA/ClpC/ClpP est un régulateur post traductionnel de ComK (Turgay et al. 1998 ; Turgay et al. 1997 ; Persuh et al. 1999). En absence de ComS, ce complexe a la capacité d'hydrolyser ComK qui ne pourra donc plus induire les gènes de la compétence (Ogura et al. 1999).

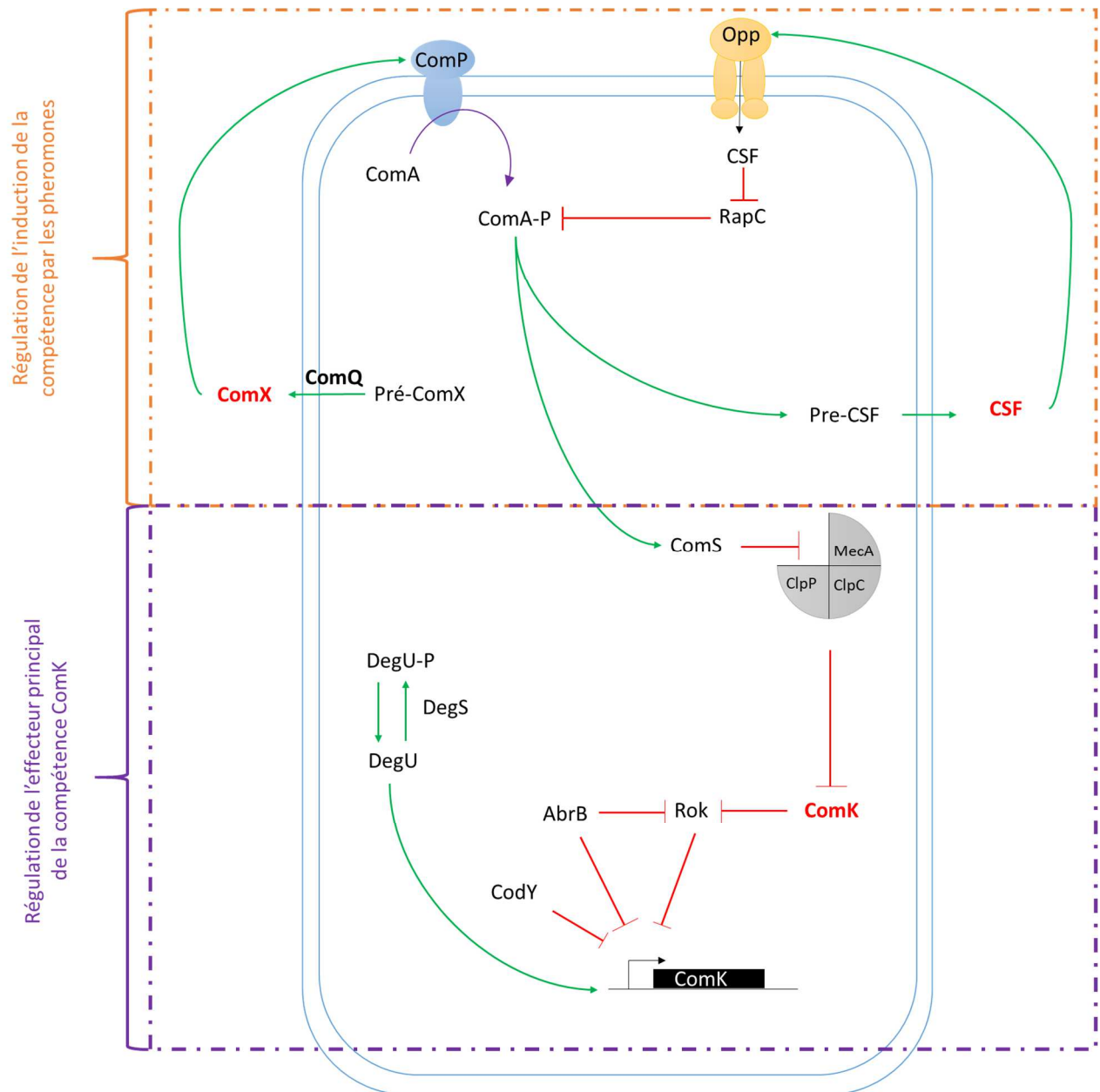


Figure 37 : Régulation de la compétence chez *Bacillus subtilis*.

2.4.3 Sporulation et compétence, deux processus cellulaires interconnectés

L'initiation de la sporulation ainsi que de la compétence font intervenir les mêmes récepteurs peptidiques, les récepteurs Opp. Ces deux mécanismes sont déclenchés suite à la sécrétion de phéromones des bactéries voisines qui, une fois entrées dans le cytoplasme ont toutes des cibles intracellulaires, hormis ComX. Une phéromone est même commune aux deux mécanismes : la phéromone PhrC également nommée CSF, qui, dans les deux mécanismes entre de la même manière par les récepteurs Opp.

Les transporteurs Opp sont un groupe particulier de la famille des transporteurs ABC, qui importent des peptides extracellulaires. Ces transporteurs sont des systèmes à plusieurs composantes constitués de deux domaines membranaires qui forment un canal (OppB OppC) et de deux autres domaines impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP (OppD et OppF). Une fois dans le cytoplasme PhrC va inhiber la déphosphorylation de ComA par RapC. (Figure29)

2.4.4 Le système Opp et App Chez *Bacillus subtilis*

L'indentification de l'induction de la sporulation ainsi que de la compétence après un stress aux nanoparticules observées dans nos études ont été faites suite à l'observation d'une modification de l'expression des protéines appartenant aux systèmes Opp et App.

Comme vu précédemment, différents peptides impliqués dans la régulation de la sporulation et de la compétence sont internalisés par le transporteur Opp. Ce même transporteur est connu également pour être impliqué dans le transport d'osmolyte comme la proline lors de stress oxydant. Chez *Bacillus subtilis*, un autre transporteur ABC qui présente des similarités avec le transporteur Opp a été identifié, le transporteur App. Le rôle de ces transporteurs dans la compétence et la sporulation n'est pas totalement élucidé. Cependant, une étude montre que l'induction du transporteur App chez une souche opp⁻ permet de restaurer la sporulation ainsi que la compétence. De plus la présence de ces deux transporteurs dans la même souche permet d'augmenter de 50% l'efficacité de sporulation et de 30% celle de la compétence (Koide & Hoch 1994; Levnikov et al. 2005). Ces deux transporteurs semblent l'un comme l'autre capables d'assurer la fonction de transporteur de phéromones permettant

d'induire la compétence et la sporulation. La spécificité ainsi que l'intérêt de synthétiser ces deux types de transporteurs restent cependant mal connus.

Matériels et Méthodes

Partie 1 : Caractérisation physico-chimique des nanoparticules et internalisation.

Comme détaillées ci-dessus les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules vont définir leur biodisponibilité et leur toxicité dans l'environnement. Il est donc désormais essentiel de caractériser ces nanoparticules dans les études de toxicologie. De nombreux outils existent, ceux utilisés dans cette étude sont détaillés ci-dessous.

1. Taille et diamètre hydrodynamique

1.1 Définition

La taille nominale : la taille nominale d'une nanoparticule est son diamètre. Celle-ci est mesurable par microscopie électronique en transmission (Figure 38).

Le diamètre hydrodynamique : C'est le diamètre effectif d'une particule, mesuré à partir de son mouvement brownien par DLS. Quand une particule est dispersée dans un liquide, une fine couche d'ions adhère à sa surface (Figure 38). Le diamètre hydrodynamique est donc généralement légèrement supérieur à la taille réelle de la particule.

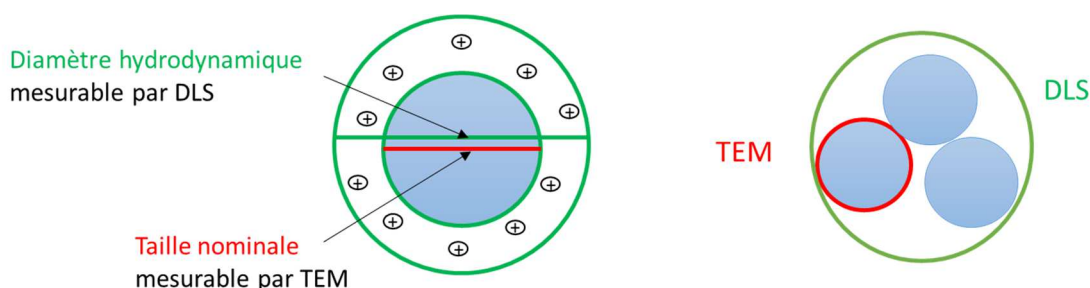


Figure 38 : Diamètre des nanoparticules mesuré en TEM et DLS.

1.2 Outils de mesures : TEM et DLS

La taille ainsi que le diamètre hydrodynamique et d'agglomération peuvent être observés par deux outils de mesure différents :

- Microscopie électronique en transmission : La microscopie électronique en transmission est une technique de microscopie basée sur le principe de diffraction des électrons qui permet une résolution jusqu'à 0.08 nm. Les informations obtenues seront donc d'ordre morphologique (taille des nanoparticules, forme, interaction...).
- La diffusion dynamique de lumière (dynamic light scattering, ou DLS) : c'est la technique la plus usuellement employée pour déterminer la taille globale de la population nanoparticulaire dans un milieu. Elle est basée sur la propriété de diffusion de la lumière des nanoparticules, soumises à des mouvements aléatoires (mouvement Brownien). Ces mouvements vont induire des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée, qui seront mesurées au cours du temps par un compteur de photons. Ces fluctuations qui sont directement liées au taux de diffusion des particules, lui-même dépendant de leur rayon hydrodynamique, permettent de déterminer la taille des particules en suspension. En effet, l'intensité diffusée par des grosses particules (moins mobiles) varie moins vite au cours du temps que pour les petites particules (Figure 39).

Le DLS se compose donc :

- D'une source laser émettant une lumière monochromatique à 250 nm qui va exciter les nanoparticules.
- De nombreux détecteurs répartis dans différents angles de l'échantillon pour mesurer les photons diffusés.
- D'un analyseur qui permet d'associer la fluctuation d'intensité lumineuse à la taille des nanoparticules.

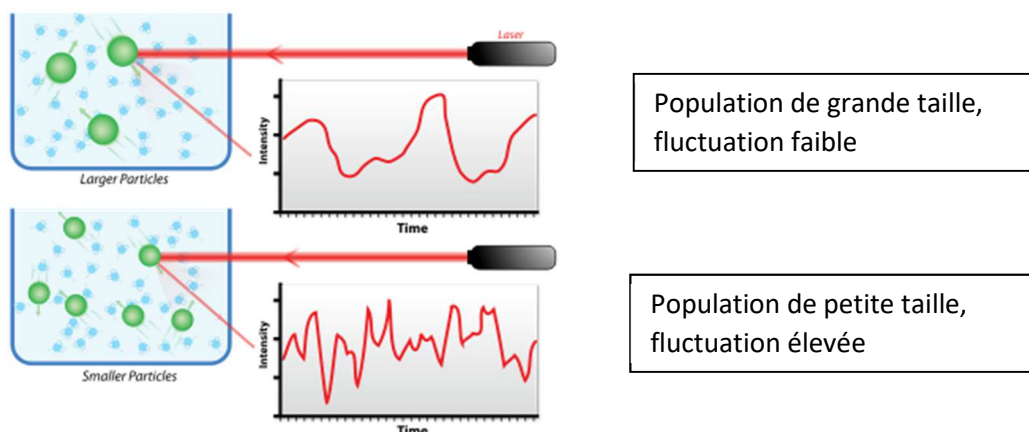


Figure 39 : Schéma représentatif de la mesure du diamètre hydrodynamique par DLS. (D'après Li Y, Barron AR diponi, <http://cnx.org/contents/3fc98dad-934d-45e6-a19f-c0a1cf440d43@2>).

2. Agglomération et agrégation

Ce paramètre défini en partie 1 chapitre 5.1 de l'introduction est mesurable également par les deux techniques TEM et DLS.

En effet, le diamètre mesuré en DLS est le diamètre d'un agglomérat ou d'un agrégat et non le diamètre d'une particule, mesurable uniquement dans le cas où il n'y a pas d'agglomération. Cette mesure peut se faire directement dans le milieu d'étude, aucune préparation de l'échantillon n'est nécessaire au préalable. Elle ne permet cependant pas de faire la différence entre un agglomérat et un agrégat. De plus le DLS n'est pas réalisable sur des échantillons polydisperses. Une autre technique est possible pour mesurer l'état d'agglomération de ce type d'échantillon, c'est l'AF4 (Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation ou fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique), cette technique est cependant beaucoup plus fastidieuse à mettre en place, nous avons donc fait le choix dans cette étude d'utiliser uniquement le DLS pour déterminer l'état d'agglomération/agrégation de nos échantillons.

Il est possible également de déterminer l'état d'agglomération et d'agrégation des nanoparticules par TEM, cependant des précautions doivent être prises lors de la préparation des échantillons pour ne pas modifier leur état, en travaillant en conditions cryogéniques par exemple.

Avantages et inconvénients de ces deux techniques

	+	-
DLS	- Mesure des agglomérats et agrégats dans le milieu d'expérimentation - Préparation et mesure facile	- Mesure de la taille nominale impossible en cas d'agglomération - Echantillon doit être monodisperse
TEM	- Mesure de la taille nominale des nanoparticules	- Préparation difficile en cas de forte agrégation ou agglomération, nécessité de faire des coupes ultrafines

3. Composition chimique et spéciation

Deux approches sont couramment utilisées pour caractériser les nanoparticules initiales et après exposition, afin d'étudier les changements de composition chimique et de spéciation du métal : la microscopie électronique en transmission (TEM) couplée à la microanalyse (EDX), et la spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS), respectivement.

3.1 TEM/EDX

En microscopie électronique en transmission (TEM), l'échantillon est excité par un faisceau d'électrons. Deux modes sont possibles : le mode TEM où toute la zone analysée est éclairée par le faisceau, et le mode STEM (scanning transmission electron microscopy) qui utilise un faisceau focalisé et procède à un balayage point par point pour l'obtention de l'image. Diverses interactions entre les électrons incidents et l'échantillon vont se produire. Ces interactions vont générer différents signaux, permettant non seulement d'avoir une image de l'échantillon mais également d'avoir une analyse chimique (EDX pour energy dispersive X-ray analysis) (Figure 42).

Les différents signaux détectés :

- Les électrons rétrodiffusés suite à une interaction élastique : Certains électrons incidents changent de direction lorsqu'ils rencontrent l'atome de l'objet et ressortent sans perte d'énergie. Ce sont les électrons rétrodiffusés, ces électrons permettent avec les électrons secondaires d'obtenir une image en TEM. La rétrodiffusion est plus efficace lorsque le faisceau rencontre des atomes à numéro atomique élevé. L'image en électrons rétrodiffusés permet donc de visualiser facilement les particules constituées d'atomes lourds, comme les Ag-NPs.

- Les électrons secondaires suite à une interaction inélastique : Dans ce cas les électrons incidents qui rencontrent un atome de l'objet, vont transférer une partie de leur énergie, conduisant ainsi à l'émission d'un électron de faible énergie par l'atome excité. Ce sont les électrons secondaires, qui permettront d'obtenir une image de l'échantillon.
- Les émissions de photon X : Suite à l'éjection d'un électron après une interaction inélastique, l'atome est sous un état excité instable. Pour revenir à un état stable un électron d'un niveau moins profond est transféré sur une couche plus profonde. L'énergie $E_{\text{couche profonde}} - E_{\text{couche moins profonde}}$ est libérée par l'intermédiaire d'un photon X spécifique de l'élément chimique (Figure 40).

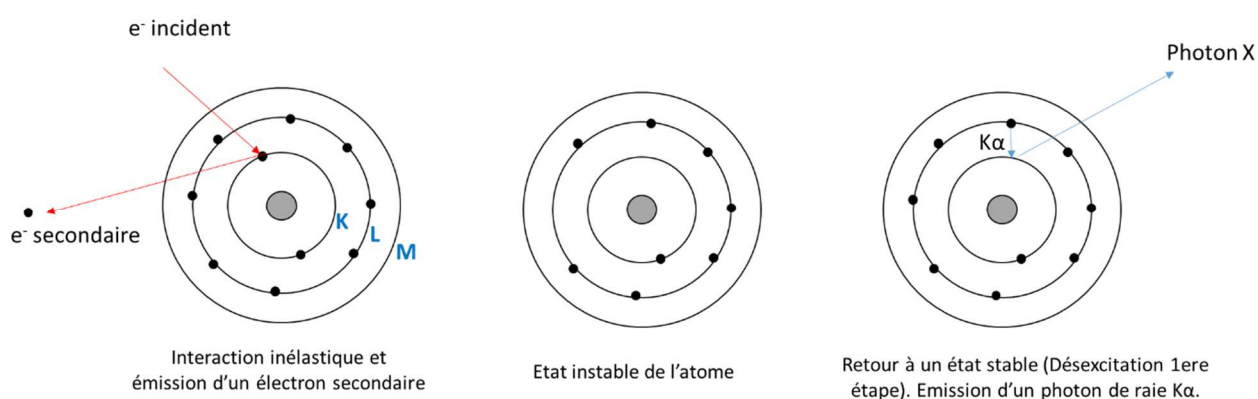


Figure 40 : Emission d'un photon X suite à l'excitation de l'atome.

Ces photons X permettent une analyse chimique de l'échantillon par EDX (Energy dispersive X-ray). Le détecteur EDX fournit soit un spectre de l'ensemble des photons X (Figure 41), soit une carte hyperspectrale où chaque pixel contient un spectre EDX, ce qui permet d'extraire des cartes élémentaires (Figure 42).

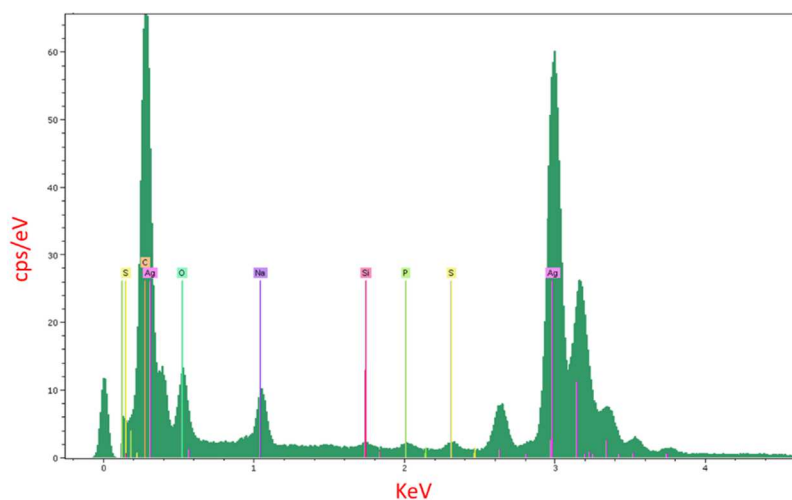


Figure 41: Exemple d'un spectre EDX.
Echantillon : Ag-NPs dans un milieu de culture bactérien.

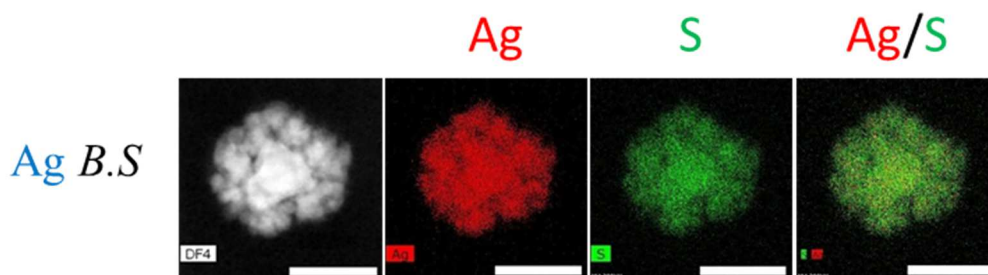


Figure 42 : Exemple d'une cartographie EDX.
Echantillon : Ag-NPs après incubation avec une culture de *Bacillus subtilis*.

- Les électrons diffractés : Ce mode est basé sur le comportement ondulatoire d'un électron. En effet, le faisceau d'électrons se comportera comme une onde : lorsqu'il rencontre une phase cristalline il est diffracté, selon la nature et de l'agencement des plans cristallins. En recueillant plusieurs faisceaux diffractés dans le plan focal (écran), on obtient alors un cliché de diffraction de l'échantillon qui permettra d'identifier la phase cristalline.

3.2 NanoXRF

La NanoXRF, permet, comme le TEM-EDX, d'acquérir des cartographies élémentaires d'un échantillon. La résolution est moindre (50 à 100 nm environ pour la nanoXRF contre quelques nm pour le TEM-EDX), mais la limite de détection est meilleure (quelques centaines de ppb pour la nanoXRF et quelques dizaines de ppm pour le TEM-EDX). La nanoXRF est donc une technique de choix pour détecter les concentrations diffuses. Comme pour le TEM-EDX, la confection de coupes ultrafines est nécessaire.

Le nanoXRF repose sur les mêmes principes de détection que l'EDX. A l'exception qu'en nanoXRF l'échantillon est excité par les rayons X et non par un faisceau d'électrons. Cependant, de la même façon qu'en EDX, c'est l'analyse des photons suite à la désexcitation de l'atome qui est analysé en NanoXRF.

La figure 43 est un exemple d'analyse de bactéries et de nanoparticules d'argent en nanoXRF. Nous pouvons observer l'Ag par rapport aux bactéries, colorées au préalable à l'osmium.

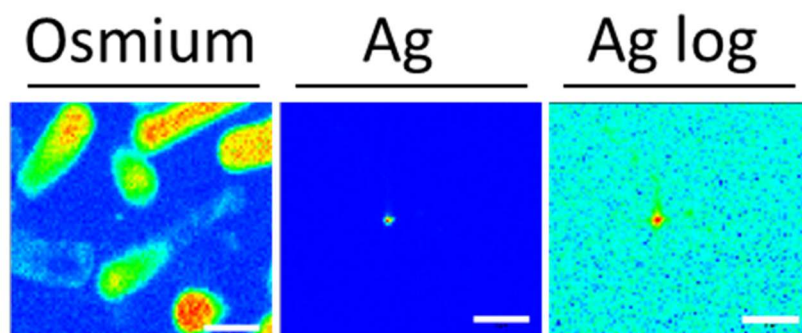


Figure 43 : Exemple de cartographie obtenue en NanoXRF.

Echantillon : *Bacillus subtilis* stressé aux nanoparticules d'argent. Barre d'échelle : 1µm.

3.3 Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS)

Principe : Comme en TEM il y a une interaction entre rayonnement et matière. Dans le cas de la XAS, l'excitation se fait par un faisceau de rayons X monochromatiques, au voisinage de l'énergie du seuil K ou L d'un élément cible donné (25.514 keV pour le seuil K de Ag par exemple). Cette technique nécessite l'utilisation d'un synchrotron, qui permet d'obtenir un rayonnement X très intense et très focalisé. La réponse de l'atome suite à l'excitation au rayon X est la même qu'après excitation avec un faisceau d'électrons, il y a éjection d'électrons secondaires et émission de photon X lors du retour à l'état fondamental.

La méthode de spectroscopie d'absorption X (XAS) consiste à suivre l'évolution du coefficient d'absorption d'un échantillon ($I_{\text{fluorescence}}/I_0$ en mode fluorescence, et $\log I_0/I_{\text{transmis}}$ en mode transmission) en fonction de l'énergie de faisceau incident. La figure 36 représente un spectre d'absorption classique, dans lequel il est possible de distinguer trois parties : l'avant-seuil, le seuil, les oscillations après seuil.

- L'avant-seuil : Lorsque l'énergie des photons est inférieure à celle du seuil de l'élément étudié, l'absorption est très faible, et le coefficient d'absorption présente alors une décroissante monotone.

Seuil : Au voisinage de l'énergie de Fermi (énergie d'ionisation, E_0), un saut brutal du coefficient d'absorption est observé. Il correspond à l'excitation d'un électron d'une couche profonde (la couche 1s dans le cas d'un seuil K). Quelques eV en dessous de E_0 , se produisent des transitions électroniques sans éjection d'électron. Au-delà de E_0 , l'électron est éjecté, on parle de photo-ionisation. L'analyse du seuil renseigne sur le degré d'oxydation de l'élément cible (qui conditionne son potentiel d'ionisation), et sur la nature et la géométrie de sa sphère de coordination.

- Oscillations après seuil (EXAFS pour extended X-ray absorption fine structure) : le photoélectron et l'onde électromagnétique qui lui est associée sont alors diffusés dans la matière et vont interagir avec les atomes voisins, ce qui va créer une onde rétrodiffusée. Les interférences entre l'onde diffusée et rétrodiffusée sont à l'origine des oscillations EXAFS. L'analyse de ces oscillations renseigne sur la nature des atomes

voisins dans un rayon de quelques angströms seulement (c'est une sonde locale), et sur les distances entre l'atome cible et ses proches voisins.

L'analyse des spectres XANES et EXAFS peut se faire par simulation, ce qui permet de déterminer les paramètres structuraux comme le nombre de voisins, les distances interatomiques et le degré de désordre (facteur de Debye-Waller). Pour les systèmes contenant un mélange d'espèces chimiques, l'approche par combinaison linéaire (CL) est plus adaptée. Elle requiert l'acquisition d'une base de données de spectres de composés références (dont on connaît la structure) la plus exhaustive possible. Cette approche suppose que chaque composé a une signature spectrale unique, ce qui n'est pas toujours le cas. Il est donc nécessaire d'examiner les spectres de références et de les regrouper si nécessaire.

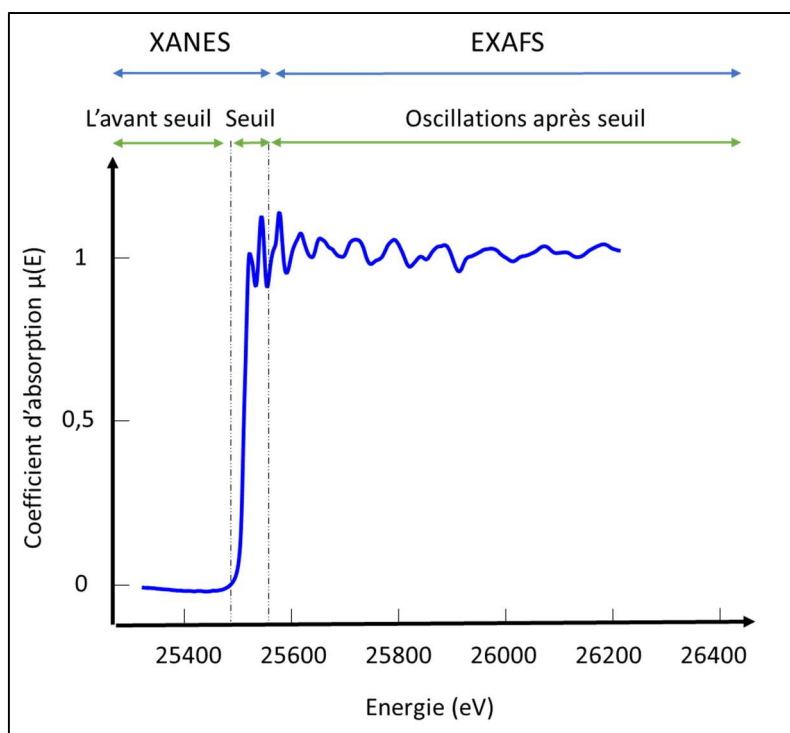


Figure 44: Allure d'un spectre d'absorption des rayons X avec mise en évidence des régions XANES et EXAFS.

4. Détection et/ou quantification des nanoparticules intracellulaires

Lors des études de toxicologie, la détermination de la concentration intracellulaire des nanoparticules est essentielle pour interpréter les données de toxicité.

Analyse de la concentration totale par ICP-AES :

Les techniques analytiques à plasma induit (ICP « Inductively Coupled plasma ») permettent de mesurer quantitativement la teneur d'un élément (comme l'argent par exemple) dans un échantillon. Concernant l'ICP-AES, il repose sur l'émission de photon X émis après excitation des atomes au sein d'un plasma d'argon à haute température. La longueur d'onde des photons X émis lors de leur désexcitation est caractéristique de chaque élément. Le choix d'une raie parmi les différentes raies d'émission d'un élément permet de s'affranchir des éventuelles interférences entre éléments. (Annexe 1 pour plus de détails)

L'ICP-MS que nous n'avons pas utilisée dans cette étude repose quant à elle sur la séparation des ions générés par le plasma d'argon en fonction de leur rapport masse sur charge m/z . Dans les deux cas (ICP-AES/MS) l'échantillon doit être au préalable minéralisé, par digestion acide le plus souvent afin d'obtenir une dissolution totale.

Partie 2 : Approche protéomique de la réponse au stress par *Bacillus subtilis*

1. Protéomique définition

Le génomique, la transcriptomique et la protéomique sont trois disciplines apparues suite aux progrès technologiques en biologie. Elles permettent d'étudier les grandes fonctions moléculaires d'un organisme dans son ensemble. La génomique signifie l'étude du génome, la transcriptomique l'étude du transcriptome (ensemble des ARNm) et la protéomique l'étude du protéome. Le transcriptome et le protéome, contrairement au génome, sont des images dynamiques, dépendantes du stade de développement et des conditions environnementales dans lesquelles l'organisme se situe. En effet, le même génome peut aboutir à une variété de transcriptomes et de protéomes suite à plusieurs niveaux de régulation : des régulations transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles. Le transcriptome révèle les régulations transcriptionnelles, le protéome lui révèle les régulations transcriptionnelles, traductionnelles et certaines régulations post-traductionnelles. Ainsi, la complexité de l'information augmente lorsque nous passons du génome au transcriptome puis du transcriptome au protéome.

La protéomique, par analogie à la génomique et à la transcriptomique, signifie l'étude du protéome qui inclut aujourd'hui non seulement l'identification et la quantification des protéines, mais aussi l'étude de leurs régulations, de leurs modifications, de leurs fonctions et de leurs interactions (James 1997; Diz et al. 2012 ; Wright et al. 2012). Selon l'objectif visé, elle peut être divisée en quatre grands domaines : (i) la protéomique structurale, qui permet par exemple de déterminer la relation entre la structure et la fonction d'une protéine, (ii) la protéomique descriptive, qui permet de fournir une vision globale des protéines exprimées par une cellule, (iii) la protéomique fonctionnelle, qui regroupe de nombreuses approches visant à mieux comprendre les fonctions des protéines ainsi que leurs réseaux d'interaction, (iv) la protéomique d'expression, qui réalise une analyse quantitative des protéines afin de déterminer leurs niveaux d'expression. C'est cette dernière approche qui a été exploitée dans

cette étude. Elle permet selon une approche différentielle de comparer l'expression du protéome issu de deux conditions environnementales différentes (par exemple : avec et sans nanoparticules). Ainsi, des protéines impliquées dans différentes fonctions métaboliques peuvent être révélées (exp : compétence, sporulation...).

2. Stratégie

En pratique, deux types de stratégies peuvent être employées pour l'analyse protéomique d'expression : les stratégies « top-down » et les stratégies « Bottom-up ». L'identification protéomique en mode « top-down » consiste à analyser un mélange de protéines intactes sans avoir à les digérer, alors que le mode « Bottom-up » procède lui à une digestion enzymatique des protéines en peptides, dont l'analyse permettra ensuite l'identification des protéines. C'est cette seconde technique, qui a été choisie au cours de ce projet. Une analyse protéomique se réalise en trois étapes : la préparation de l'échantillon, la séparation des protéines entières ou de peptides si l'échantillon a déjà subi une digestion enzymatique et enfin l'identification des protéines d'intérêt. Cette dernière étape utilise systématiquement la spectrométrie de masse, la seconde en revanche peut s'appuyer sur deux méthodes distinctes. L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide ou par chromatographie liquide. L'électrophorèse bidimensionnelle de protéines a été utilisée dans notre première analyse (Article 3) alors que la chromatographie liquide a été utilisée dans toutes les autres études (Article 2,4) qui utilisent la souche 3610. La digestion enzymatique a donc été réalisée après l'électrophorèse bidimensionnelle juste avant l'identification protéique par spectrométrie de masse dans l'article 3 et dès le début de l'analyse dans l'article 2 et 4, avant la spectrométrie de masse.

2.1 Préparation de l'échantillon

L'extraction protéique a pour but de solubiliser un maximum de protéines, éliminant les liaisons entre elles (liaisons ioniques, hydrogènes, hydrophobes et ponts disulfures) ou avec d'autres molécules biologiques (lipides, acides nucléiques). Elle permet aussi dans certains cas de limiter les dégradations et les modifications des protéines par des enzymes ou des réactions chimiques. Suivant le mode de séparation choisi, des précautions doivent être prises. Pour exemple le tampon de lyse ne doit pas contenir de détergent chargé, qui modifierait la charge protéique, si la séparation choisie est une électrophorèse bidimensionnelle. En effet, cette technique utilise l'isoélectrofocalisation, une technique basée sur le point isoélectrique des protéines (Rabilloud & Lelong 2011). Enfin un fractionnement mécanique peut également être réalisé avant l'extraction protéique afin de permettre de séparer par exemple le protéome extracellulaire du protéome intracellulaire.

2.2 Séparation protéique

Deux types de séparations existent : la séparation « in-gel » utilisée dans notre première étude (Article 1) et la séparation « gel-free » utilisée dans les suivantes (Article 2 et 4). La séparation « in-gel » qui est la plus couramment utilisée, est l'électrophorèse bidimensionnelle. Celle-ci sépare dans un premier temps les protéines selon leur point isoélectrique lors de l'isoélectrofocalisation (ou IEF), puis dans un second temps selon leur masse (SDS-PAGE) (Figure 45) (Görg et al. 2000). L'électrophorèse bidimensionnelle est une technique très fiable qui permet de visualiser les modifications post-traductionnelles mais qui ne permet pas ou difficilement de visualiser les protéines faiblement exprimées ou membranaires (Rabilloud et al. 2010). Elle reste cependant, un bon compromis entre la quantité d'information biologique apportée et la fiabilité de ces informations, c'est pourquoi elle a été choisie dans notre première étude (Article 3). En raison d'une sécrétion importante de protéase par la souche 3610 de *Bacillus subtilis*, ce type de séparation est devenue impossible dans nos études suivantes utilisant cette souche (Article 2 et 4).

La technique « gel-free » a alors été utilisée : cette technique utilise une chromatographie liquide (LC) pour séparer les échantillons. Ainsi, elle permet de concentrer les protéines ou les peptides dans de faibles volumes et de les séparer en vue de leur analyse par spectrométrie de masse. Cette technique permet donc d'analyser des échantillons peu concentrés tels que le sécrétome bactérien.

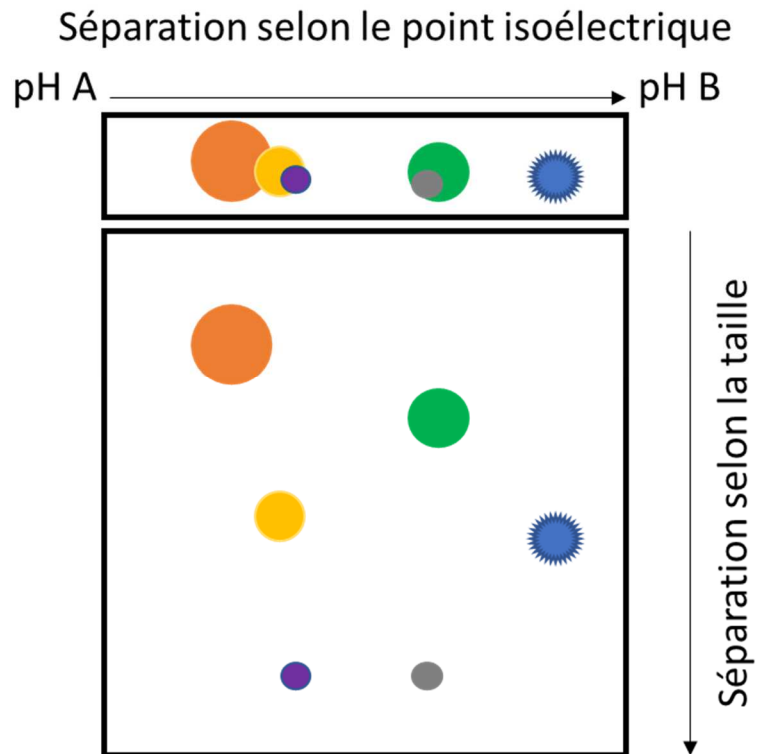


Figure 45 : Schéma représentatif de la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.

2.3 Identification protéique par spectrométrie de masse

Quels que soient les modes de préparation protéique choisis, les protéines seront ensuite identifiées par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse est une technique qui repose sur la séparation des fragments peptidiques générés en fonction de leur masse moléculaire et de leur état de charge. L'analyse des fragments permet ensuite l'identification de leur séquence, puis celle des protéines dont ils sont issus. Pour cela le spectromètre de masse se compose de trois parties (Figure 46) : (1) une source d'ionisation qui confère une charge au fragment peptidique, (2) un analyseur de masse permettant de séparer ces fragments en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z), (3) un détecteur de courant d'ion générant le signal à traiter. Les données générées seront analysées par informatique sous forme d'un spectre de masse exprimant l'intensité du signal en fonction des rapports m/z (Görg et al. 2000).

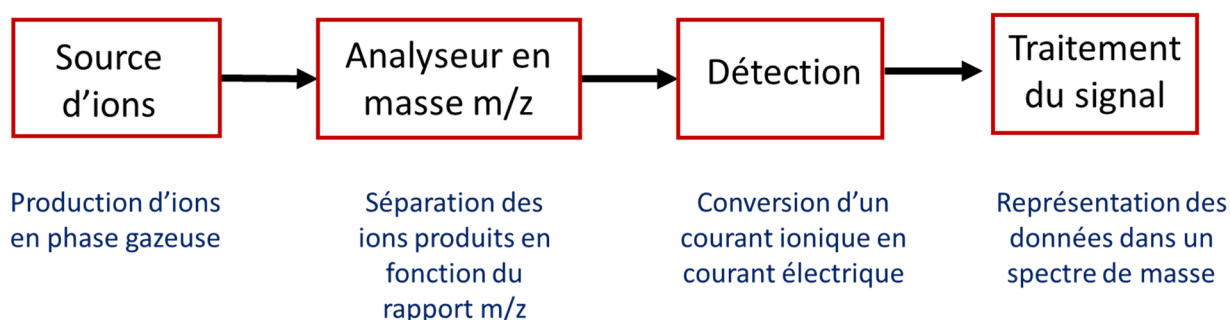


Figure 46: Schéma des composants d'un spectromètre de masse.

2.3.1 L'ionisation

Cette étape consiste donc à vaporiser l'échantillon et à l'ioniser. De nombreux ionisateurs existent tels que les ionisations : électroniques, chimiques, par bombardement d'atomes rapides (FAB), par pression atmosphérique. Les ionisateurs dits doux, c'est-à-dire qui génèrent des ions plus stables sans induire de fragmentation peptidique, sont les ionisateurs les plus utilisés en biologie ; avec l'ionisation par électrospray (ou ESI) et l'ionisation-désorption laser assistée par matrice (ou MALDI).

- L'électronébulisation (ESI) : L'échantillon en solution est introduit dans un fin capillaire à l'extrémité duquel est appliqué un haut potentiel électrique, conduisant ainsi à la séparation des charges positives et négatives (formation d'un cône de Taylor), puis à la formation de gouttelettes contenant les analytes chargés (nébulisation). Ces gouttelettes chargées traversent ensuite simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Ce transport provoque ainsi une diminution successive de la taille des gouttelettes par évaporation, jusqu'à l'émission des ions directement en phase gazeuse. Les ions ainsi formés sont alors entraînés vers l'analyseur où règne un vide poussé (Smith et al. 2007).
- Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) : L'échantillon est cristallisé avec une matrice qui cristallise à température ambiante. Ces cristaux ainsi formés sont excités par un laser UV, la matrice absorbe les photons UV émis, s'excite et s'ionise. L'énergie absorbée par la matrice provoque sa dissociation et son passage en phase gazeuse. Les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge à l'échantillon. L'expansion de la matrice entraîne l'échantillon au sein de la phase gazeuse dense où il va finir de s'ioniser. Le nuage d'ions ainsi formé, sera émis vers l'analyseur et accéléré par des différences de potentiels (Chughtai & Heeren 2010).

2.3.2 L'analyseur

Celui-ci permet la séparation des ions produits en fonction du rapport m/z afin de les analyser individuellement. Plusieurs types d'analyseurs existent (Figure 47), ils se distinguent entre eux par leur résolution, leur sensibilité, leur rapidité de mesure ... Le choix de l'analyseur dépendra donc des objectifs de l'étude : protéine unique ou plusieurs protéines, quantification ou non, taille des protéines, précision souhaitée... Il est possible également d'utiliser plusieurs analyseurs en tandem.

- L'analyseur quadripolaire : Il est constitué de 4 barres parallèles, disposées symétriquement autour d'un axe (Figure 47). Ces quatre barres sont associées

électriquement 2 à 2 et permettent de créer un champ électrique d'oscillation laissant passer certains rapports m/z d'ions alors que d'autres ions auront des trajectoires instables qui ne leur permettront pas d'atteindre le détecteur. Le quadripôle est donc un filtre de m/z , il est souvent couplé à d'autres analyseurs (Wright et al. 2012).

- Les analyseurs temps-de-vol (TOF) : L'analyse en temps de vol consiste à mesurer le temps de passage d'un ion préalablement accéléré sur une distance donnée (Figure 47). La séparation des ions dépendra uniquement de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Les ions de rapport m/z les plus petits parviendront au détecteur en premier, ceux avec le rapport m/z le plus grand en dernier (Glish & Vachet 2003).
- L'analyseur à piégeage d'ions : Cet analyseur est un quadripôle à 3 dimensions, constitué de 2 électrodes « chapeau » et un électron annulaire (Figure 47). Le mouvement des ions en 3 dimensions à l'intérieur du piège dépend de la masse m de l'ion, ainsi que de sa charge z . Les ions sont dans un premier temps piégés à l'intérieur de la trappe puis éjectés sélectivement vers le détecteur en fonction de leur rapport m/z suite à une diminution progressive de la tension appliquée (Glish & Vachet 2003).

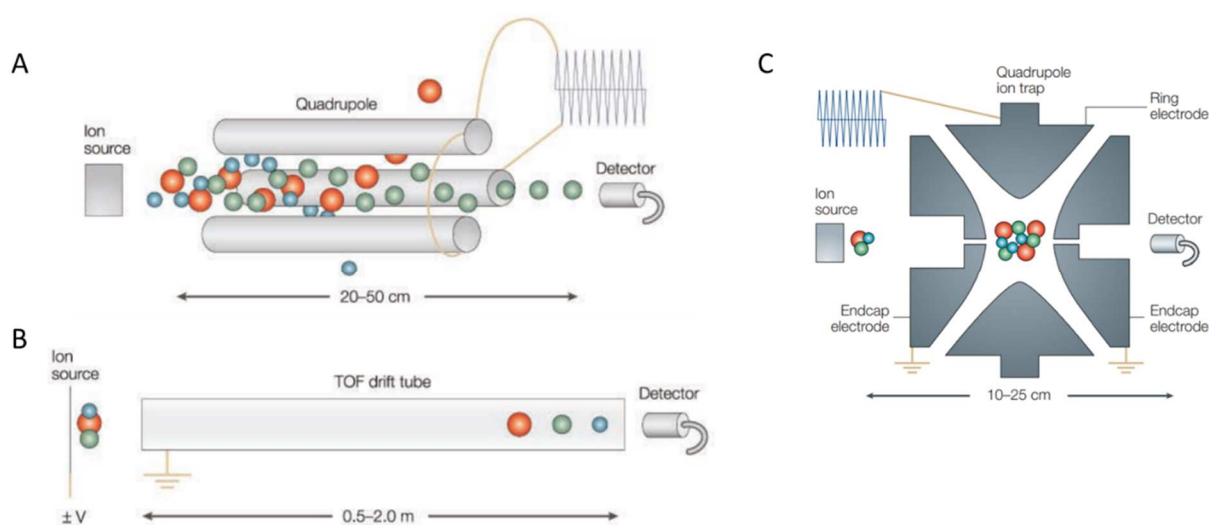


Figure 47: Principe d'un analyseur, (A) quadripôle, (B) TOF, (C) piégeage d'ions. (D'après (Glish & Vachet 2003)).

2.3.3 L'identification des protéines

Deux modes sont possibles pour identifier les protéines : l'empreinte peptidique massique (ou « peptide mass fingerprint », PMF) et le séquençage par fragmentation MS/MS.

- L'empreinte peptidique massique (PMF) : Le PMF consiste à digérer une protéine par une enzyme de spécificité connue et à mesurer la masse de chaque peptide à l'aide de spectromètre de masse (James et al. 1993). Les différentes masses expérimentales obtenues seront comparées aux masses théoriques des peptides issues de la digestion *in silico* de l'ensemble des protéines contenues dans les banques de données. Cette stratégie fait appel à des instruments de type MALDI-TOF ou ESI-analyseur. C'est la stratégie la plus simple et la plus rapide, cependant les séquences des protéines analysées doivent être répertoriées dans les banques de données. De plus les algorithmes de PMF sont basés sur l'hypothèse que les peptides analysés proviennent d'une seule protéine, cette méthode est donc applicable uniquement pour des mélanges simples avec peu de protéines. Seule une séparation en électrophorèse 2D est donc envisageable pour une telle analyse permettant d'avoir un échantillon avec un nombre limité de protéines (Rabilloud & Lelong 2011).

Compte tenu de ces limitations, la spectrométrie de masse en tandem s'est avérée plus intéressante à utiliser dans nos études.

- Fragmentation MS/MS : Le spectre obtenu par MS/MS permet d'obtenir des informations de séquence sur les fragments protéiques analysés. Cette technique est utilisée lorsque l'empreinte PMF ne suffit pas. Les séquences ainsi obtenues seront comparées à une banque de données contenant l'ensemble des séquences des protéines connues (Yates et al. 1997).

Cette technique combine deux analyseurs. Les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines vont dans un premier temps être séparés par chromatographie liquide. Les peptides arrivent séquentiellement dans le

spectromètre de masse et vont être ionisés, où seuls les ions ayant un rapport m/z déterminé pourront sortir. Ces ions seront ensuite fragmentés dans une cellule de collision, puis analysés dans un second analyseur. Cette technique apporte des informations concernant la séquence de la protéine étudiée, car la fragmentation des peptides a lieu sur les liaisons chimiques entre les acides aminés et les « libère » de la chaîne peptidique, un par un ou en sous-fragments très courts. Le spectre obtenu en MS/MS permet de déterminer la séquence peptidique, en effet l'espace entre chaque fragment représente la masse d'un des 20 acides aminés (Figure 48).

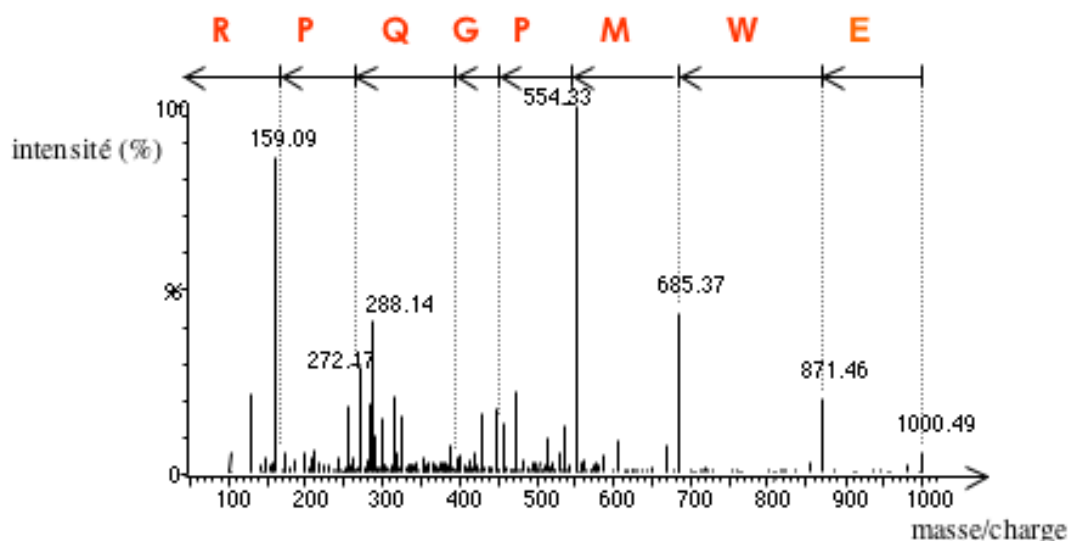


Figure 48; Exemple d'interprétation d'un spectre MS/MS.

En abscisse, la masse des ions (plus exactement, le rapport masse/charge) ; en ordonnée, le pourcentage des ions possédant une masse donnée. En pratique, les espacements de m/z entre les pics les plus intenses correspondent aux masses des acides aminés, ce qui permet de reconstituer la séquence peptidique. Sur cet exemple, la lecture du spectre de droite à gauche permet de reconstituer la séquence EWMPGQPR (chacun des 20 acides aminés est ici désigné par un code d'une lettre). (Réalisé par : François Rechenmann et Isabelle Quinkal , https://interstices.info/jcms/c_7463/la-bioinformatique-en-proteomique-analyse-des-spectres-de-masse, 2005).

Résultats et Discussions

Partie 1 : Effets de *Bacillus subtilis* sur la biodisponibilité des nanoparticules d'argent

Cette partie est consacrée à l'étude des modifications des nanoparticules d'argent suite à leurs interactions avec *Bacillus subtilis*. L'objectif de cette étude est de mieux connaître les modifications physico-chimiques des nanoparticules rejetées dans le sol afin de déterminer leur biodisponibilité et donc leur toxicité dans l'environnement.

Afin d'être au plus proche des conditions environnementales, trois formes d'argent ont été testées : l'argent dit « pristine » (nanoparticules d'argent non modifiées), l'argent dit « vieilli » (nanoparticules d'argent après sulfuration) qui mime ce qui se passe dans les stations d'épuration et enfin notre contrôle ionique, le lactate d'argent. Ces nanoparticules d'argent seront exposées à *Bacillus subtilis* ou aux molécules qu'elle secrète pendant 5h à des doses proches des doses environnementales.

Afin d'étudier l'effet de *Bacillus subtilis* sur les modifications de biodisponibilité des nanoparticules, deux stratégies ont été mises en place. La première consiste à mettre en contact les nanoparticules avec une culture totale de *Bacillus subtilis*, la seconde consiste à les mettre en contact uniquement avec les molécules qu'elle secrète. En effet, le modèle bactérien *Bacillus subtilis* a été choisi entre autres pour sa capacité à sécréter de nombreuses molécules, qui pourraient potentiellement interagir avec les nanoparticules d'argent et changer leur biodisponibilité (Partie 1 chapitre 6 de l'introduction).

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de deux articles scientifiques. Un premier article présente les résultats obtenus dans l'étude des modifications physico-chimiques globales suite à un contact avec *Bacillus subtilis*. Un second article présente les résultats obtenus dans l'étude des interactions potentielles entre les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis* et les nanoparticules d'argent.

1. Impact de *Bacillus subtilis* ainsi que son sécrétome sur le devenir des nanoparticules d'argent

1.1 Introduction

En raison des propriétés antibactériennes des nanoparticules d'argent, celles-ci sont de plus en plus utilisées en industrie et en recherche. Ces nanoparticules finissent par être rejetées dans l'environnement où leur impact et leur devenir sont mal connus. Une fois dans le sol, ces nanoparticules peuvent subir diverses modifications physico-chimiques suite à leurs interactions avec le milieu biologique. Ces modifications peuvent conduire à des modifications de leur biodisponibilité et donc de leur toxicité, il est alors essentiel de les évaluer.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'influence de *Bacillus subtilis*, une bactérie modèle du sol, sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent. Dans ce but les modifications physico-chimiques des nanoparticules ont été évaluées après un contact avec une culture de *Bacillus subtilis* ou avec uniquement les molécules qu'elle sécrète. L'impact du milieu de culture habituellement utilisé en recherche sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules a également été étudié.

Pour cela de nombreuses techniques de caractérisation des nanoparticules ont été utilisées telles que : le DLS (dynamic light scattering), le TEM couplé avec l'EDX (TEM-EDX ; transmission electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry), ainsi que l'absorption des rayons X et l'ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry). Toutes ces techniques ont permis de révéler l'impact de *Bacillus subtilis* sur les nanoparticules rejetées dans le sol, comme une sulfuration et une agglomération de celles-ci.

1.2 Article 1

Article publié dans Environmental Science & Technology (Decembre 2017).

Impact of a model soil microorganism and of its secretome on the fate of silver nanoparticles

Eymard-Vernain Elise ^{1,2}, Lelong Cécile ², Pradas del Real Ana-Elena ^{1 3}, Soulas Romain ⁴, Bureau Sarah ¹, Tardillo Suarez Vanessa ⁵, Gallet Benoit ⁶, Proux Olivier ^{7 8}, Castillo-Michel Hiram ³ and Sarret Géraldine ¹.

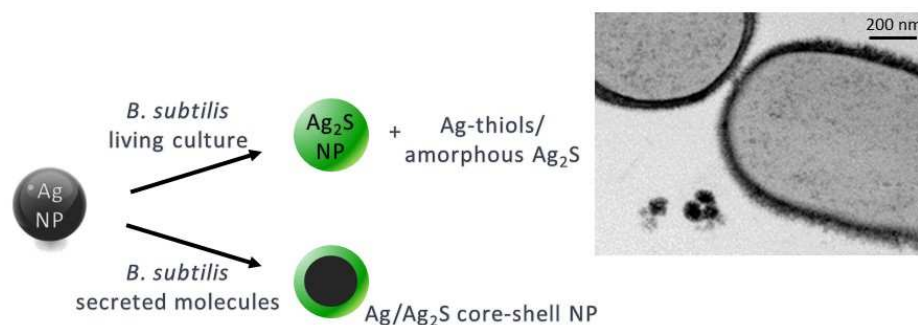
¹ ISTERre (Institut des Sciences de la Terre), Université Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble, France ; ² Université Grenoble Alpes, CEA Grenoble, Lab Chim & Biol Met, UMR CNRS CEA UJF, ProMD Team, BIG, Grenoble, France ; ³ ID21, ESRF-The European Synchrotron, CS40220, 38043 Grenoble, France ; ⁴ LITEN, CEA Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France ; ⁵ ID16b, ESRF-The European Synchrotron, CS40220, 38043 Grenoble, France ; ⁶ Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, F-38000 Grenoble, France ; ⁷ Observatoire des Sciences de l'Univers de Grenoble (OSUG), UMR CNRS 832, Université Grenoble-Alpes, F-38041 Grenoble Cedex 9, France ; ⁸ BM30B/CRG-FAME, ESRF, Polygone scientifique Louis Néel, 71 avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France .

Correspondance :

Dr., Sarret Géraldine

E-mail : geraldine.sarret@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract



Sulfidation is a key process for silver nanoparticles released from consumer products in the environment. This study focuses on the impact of a model soil microorganism, *Bacillus subtilis*, on the fate of pristine and already sulfidized Ag-NPs. The nanoparticles were incubated with the initial growth medium, isolated secretome and living bacteria, and characterized for their size and morphology, agglomeration state, structure and Ag speciation. No Ag internalization or sorption on the cell wall was detected. A partial sulfidation, leading to an Ag-Ag₂S core-shell structure, was observed in the presence of the secretome, and the rate limiting step of the reaction was the oxidation of Ag⁰, and it was favored near the crystal dislocations. The sulfidation was complete in the presence of the living bacteria and followed an indirect pathway. Both crystalline Ag₂S and amorphous Ag₂S and/or Ag-thiol were identified. At the opposite, the bacteria had no impact on Ag₂S. These results suggest that microorganisms participate to the sulfidation of Ag-NPs in aerobic systems such as unsaturated soils, and thus affect the bioavailability of Ag. It is important to take these transformations into account during exposure experiments, since they drastically change the exposure conditions. Finally, the secretome of *B. subtilis* might be used for the green synthesis of Ag-Ag₂S core-shell nanoparticles.

Introduction

Because of their broad-spectrum antimicrobial properties (Lara et al. 2011), engineered nanoparticles (NPs) are increasingly produced and used in consumer products (cosmetics and personal care products, food and food packaging, textile, electronics) and also in medicine and agriculture (Pulit-Prociak et al. 2014). This increased use has raised some concerns, both from a toxicological point of view for consumers during the use of these products, and from an ecotoxicological point of view since Ag-NPs and their secondary products are expected to end up in environmental compartments, especially in soils, at the end of their life cycle (Gottschalk et al. 2009; Sun et al. 2014). Indeed, Ag-NPs released in wastewater accumulate in sewage sludge during wastewater treatment (Kaegi et al. 2011). In Europe, 40 to 50% of this biosolid is applied on agricultural soils as amendment (Kelessidis & Stasinakis 2012).

Since the last decade, the ecotoxicity of Ag-NPs has been studied at various levels of complexity, from single organisms in growth media to complex systems such as soils and natural waters (Navarro et al. 2008; Maillard & Hartemann 2013). The impact on bacteria has been the focus of many studies since Ag-NPs are primarily used as biocides. Some studies have focused on the mechanisms responsible for this property (Durán et al. 2016). Effects of Ag-NPs on bacteria include the generation of reactive oxygen species (ROS) (Cabiscol et al. 2000), the disruption of the membrane integrity, the interaction of Ag ions with proteins and disruption of their regular function, and the interference with DNA replication, causing DNA damage (Durán et al. 2016; Niazi & Gu 2009). These effects are supposed to result mainly from the release of Ag ions by oxidative dissolution of the Ag-NPs. As a consequence, they are influenced by the physicochemical characteristics of the nanoparticles including the size, the shape and the nature of the coating (Marambio-Jones & Hoek 2010). The agglomeration state is another factor influencing the toxicity of Ag-NPs. The formation of agglomerates tends to decrease biocidal activity, possibly due to a decreased dissolution. Finally, Reidy et al. (Reidy et al. 2013) pointed out that chemical transformations likely modify the toxicity of Ag-NPs. Sulfidation is a key process taking place in sewage systems (Kaegi et al. 2011) and wastewater treatment plants (Kaegi et al. 2011; Kim, Baek, et al. 2011). This transformation

decreases Ag-NPs toxicity, thanks to the low solubility of Ag₂S (Levard et al. 2013; Levard et al. 2011; Yu et al. 2012). Sulfidation might also occur in growth media during *in vitro* exposure experiments, due to the composition of the growth medium itself, and to the release of thiol-containing molecules by the living organisms. To our knowledge, the impact of microorganisms' activity on the speciation of Ag-NPs in growth media has never been studied. Thus, it is important to assess the extent of these transformations, and to identify the agents responsible for these changes (the growth medium itself vs. the bacterial activity). Bacteria may also influence the chemical transformations of Ag-NPs in natural systems such as soils, especially in the rhizosphere. Studies on simplified systems can help to decipher the role of the various soil components in the NPs transformations.

The objective of this study was to characterize the physicochemical changes of Ag-NPs induced by a classical growth medium for bacteria (LB), by the molecules secreted by the bacteria, and by a living bacterial culture. The chosen strain is *Bacillus subtilis*, a model bacterium ubiquitous in the environment (Earl et al. 2008). In soils, it plays a role in rhizospheric processes as a symbiotic organism for plants (Pandey & Palni 1997). This Gram-positive bacterium secretes large amounts of proteins, peptides and amino acids (van Dijk & Hecker 2013; Marvasi et al. 2010). This bacteria is actually used by the industry to produce biosurfactant, antifungal compounds, protease and poly-γ-glutamate (van Dijk & Hecker 2013). Exposure conditions were chosen as close as possible to environmentally relevant conditions: Pristine and aged (i.e., sulfidized) Ag-NPs (referred to as Ag₂S-NPs), as well as Ag lactate as a control for ionic Ag were used, at a dose of 1 mg Ag L⁻¹. These various Ag forms were incubated in the initial growth medium, in the secretome without bacteria (supernatant after culture), and in the bacterial culture during the stationary phase. Although most exposure experiments are conducted during the exponential phase (e.g., (Kim, Baek, et al. 2011; Bondarenko et al. 2013)). The stationary phase, during which the medium is depleted in nutrients and when biopolymers and other exudates are present, is closer to the physiological state of bacteria in the environment (Völker & Hecker 2005; Overkamp et al. 2015). A combination of analytical and physical techniques was used, including dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectrometry (TEM-EDX), nano X-ray fluorescence, bulk and nano X-ray absorption spectroscopy, and inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry (ICP-AES).

Material and methods

Nanoparticles

The silver nanoparticles and silver lactate were purchased at Sigma: PVP-coated Ag-NPs (ref 758329, 5 wt% in ethylene glycol, <100 nm by TEM) and silver lactate (ref 85210, CH₃CH(OH)COOAg, Molecular Weight: 196.94). Silver lactate was preferred to silver nitrate to avoid the formation of AgCl in the medium. Ag₂S-NPs were obtained by sulfidation of PVP-Ag-NPs as described in Levard et al. (Levard et al. 2011). More details and characterization are provided in Figures S1 and S2, Supporting Information.

Bacterial strain and culture media

The *B. subtilis* strain used was the 3610 strain (wild type) (personal gift, Maria Laaberki). The growth medium was LB: 10 g.L⁻¹ tryptone (Becton Dickinson ref: 212750), 5 g.L⁻¹ yeast extract (Becton Dickinson ref: 21705) and 5 g.L⁻¹ NaCl (Sigma: S9888). Isolation of the secretome: *Bacillus subtilis* strain 3610 was grown in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing LB medium with an initial OD₆₀₀ of 0.01 with shaking at 190 rpm at 37 °C. After 21h, the medium was depleted in nutrients from LB, and contained essentially the molecules secreted by the bacteria. (> 10 g.L⁻¹ poly-γ-glutamate (Zeng et al. 2013), 360 mg.L⁻¹ exopolysaccharides, 1 g.L⁻¹ DNA, and many proteins). Although the stationary phase was established since several hours, we did not observe significant cell mortality (as evaluated by lactate dehydrogenase assay). The culture was centrifuged at 8000 rpm for 15 min, and the cell-free supernatant (SN), considered as the secretome, was recovered and used for incubations.

Incubations with Ag-NPs, Ag₂S-NPs and Ag lactate

- Incubations with living bacteria: Cells were grown at 37°C in LB medium in 250 mL Erlenmeyer flasks during 16h with an initial OD₆₀₀ of 0.01. After 16h of growth, the cells culture were further incubated alone (for the control) or with 1mg.L⁻¹ of Ag-NPs, or Ag₂S-NPs or 1.8 mg.L⁻¹ of silver lactate (= 1mg.L⁻¹ of Ag) during 5h under

shaking. Viability and central metabolism were not modified after exposure in these conditions (Eymard Vernain et al., subm).

- Incubations in LB and SN without bacterial cells: SN and LB media were incubated without (for the control) and with 1 mg L^{-1} of Ag-NPs or Ag₂S-NPs or silver lactate during 5h at 37°C in 250 mL Erlenmeyer flasks filled up to 50 mL with shaking (referred to as “aerated condition”, A, same as the bacterial culture), and in closed 50 mL falcon tubes (referred to as “unaerated condition”, NA) at 25°C. These two conditions allowed us to test the influence of the aeration on the transformations.

Sample preparation after incubation

All samples were obtained after centrifugation at 8000 rpm for 30 min. Different sample preparations were used depending on the technique.

- For TEM-EDX, samples without bacteria were deposited on a TEM copper grid (Ted Pella, ref 01824) and dried in inert atmosphere, and bacterial samples were fixed by high pressure freezing, freeze-substitution and resin embedding (Supporting Information), prepared as 400 nm sections and deposited on a TEM copper grid.
- For nanoXRF/nanoXANES analyses, 400 nm sections of embedded bacteria were deposited on a grid with a Si₃N₄ window (Ted Pella, ref 21500-10). Other samples were prepared by deposition of a drop of the fresh pellet on an ultralene film, drying in inert atmosphere, and fixation of this film on a PEEK sample holder.
- For bulk EXAFS analysis, pellets were mixed with 20% glycerol as cryoprotectant, placed in the 5 mm diameter holes of the cryo-sample holder, plunged in liquid N₂, and introduced in frozen hydrated state in the cryostat. For Ag lactate samples, Ag could not be recovered by centrifugation, so the whole medium after incubation was freeze dried, diluted in BN and pressed into 5 mm diameter pellets.

TEM-EDX

Sample were observed using a Tecnai OSIRIS (FEI) in STEM mode operating at 200 kV with a probe current close to 0.7 nA. Elemental analysis was performed using four windowless energy dispersive X-ray detectors (Bruker) offering almost 1 sr of solid angle.

Hyperspectral EDX maps were obtained, from which elemental profiles for S and Ag were extracted, and Ag/S peak intensity ratios were calculated. Diffraction patterns were recorded in TEM mode using selected area diffraction (SAD) technique.

NanoXRF

NanoXRF and XANES analyses were performed on beamline ID16b at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). The optics used were a double white mirror with Pt coating and a KB mirrors system which focus the beam down to 62 (vertical) × 83 (horizontal) nm². Two fluorescence detectors (three-elements SDD arrays from SGX Sortectech) were used. The photon flux was 5.8×10^9 ph s⁻¹ at 25.61 keV. NanoXRF maps were recorded at 25.61 keV, with a step size of 50 x 50 nm, and a dwell time of 100 ms.

X-ray absorption spectroscopy

Ag speciation was studied by Ag K-edge (25.5 keV) bulk EXAFS and XANES spectroscopy on FAME (BM30B) beamline at the ESRF and Samba beamline at SOLEIL synchrotron (Paris, France) at 15-20°K using a liquid He cryostat, by Ag L_{III}-edge (3.35 keV) bulk XANES spectroscopy on ID21 beamline at the ESRF at 80°K using a liquid N₂ cryostat, and by Ag K-edge nanoXANES spectroscopy at room temperature on ID16b beamline at the ESRF. Experimental details have been described previously for Ag K-edge bulk EXAFS on FAME(Pradas del Real et al. 2016) and Ag L_{III}-edge XANES on ID21(Pradas del Real et al. 2017). For FAME and Samba data, a Si(220) monochromator, a 30- and 35-element, respectively, Ge detector were used. For Ag K-edge NanoXANES spectroscopy on ID16b, a Si(111) double crystal monochromator was used and spectra were recorded using the full XAS mapping mode (Castillo-Michel et al. 2017).

XANES and EXAFS data treatment was done with ATHENA from the Demeter software package (Ravel & Newville 2005). After normalization, spectra were analyzed by linear combination fitting using libraries of Ag K- and L-edge references spectra detailed in Supporting Information.

ICP-AES

The intracellular silver was determined by ICP-AES after cell lysis (details in Supporting Information).

Dynamic light scattering (DLS)

Nanoparticles at 1 mg L⁻¹ were incubated in ultrapure water (referred to as H₂O), LB medium or supernatant during 5 h in NA conditions before the DLS (dynamic light scattering) measurement. The DLS apparatus was a DynaPro NanoStar (Wyatt Technology). Each measurement was performed at least on biological triplicates, and with four technical replicates. For each DLS analysis, between 2 and 5 hydrodynamic diameters were obtained. The results of the various measurements were plotted on the same figure, with no averaging. The absence of detectable particle in H₂O, LB and SN media was validated.

Statistical tests

Statistical tests (Tukey post hoc after ANOVA) were done on the EDX data (S/Ag peak heights) using the software SPSS.

Results

Distribution of silver in presence of *Bacillus subtilis*

Bacteria exposed to Ag-NPs, Ag₂S-NPs and Ag lactate were studied by nanoXRF in order to evaluate the possible internalization of Ag, or binding to the cell wall. Figure 1 shows the nanoXRF maps obtained on 400 nm sections of bacteria. Cells appear on the Os maps, thanks to OsO₄ staining (Os in Figure 1, details on freeze-substitution in Supporting information). For *B. subtilis* after exposure to Ag-NPs, Ag-rich spots of a few tens of nm, not in contact with bacteria, were observed. No concentrated or diffuse Ag was detected in the cytoplasm or cell wall of the bacteria. The detection limit for Ag in our experimental conditions is estimated to $27 \pm 7 \text{ mg Ag L}^{-1}$ (Supporting information). For *B. subtilis* after exposure to Ag₂S-NPs, aggregates of several micrometers of Ag₂S-NPs were observed in the medium. Beside this effect, there was no correlation between Ag and Os localization, suggesting no internalization of Ag. This finding was confirmed by analyzing bacteria far from the Ag₂S-NPs aggregate, which shows the absence of silver (fourth row in Figure 1). Finally, for bacteria after exposure to Ag lactate, no Ag was detected inside and outside bacteria.

The absence of accumulation of silver in the bacteria for all conditions was confirmed by ICP-AES after cell lysis. Indeed, for all conditions, silver concentration in the samples after digestion was below the quantification limit of $3 \mu\text{g L}^{-1}$, corresponding to $4.5 \cdot 10^{-2} \mu\text{g Ag}$ per 15 mL tube. This amount corresponds to 0.018% of the initial Ag (1 mg L^{-1} in 250 mL of bacterial culture), to 4.5 attograms Ag per cell (considering about 10^{10} cells in 250 mL), and to an intracellular concentration of 8.6 mg L^{-1} . Bondarenko *et al.* determined an intracellular concentration of 0.7 mg L^{-1} at the EC₅₀ of *B. subtilis* exposed to Ag-NPs (Bondarenko *et al.* 2013). The absence of toxicity observed in the present study suggests that the intracellular Ag concentration is below this value. A more sensitive method would be necessary to confirm this point. To sum up, for the three conditions, no internalization or association with the cell wall was observed, which is consistent with the absence of effects on the bacterial growth in our experimental conditions (Eymard Vernain *et al.*, *subm.*).

After evaluating the possible internalization of Ag, we investigated the effects of *Bacillus subtilis* on the physicochemical state of the nanoparticles, and possible chemical transformations, by characterizing the Ag-NPs after incubation with the bacteria, and with the growth medium (LB) alone and the secretome (SN) alone.

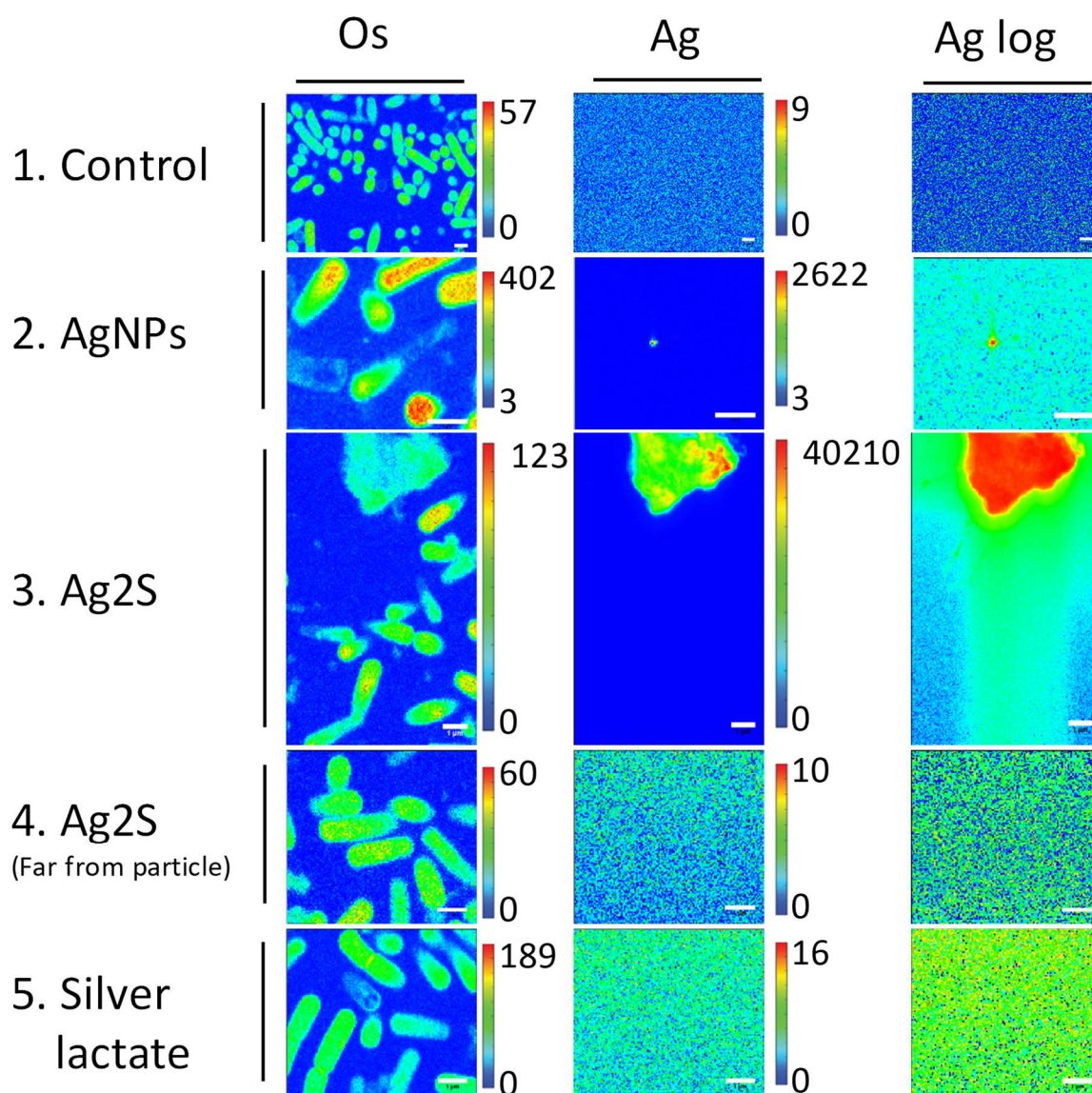


Figure 1: Nano-XRF analysis of *Bacillus subtilis* after incubation with Ag-NPs, Ag₂S-NPs, and Ag lactate. The bacteria are imaged using the Os signal. Max number of counts for Os and Ag are given for each map. Scale bar: 1μm. step size: 0.05*0.05 μm, dwell time: 500ms

Size and morphology of the NPs

The nominal size and morphological characteristics of Ag-NPs and Ag₂S-NPs were observed by transmission electron microscopy (TEM), after incubation or 5 h in H₂O, LB and SN (in NA conditions) and cell culture. Figure S3 shows representative images for these conditions, and compares the size distribution for Ag-NPs. A decrease in nominal size was observed between H₂O (majority of the nanoparticles between 40 and 80 nm) and LB or SN (majority of NPs between 10 and 60 nm) (Figure S4). This observation suggests some partial dissolution of the Ag-NPs in LB and SN. In addition, TEM observation showed that the original and partly dissolved Ag-NPs were multi-twinned crystals (Figure S3 A-C). For the nanoparticles incubated with *B. subtilis*, there was no significant change in diameter compared to H₂O, but a dramatic change in morphology. Particles were actually aggregates of small (5 to 20 nm in diameter) single crystal nanoparticles (Figure S3).

Contrary to the Ag-NPs, Ag₂S-NPs produced by sulfidation with Na₂S formed aggregates between 350 nm and 10 µm, in which it was not possible to distinguish individual nanoparticles and to determine their nominal size (Figure S5).

Agglomeration state of Ag-NPs

The study of the agglomeration state by DLS was restricted to Ag-NPs since Ag₂S-NPs particles were not in a nano state (see below). Suspensions of Ag-NPs after incubation in H₂O, LB or SN in NA conditions were analyzed. For H₂O and LB, the DLS measurements were highly reproducible, and showed two populations: one with a diameter between 5 and 20 nm and the other one with diameter of about 100 nm (Figure S6). For SN, a variety of diameters, from a few nm to 1 µm, were obtained. Large diameters suggest an agglomeration due to SN, but the agglomeration state was not stable. Indeed, results were not reproducible. Figure S6 shows the various diameters obtained on the triplicate samples, with four analyses per sample. These results suggest that some molecules secreted by *Bacillus subtilis*, present in SN, induce an agglomeration of the silver nanoparticles.

The combination of DLS and TEM results suggest a partial dissolution of the individual nanoparticles in LB and SN, and their agglomeration in SN only.

TEM-EDX analyses

The Ag-NPs after incubation in the various media (H₂O, LB, SN, and bacterial culture) were then studied by TEM-EDX. This technique allowed imaging the distribution of S and Ag within the nanoparticles (Figure 2A). Different patterns were evidenced for Ag-NPs depending on the medium. With *Bacillus subtilis*, Ag and S distribution was uniform, with a Ag/S elemental ratio of 2/1, and SAED and HRTEM showed that the aggregates were composed of single crystals of acanthite (Ag₂S, Figure S7). Thus, Ag-NPs were sulfidized in the presence of bacteria. For Ag-NPs incubated in SN in aerated conditions, a coating of Ag₂S was observed, leading to an Ag-Ag₂S core-shell structure. The Ag₂S coating had a thickness of a few nm (Figure 2A and S8A), and was thicker near the dislocations of the multi-twinned Ag-NPs (Figure S9). HRTEM analyses showed that the Ag₂S shell was crystalline but surrounded by amorphous or organic phases (Figure S9). These observations suggest that the sulfidation occurs at the surface of the NPs, preferentially near the crystal defaults, possibly driven by some organic compounds. These observations suggest that the sulfidation progresses from the surface to the inner part of the NPs. This coating was less developed for SN in non-aerated conditions, even less for LB in aerated conditions (Figure 2A and Figure S8B), and almost absent for LB in non-aerated condition (Figure 2A). For Ag₂S-NPs after incubation of the various media (H₂O, SN, *B. subtilis*), a homogeneous distribution of Ag and S was observed, except in some localized regions with only Ag (Figure 2B). These areas are probably due to electron beam damage, since they increased in size with beam exposure. Moreover, bulk XRD analyzes of Ag₂S-NPs before incubation (Figure S1) and bulk XAS analyses after incubation (see next section) showed the absence of Ag⁰ in these samples. In order to compare more quantitatively the extent of sulfidation between the conditions, we extracted the EDX spectra of the whole NPs, and compared the height of the S peak after normalization to the height of the Ag peak for each condition (Figure 2C). As expected from the EDX maps, the S/Ag peak height increased in the order LB (NA) < SN (NA) < LB (A) < SN (A) < *B. subtilis*. The difference was not significant for the first three, and significant ($p < 0.05$) for the latter two. The S/Ag peak was slightly lower for Ag-NPs + *B. subtilis* than for the Ag₂S-NPs reference. Thus, SN was more efficient at sulfidizing the NPs than LB, and aeration enhanced the sulfidation, but in all these conditions the sulfidation remained partial. Only the living bacteria led to an almost complete transformation to Ag₂S.

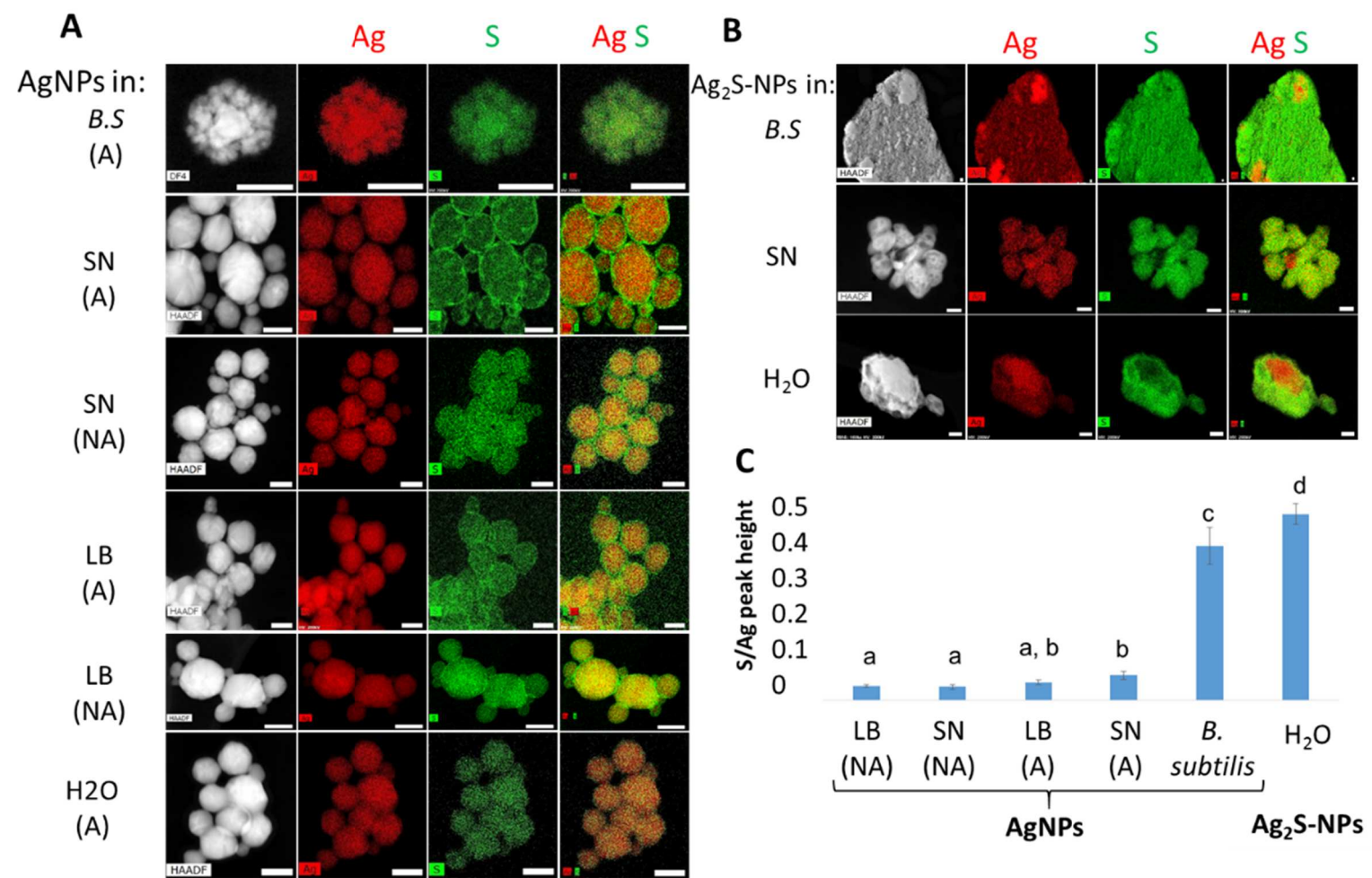


Figure 2: Ag (red), S (green) and Ag + S elemental maps obtained by TEM-EDX for the Ag-NPs after incubation in H₂O, LB, SN, and with bacteria in aerated (A) or non-aerated (NA) condition (Fig. 2A) and for Ag₂S-NPs after 5h incubation in H₂O, SN and with bacteria (Fig. 2B). Scale bar: 50 nm. (C) Comparison of the S/Ag peak height of the EDX spectra for individual NPs, extracted from the maps. Significant differences according to the Tukey test ($p < 0.05$) are indicated by letters.

X-ray absorption spectroscopy

The nature and proportions of Ag species in each sample were then studied by X-ray absorption spectroscopy. XANES and EXAFS spectra, or XANES spectra only, were treated by LCFs using model compound spectra (Figure 3, Table 1). Principal component analysis was not used because the set of spectra at each edge was too small. Among the reference spectra of our K-edge database, four standards including Ag-NPs, Ag₂S-NPs, amorphous Ag₂S and Ag-thiol were sufficient to reproduce the spectra. Because of their similarity, the last two species were merged into a single pool. Although the LB medium contains 5 g L⁻¹ NaCl, AgCl was not detected in any sample. No significant change in speciation was detected for Ag-NPs after incubation in LB or SN in NA conditions. By contrast, in A conditions, about 22% of sulfidation was detected for LB and 14 to 23% for SN (Table 1). The nature of the secondary species, either crystalline Ag₂S or amorphous Ag₂S/Ag-thiol, remains unclear for these samples because it is a minor phase (the error bar for this type of analysis is estimated at $\pm 10\%$). In the presence of *B. subtilis*, about 80% of Ag-NPs were sulfidized. The proportion of the secondary forms slightly differ between XANES and EXAFS LCFs (64 and 45% for crystalline Ag₂S, respectively, and 18 and 47% for amorphous Ag₂S/Ag and/or Ag-thiol, respectively, Table 1), but it remains clear that both species were present. The fit quality was clearly weaker (R factor increased by 20%) when only crystalline Ag₂S was used.

For silver lactate, the sulfidation was total in LB and SN, even in NA conditions. This is not surprising since Ag is already present as Ag⁺, so there is no oxidation step required before sulfidation. The final form was a mixture of crystalline Ag₂S and amorphous Ag₂S/Ag-thiol. A similar result was obtained for Ag lactate in the presence of *B. subtilis*. Again, fits were clearly weaker (R factor doubled) if only crystalline Ag₂S was used. Concerning Ag₂S-NPs, there was no significant change in speciation after incubation with *B. subtilis* and with SN in aerated conditions. The other conditions were not tested.

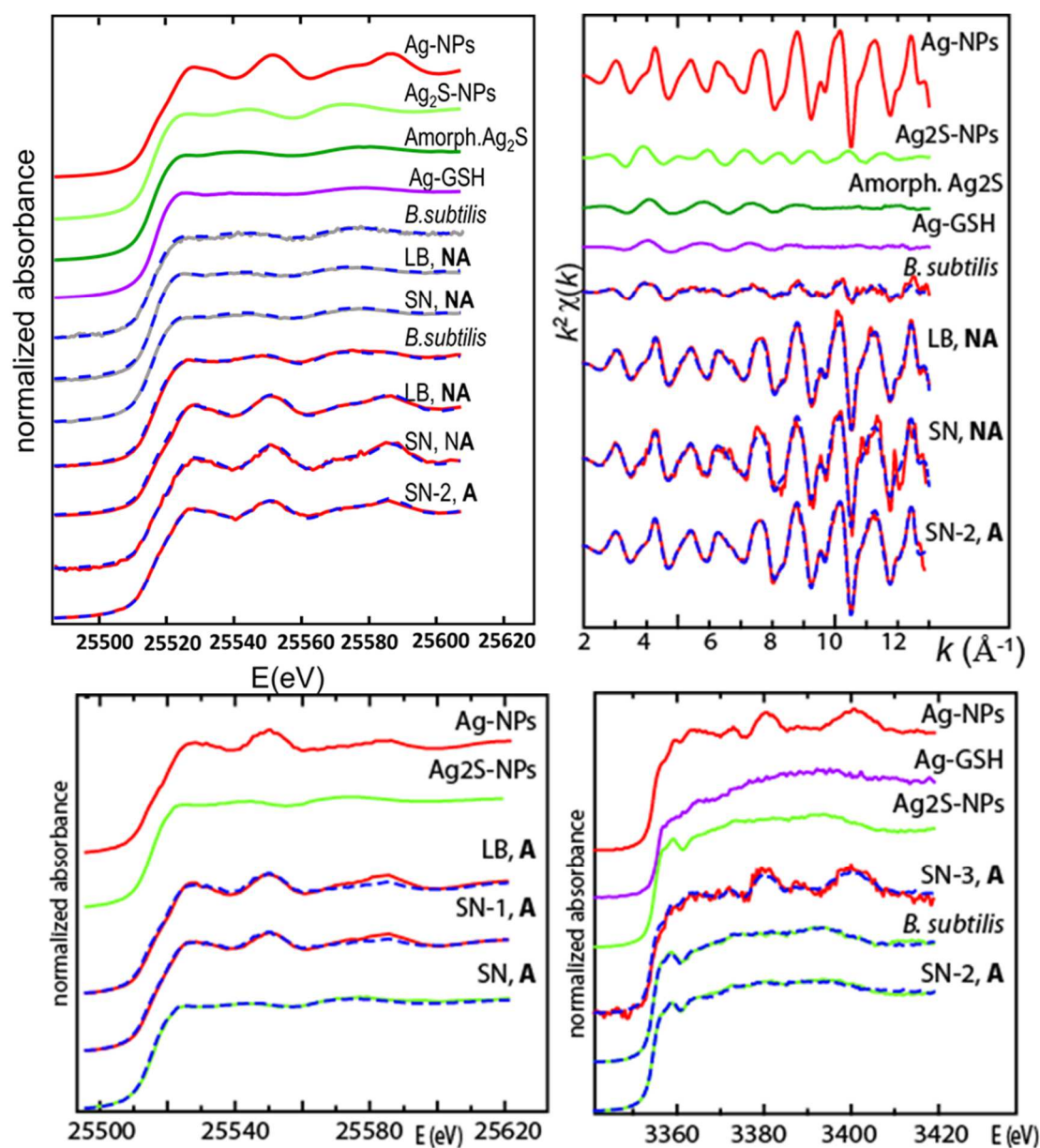


Figure 3: XAS spectra for Ag reference compounds and samples, recorded in various conditions: A, B: Bulk Ag K-edge XANES (A) spectra and EXAFS (B) spectra recorded at 15°C. C: nano Ag K-edge XANES spectra recorded at room temperature. D: bulk Ag L_{III}-edge XANES spectra recorded at 80°C. For the samples, the color of the spectra correspond to the initial Ag form: Ag-NPs in red, Ag₂S-NPs is green, and Ag lactate in grey. Linear combination fitting are shown in blue dashed lines.

Table 1 : Distribution of Ag species determined by linear combination fitting of XAS spectra

Samples	Molar percentage of Ag species				R factor ^a	Edge, type of data and temp. of acquisition
	Ag-NPs	Ag ₂ S-NPs	Amorphous Ag ₂ S or Ag-thiol	Sum		
<u>Ag-NPs incubated with:</u>						
<i>B. subtilis</i>	17	64	18	99	0.0003	K, XANES, 15°K
LB (NA) ^b	19	45	47	111	0.1554	K, EXAFS, 15°K
	100			100	0.0005	K, XANES, 15°K
	100			100	0.0310	K, EXAFS, 15°K
LB (A) ^c	78	22	n.t. ^d	100	0.0017	K, XANES, RT
SN (NA)	100			100	0.0003	K, XANES, 15°K
	100			100	0.0836	K, EXAFS, 15°K
SN-1 (A)	77	23	n.t.	100	0.0017	K, XANES, RT
SN-2 (A)	100			100	0.0400	K, XANES, 15°K
	90		15	105	0.0400	K, EXAFS, 15°K
SN-3 (A)	89		14	103	0.0080	L, XANES, 80°K
<u>Ag₂S-NPs incubated with:</u>						
<i>B. subtilis</i>		100		100	0.0005	L, XANES, 80°K
SN (A)	7	91	n.t.	98	0.0002	K, XANES, RT
SN-2 (A)		100		100	0.0003	L, XANES, 80°K
<u>Ag lactate incubated with:</u>						
<i>B. subtilis</i>		25	72	97	0.0030	K, XANES, 15°K
LB (NA)		42	58	100	0.0008	K, XANES, 15°K
SN (NA)		32	68	100	0.0008	K, XANES, 15°K

Fits were done in the [E₀-20; E₀+80] eV range for XANES spectra, and in the [2-12] Å⁻¹ range for EXAFS spectra. Up to three components were used, except for XANES spectra recorded at RT, for which only two-components (Ag-NPs and Ag₂S-NPs) were used. ^a Fit quality criterion provided by ATHENA (R factor = $\sum [k^2 \mu_{\text{exp}} - k^2 \mu_{\text{fit}}]^2 / \sum [k^2 \mu_{\text{exp}}]^2$ for EXAFS spectra, and $\sum [\mu_{\text{exp}} - \mu_{\text{fit}}]^2 / \sum [\mu_{\text{exp}}]^2$ for XANES spectra). ^b Non aerated conditions, ^c Aerated conditions. ^d Not tested because of the absence of these reference spectra in the K-edge database at RT. LB: initial growth medium. SN: supernatant (three replicates analyzed for Ag-NPs, aerated conditions).

Discussion

Concerning the fate of pristine Ag-NPs in the various media, the molecules secreted by *B. subtilis* (SN medium) increased the agglomeration of Ag-NPs as compared to pure water, whereas the molecules of the initial growth medium (LB) did not. Meanwhile, a decrease of the particle nominal diameter, suggesting a partial dissolution, was observed after incubation with SN and LB. Although Ag-NPs dissolution is supposed to increase the toxicity (Ivask et al. 2014)(Agnihotri et al. 2014), in our experimental conditions (1 mg L⁻¹ Ag applied during the stationary phase), no impacts in terms of cell mortality or changes in the central metabolism of *Bacillus subtilis* were observed. This may be related to the presence of exopolymers produced by the bacteria known to decrease metals availability. Molecules from the LB medium or products of cell lysis are less likely because they were mostly consumed and absent, respectively. This absence of toxicity is consistent with the absence of internalization of silver inside cells, as observed by nanoXRF and ICP-AES coupled with cell lysis. In addition, some transformations of Ag-NPs were observed, likely affecting Ag availability. Ag-NPs were partly sulfidized (about 20% of total Ag), and the secondary species (either crystalline Ag₂S or amorphous Ag₂S/Ag-thiol) formed a homogeneous shell on the NPs, leading to an Ag-Ag₂S core-shell structure. Based on TEM-EDX results, this surface sulfidation was slightly higher in the medium containing the secretome (SN) than in the growth medium (LB). The aeration of the suspension, i.e., the presence of dissolved oxygen, clearly enhanced the reaction. The sulfidation of ionic silver (Ag lactate) in LB and SN was tested in non-aerated conditions. In that case the reaction was complete, with formation of crystalline Ag₂S and amorphous Ag₂S/Ag-thiol. These results allowed us to conclude that the limiting step of the sulfidation of Ag-NPs under our conditions was not the availability of reduced sulfur, but of oxygen, necessary for the oxidation of Ag⁰ into Ag⁺. After incubation with *Bacillus subtilis*, the sulfidation was almost complete (80%) and again, both crystalline Ag₂S (acanthite) and amorphous Ag₂S/Ag-thiol were formed, based on bulk XANES and EXAFS analysis. These results are in contradiction with those obtained by Hsueh et al.(Hsueh, Lin, et al. 2015), who identified Ag₂O in a bacterial pellet of *B. subtilis* after exposure to 100 mg L⁻¹ Ag-NPs. However, to our opinion these results are not valid since Ag₂S and Ag₂O reference spectra shown in this article are almost identical (which is not the case, e.g., (van Dijk & Hecker 2013)),

and the first peak for the various references (Ag_2S , Ag_2O , Ag-NPs) are surprisingly at the same position.

The changes in speciation occurred without internalization or sorption on bacterial cell walls, as observed both from TEM-EDX and nanoXRF. The composite structure of the Ag_2S aggregates, composed of Ag_2S nanocrystals much smaller than the original Ag-NPs (Figure S3), suggest an indirect sulfidation, with release of Ag^+ ions followed by reaction with sulfides. On the contrary, a direct sulfidation was observed by (Thalmann et al. 2014) for Ag-NPs in the presence of HS^- , with the formation of hollow Ag_2S spheres, attributed to the Kirkendall effect. Sulfidation of Ag-NPs can be realized by dissolved inorganic sulfide species including H_2S , HS^- and S^{2-} , and can be direct or indirect depending on the S/Ag ratio (Liu et al. 2011). Inorganic sulfides are likely from the aerobic culture medium of a chemoheterotrophic strain like *B. subtilis*. Thus, thiol-containing molecules are the most likely sources of sulfide. They could originate (i) from the LB medium which contains Cys (Sezonov et al. 2007), but this pool may have been consumed, (ii) from the secretome containing more than 200 types of proteins (Marvasi et al. 2010), or (iii) from cell lysis releasing small S-containing peptides such as bacillithiol (Helmann 2011). As a support of this hypothesis, synthesis routes of nanosized Ag_2S using cysteine as S donor, involving a cleavage of the S-C bond, have been described (Xiang et al. 2008; Banerjee et al. 2016). A similar composite structure was observed for ZnS biogenic nanoparticles, for which thiol-rich peptides were shown to act as aggregating agent (Moreau et al. 2007). The proposed sulfidation mechanism is schematized in Figure S10.

These results show that living bacteria are more efficient at sulfidizing the Ag-NPs than the growth medium or secreted molecules alone. A possible explanation of this observation could be a modification of the secretome under Ag-NPs exposure. Indeed, the secretome used for the SN conditions is produced by the bacteria in the absence of Ag-NPs, and may differ from the one produced in the presence of Ag-NPs. Based on our conclusion on the rate limiting step of the sulfidation, we can hypothesize that the bacteria under Ag-NPs exposure excrete more oxidizing molecules. They might also excrete more thiol-containing molecules. These hypotheses could be tested by mass spectrometry proteomics experiments. Anyhow, an important result of this study is the demonstration that the bacterial activity has a strong impact on the fate of Ag-NPs.

Methodological and Environmental implications

This study shows that the bacterial activity has a major impact on the fate of Ag-NPs, by enhancing their sulfidation. The results suggest that the bacterial activity favors the first step of the reaction, which is the oxidation of Ag⁰. Concerning the second step, the sulfidation itself, thiol-containing proteins and peptides are the most likely sourced of S. These results suggest that microorganisms may participate to the sulfidation of Ag-NPs in aerobic systems in the environment, such as unsaturated soils. On the contrary, *B. subtilis* does not modify the speciation of Ag₂S-NPs.

This study has some implications for nano(eco)toxicology studies. In most studies, the NPs are characterized before the exposure experiment. Our study evidenced various extents of chemical transformations of Ag-NPs after 5 hours of incubation, depending on the media. These changes clearly modify the exposure conditions. Thus, it is very important to monitor the speciation of NPs during exposure experiments. This type of information would clearly help the interpretation, and the inter comparison between studies. This point is valid for silver, and other NPs prone to transformations and/or redox reactions such as ZnO, CuO, CeO₂ for example.

In this study, Ag₂S-NPs produced by reacting Ag-NPs and Na₂S, was used as a proxy of aged Ag-NPs. These Ag₂S-NPs formed large aggregates (several tens of micrometers) of crystalline Ag₂S (acanthite), which were not altered in the presence of *Bacillus subtilis* or with their secreted molecules. This form clearly differed from the secondary products obtained after incubation of Ag-NPs with bacteria, which included both crystalline and amorphous Ag₂S and/or Ag-thiol, with particle size still in the nanometer range. In soils amended with sewage sludge, a mixture of crystalline and amorphous Ag₂S and/or Ag-thiol, present as micro and nanosized particles and as diffuse concentrations, was observed (Pradas del Real et al. 2016). Thus, Ag₂S produced by reacting Ag-NPs and Na₂S may not be the most relevant material for toxicity studies since it is highly aggregated and fully crystalline. Sulfidation protocols involving thiol-containing molecules might provide more representative aged Ag-NPs.

The development of safer-by-design nanoparticles is a growing research topic. In the case of Ag-NPs, a decrease of the release of Ag from products (which can reach large amounts, for example for textiles (Lorenz et al. 2012) (Mitrano et al. 2014)) while keeping the antibacterial properties, should be targeted. Partly sulfidized Ag-NPs, with an Ag-Ag₂S core-shell structure, such as those produced in this study, might be a material to test in this perspective. The secretome of *Bacillus subtilis* may have some potential for the green synthesis of these nanocomposites.

Supporting Information

Materials and Methods : Nanoparticles characterization, high pressure freezing and freeze-substitution, Ag reference compounds for XAS analyses, nanoXRF detection limit, ICP-AES after cell lysis. Results: TEM-EDX, electron diffraction and DLS analyses (Figures S3 to S6). All data are presented in a single PDF document.

Acknowledgments

The authors thank the French program LabEx Serenade (11-LABX-0064) for providing a PhD fellowship and EquipEx NanoID (ANR-10-EQPX-39) for funding the TEM Osiris used in this study. ISTERre is also part of Labex OSUG@2020 (ANR10 LABX56). The authors thank ESRF and Soleil synchrotrons for providing beam time. The beamline staff of FAME, ID16b and ID21 (ESRF) and Samba (Soleil) are acknowledged for their help in collecting data. Alexandre Gelabert, Morgane Desmau and Clément Levard are acknowledged for recording the data on Samba beamline. We thank Christine Moriscot for her help on TEM sample preparation, realized on the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG : UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The electron microscope facility used for TEM sample preparation is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Medicale (FRM), the fonds FEDER and the GIS-Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie (IBISA).

Supplementary data

Materials and Methods

Nanoparticles

Ag₂S-NPs were obtained by sulfidation of PVP-Ag-NPs as described in Levard et al. (2011). Briefly, a suspension of 1mM PVP-Ag-NPs (pH=7) was mixed with a 1mM Na₂S in a 0.01M NaNO₃ electrolyte. After 7 days of agitation in open bottles, the suspension was centrifuged, washed three times with MQ water and dried. The total transformation of Ag₀ to Ag₂S was checked by X-ray diffraction (Figure S1).

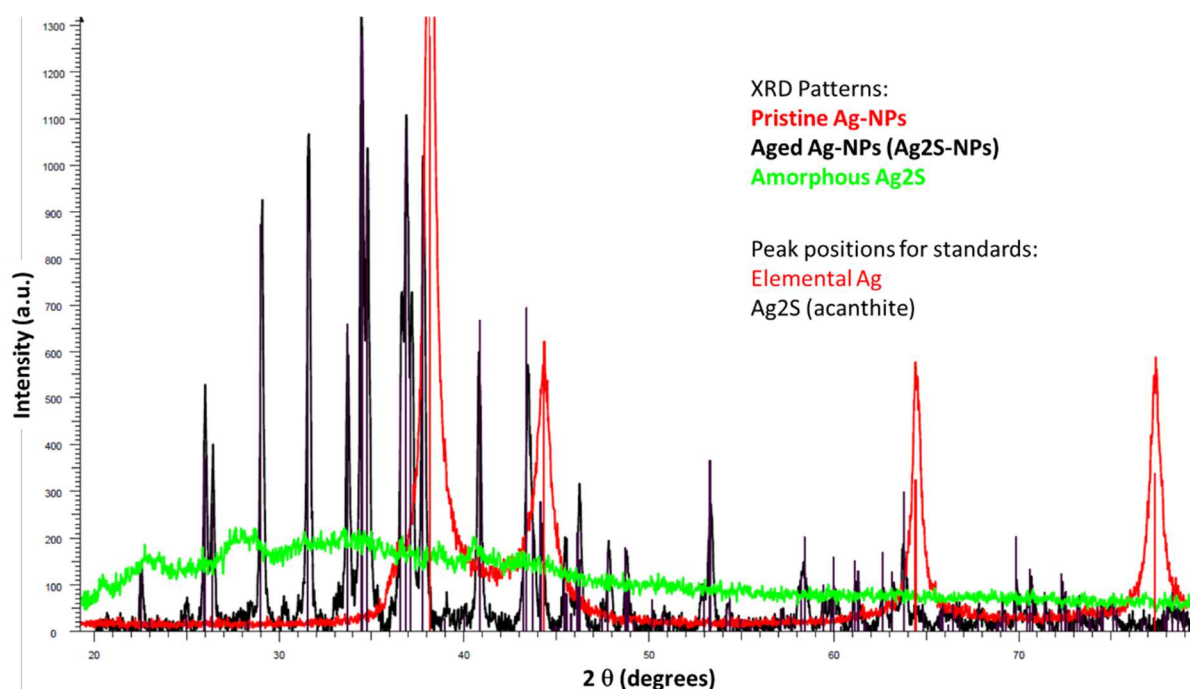


Figure S1: XRD analysis of the pristine Ag-NPs, and sulfidized Ag-NPs (Ag₂S-NPs) and amorphous Ag₂S. X-ray diffraction patterns (XRD) were recorded on powders using a D8 Bruker X-ray diffractometer and the CuKα radiation.

The zeta potential was measured for Ag-NPs and Ag₂S-NPs over a range of pH from 4 to 9 (Figure S2). Aqueous solutions containing 1 g L⁻¹ Ag-NPs, or 1g L⁻¹ Ag₂S-NPs in 5 g L⁻¹ NaCl were prepared at different pH values ranging from 6 to 10 for ζ potential measurements. NaOH and HCl were used to adjust the pH to the desired value. After dispersion, their zeta potential were measured using a Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments. Three replicates of each sample were run for statistical purposes.

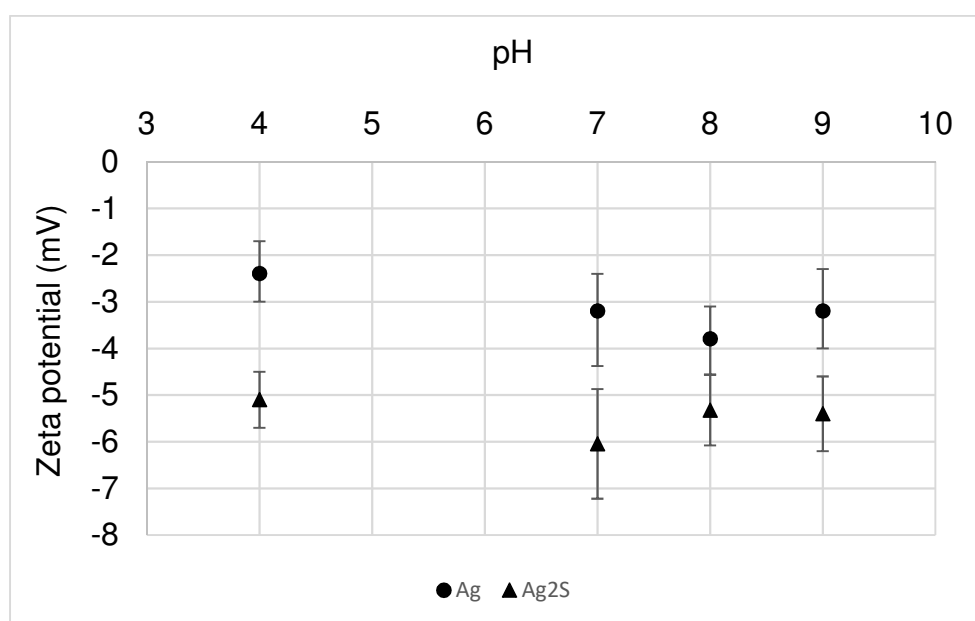


Figure S2: Zeta potential measured for the Ag-NPs and Ag₂S-NPs at various pHs.

High pressure freezing and freeze-substitution

Cells were centrifuged at 4500 g for 5 min. A pellet volume of 1.4 μ l was dispensed on the 200- μ m side of a type A 3-mm gold platelet (Leica Microsystems), covered with the flat side of a type B 3-mm aluminum platelet (Leica Microsystems), and was vitrified by high-pressure freezing using an HPM100 system (Leica Microsystems). Next, the samples were freeze substituted at -90°C for 80 h in acetone supplemented with 1% OsO₄ and warmed up slowly (1°C/h) to -60°C in an automated freeze substitution device (AFS2; Leica

Microsystems). After 8 to 12 h, the temperature was raised (1°C/h) to -30°C , and the samples were kept at this temperature for another 8 to 12 h before a step for 1 h at 0°C , cooled down to 30°C and then rinsed 4 times in pure acetone. The samples were then infiltrated with gradually increasing concentrations of Agar Low Viscosity Resin (LVR; Agar Scientific) in acetone (1:2, 1:1, 2:1 [vol/vol], and pure) for 2 to 3 h while raising the temperature to 20°C . Pure LVR was added at room temperature. After polymerization 24 h at 60°C , 70 to 400-nm sections were obtained using an ultra-microtome UC7 (Leica Microsystems) and an Ultra 35° diamond knife (DiATOME) and were collected on formvar-carbon-coated 100-mesh copper grids (for TEM) or on grids with a Si_3N_4 window (for nanoXRF/nanoXANES). The sections for TEM imaging were post-stained: 10 min with 2% aqueous uranyl acetate, rinsed, and incubated for 5 min with lead citrate.

Ag reference compounds for XAS analyses

For Ag K-edge XANES and EXAFS spectra recorded at 15°K , the following reference spectra were used. Solid state compounds, diluted in BN, included Ag^0 foil, Ag^0 nanoparticles (Ag-NPs), AgPO_4 , AgCl , AgNO_3 , Ag_2O , Ag_2CO_3 , Ag diethyldithiocarbamate ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{AgNS}_2$, Ag-DEDTC), natural macrocrystalline Ag_2S (acanthite), Ag_2S -NPs obtained from the sulfidation of the Ag-NPs, and amorphous Ag_2S obtained following the protocole described by Du et al. (2007). The complete sulfidation, from Ag^0 for the Ag-NPs to Ag_2S -NPs, and the amorphous character of the amorphous Ag_2S were verified by X-ray diffraction (XRD) (Figure S1). Ag compounds in solution included Ag^+ (25 mM AgNO_3 , pH 4.0), Ag malate (10 mM Ag, 100 mM malate, pH 5), Ag lactate (10 mM Ag lactate from sigma used for the exposure experiments, pH 5), and various Ag-GSH solutions prepared in anoxia described in Pradas del Real et al. (2016). Solution samples were mixed with 20-30% glycerol to prevent ice crystal formation during cooling.

For Ag K-edge nanoXANES spectra recorded at room temperature in full XAS mapping mode with an energy step of 5 eV below and above the edge (25.44 to 25.49 and 25.58 to 25.70 keV), and 1 eV in the edge (25.49 to 25.58 keV). Only two references spectra including Ag-NPs and Ag_2S -NPs were recorded, due to the limited beamtime. For Ag L-edge XANES spectra recorded at 80°K , the following reference spectra were used. Solid state compounds

included Ag⁰ foil, Ag⁰ nanoparticles (Ag-NPs), Ag₂S-NPs AgCl, AgNO₃, Ag phosphate (Ag₃PO₄), Ag₂CO₃ and Ag diethyldithiocarbamate (C₅H₁₀AgNS₂, Ag-DEDTC). Solution samples included Ag-malate (10 mM AgNO₃ and 100 mM malate, pH 5.5) and Ag-GSH (10 mM AgNO₃ and 100 mM GSH, pH 5.5, prepared in anoxia). Again, solution samples were mixed with 20-30% glycerol to prevent ice crystal formation during cooling.

Determination of nanoXRF detection limit

The detection limit for Ag in our conditions was estimated using a free of matrix AXO standard (AXO-RF8-200-S2453, 400 nm thickness). This reference does not contain Ag, so the fluorescence K β line of Pd was used as the closest element to Ag. Detection limit is defined as follows (Ekinci et al. 2013):

$$LOD = \frac{3\sqrt{B}}{I} C$$

Where I is the total intensity of the fluorescence peak (counts), B is the background (counts) and C is Pd concentration in the AXO. For the experimental conditions (5.80·10⁹ ph/s, 0.1s dwell time, 50 x 50nm pixel size), the detection limit was 0.34 ± 0.09 attograms per pixel (calculated on n = 20 pixels). which can be translated to 27 ± 7 mg L⁻¹.

Intracellular silver determined by ICP-AES after cell lysis

Cells grown in 250 mL Erlenmeyer flasks with or without nanoparticle stress were harvested by centrifugation at 8000 rpm for 30 min. The pellet (about 80 μ L) was washed twice with 2 mL of PBS buffer and was resuspended in 225 μ L of lysis solution containing 200 μ L of TES buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2 M sucrose), 20 μ L of 30 mg mL⁻¹ lysozyme, and 5 μ L of 1/50 benzonase 5KU (Sigma, ref E1014) during 20 min at 37°C. The lysis supernatant was collected after centrifugation at 13000 rpm for 10 min. This lysis supernatant was digested before Ag determination by adding 5 mL ultrapure HNO₃ at 65% heated at 180°C for 20 min in a microwave (Novawave, SCP Sciences). Samples were then diluted by addition of 10 mL ultrapure water. ICP-AES measurements were done using a Varian 720ES at ISTerre, using the Ag line at 328.068 nm. The efficiency of the digestion was tested on Ag-NPs, Ag₂S-NPs and Ag lactate. The recovery was 75% Ag₂S-NPs and total for Ag and Ag lactate.

Results

Size and morphology of the NPs

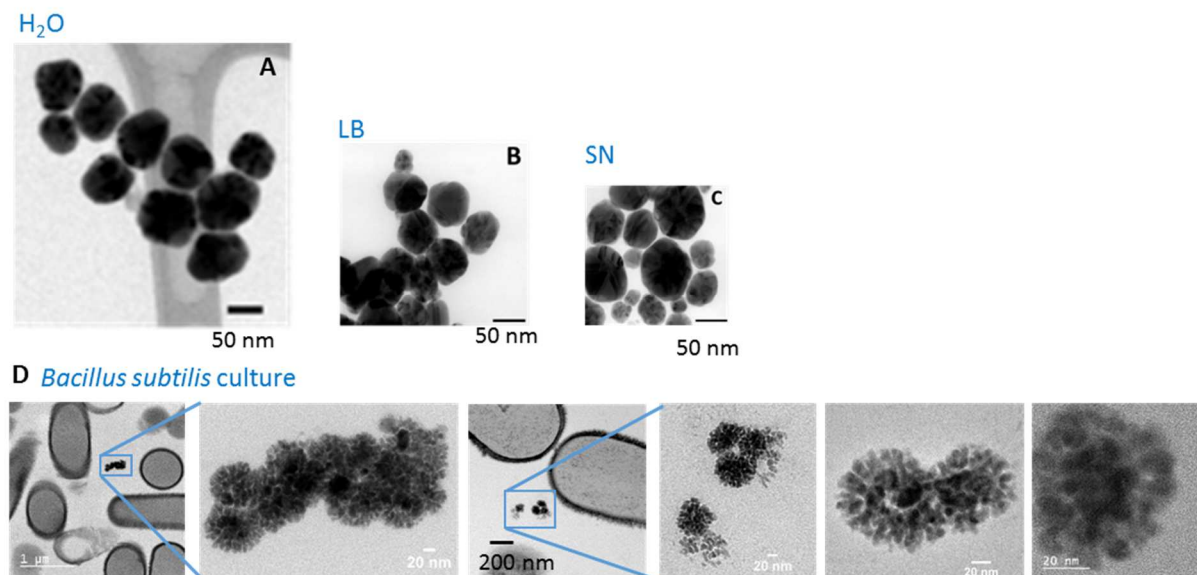


Figure S3: Morphology and particle size of Ag-NPs after incubation for 5 h in water, LB and SN (in NA conditions) (A, B, C, respectively), and with *B. subtilis* (D), observed by TEM.

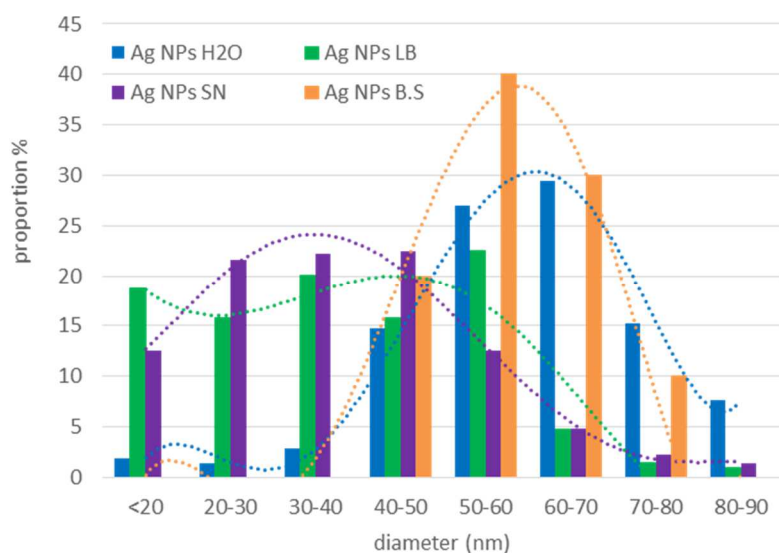


Figure S4: Particle size distribution of Ag-NPs after incubation for 5 h in water, LB and SN (in NA conditions), and with *B. subtilis*, derived from the TEM image analysis of about 200 nanoparticles for the H₂O, LB and SN conditions, and 20 nanoparticles for the bacterial culture.

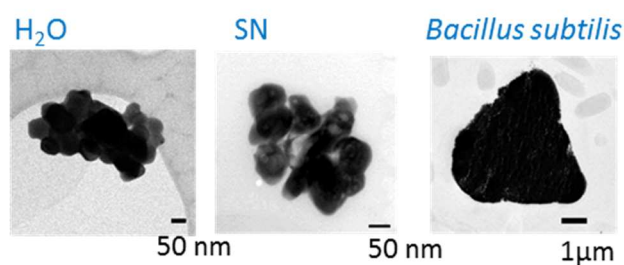


Figure S5: Morphology and particle size of Ag₂S-NPs after incubation for 5 h in water, SN (in NA conditions) and with *B. subtilis*, observed by TEM.

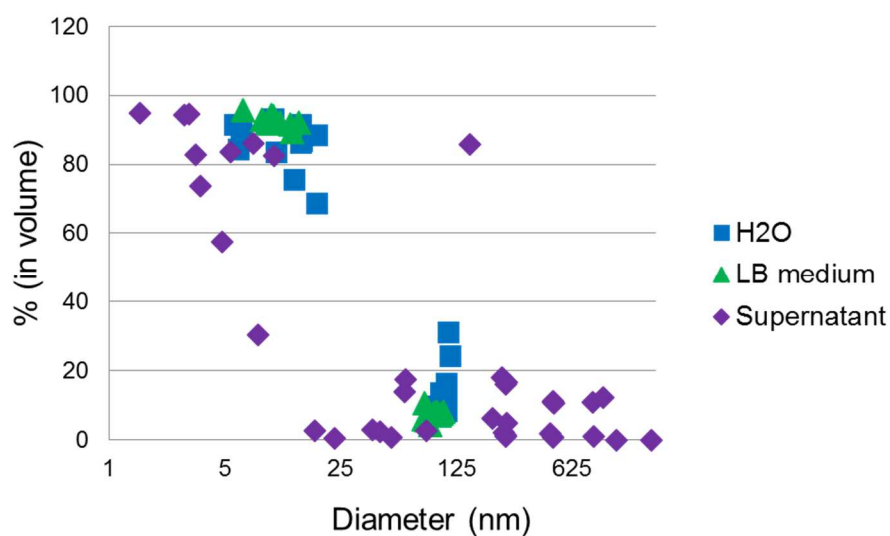


Figure S6: Dynamic light scattering (DLS) results for Ag-NPs after incubation for 5 h in water, LB and SN (in NA conditions). The diameter is represented in logarithmic scale.

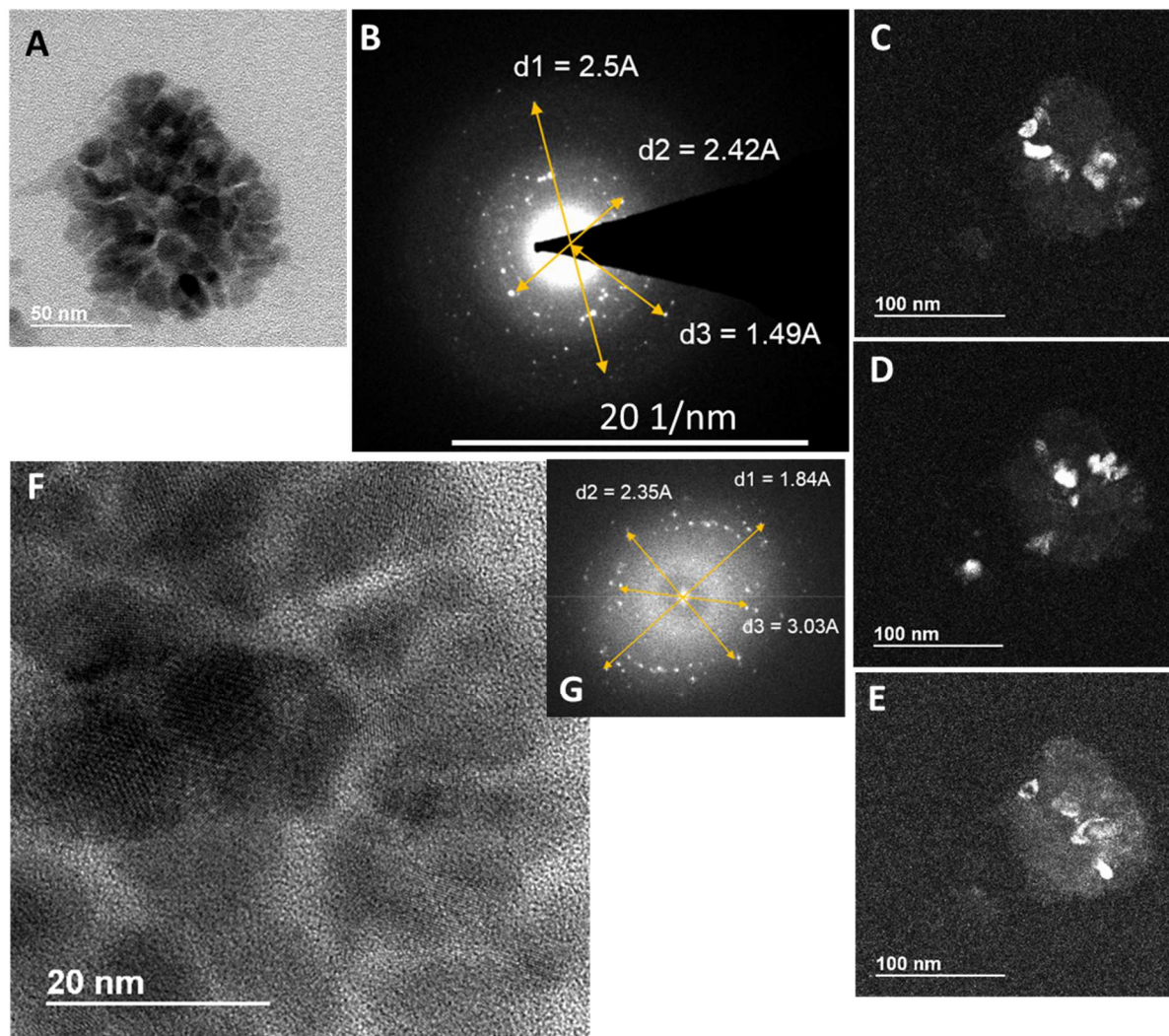
TEM-EDX analyses

Figure S7 : Analyses of a representative aggregate of Ag-NPs after incubation with *B. subtilis*. A, TEM image of the aggregate. B, electron diffraction obtained on the aggregate. Measured distances of d1, d2 and d3 of 2.5, 2.42 and 1.49 Å, with d1-d2 and d2-d3 angles of 116.4° and 43° are consistent with acanthite structure. C-E: Dark field images obtained by selecting a group of 2-3 spots in the SAED image. F,G High resolution image (F) and its Fourier transform (G) of a region of the aggregate. Again, measured distances d1, d2 and d3 of 1.84, 2.35 and 3.03 Å, with d1-d2 and d2-d3 angles of 90° and 125° are consistent with acanthite structure.

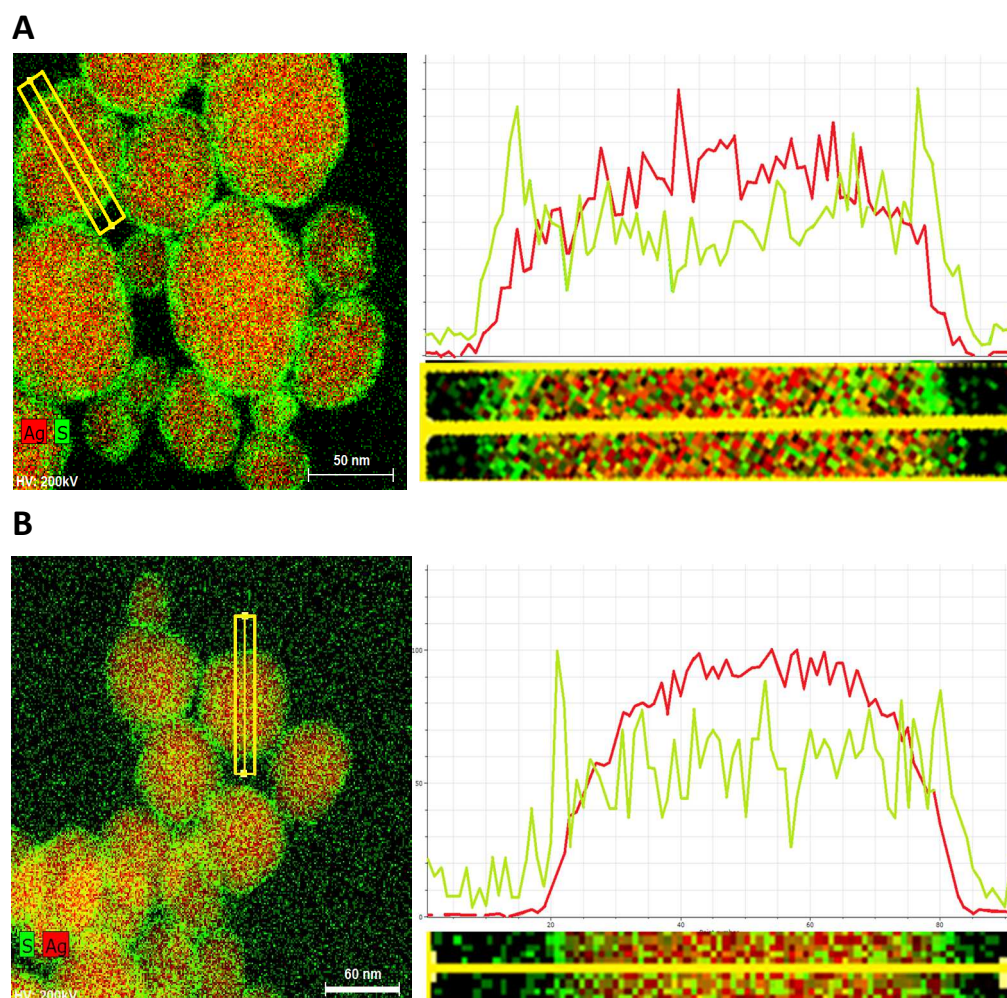


Figure S8: Example of elemental profiles for Ag (in red) and S (in green) across a AGNP after incubation in SN (A) and in LB medium (B), both in aerated condition. Data were extracted from the EDX maps. The S signal at the edge of the particle is stronger in SN than in LB, and for both conditions the highest S signal corresponds to a decreased Ag signal compared to the center of the particle.

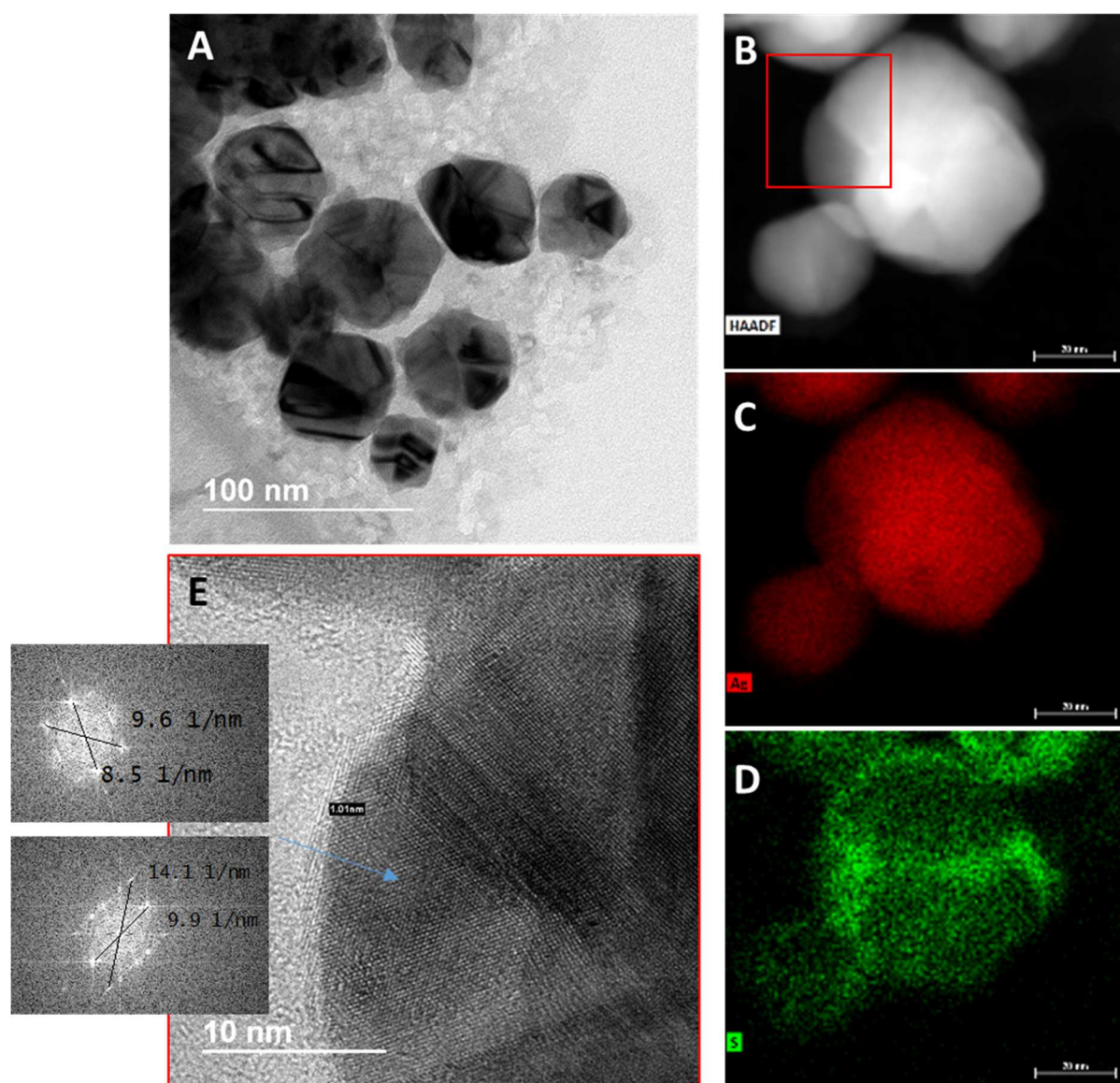


Figure S9: TEM observations of the Ag-NPs after incubation in SN, in aerated conditions. In A, the shades on the Ag-NPs indicate that the crystals are multi-twinned, with crystal dislocations appearing in dark or light gray. In addition, an organic matrix surrounding the NPs is visible. B, observation of two particles, and Ag (C) and S (D) elemental maps obtained by EDX. In this case, the sulfidation seems to progress near the crystal dislocations. E, High resolution image of the S-enriched zone (red square in B). The crystalline phase is Ag⁰.

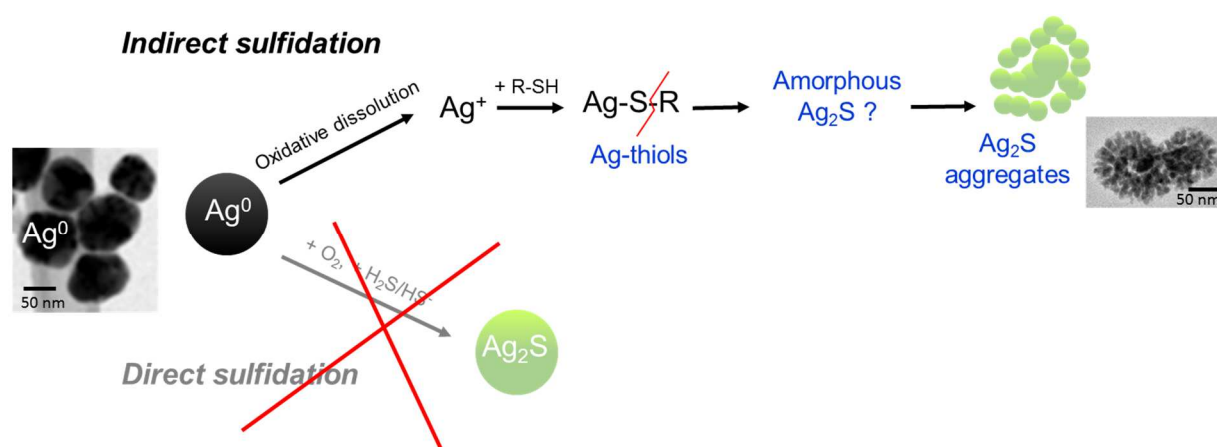


Figure S10: Proposed mechanism of sulfidation of Ag-NPs in the presence of *B. subtilis*.

1.3 Conclusion

Contrairement aux différentes études réalisées jusqu'à présent qui montrent l'induction d'une forte toxicité de l'argent pour les bactéries, nous n'observons pas d'effet létal dans nos conditions expérimentales. Très probablement car nous avons choisi de mimer les conditions environnementales : *Bacillus subtilis* a été exposé aux nanoparticules lors de la phase stationnaire de croissance, une phase où elle développe une plus grande tolérance au stress.

Concernant les modifications physico-chimiques des nanoparticules induites par *Bacillus subtilis*, cette étude montre l'induction d'une agglomération, d'une dissolution et d'une sulfuration des nanoparticules d'argent après un contact avec les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis*. Nous montrons que cette sulfuration est totale en présence de *Bacillus subtilis* et partielle (sous forme de « coating » autour de la nanoparticule) en présence des molécules sécrétées seules. N'ayant observé ni entrée d'argent ionique dans la cellule ni interaction avec la paroi bactérienne, nous faisons l'hypothèse que cette sulfuration est induite par les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis*. Cette hypothèse est renforcée par la caractérisation des produits de sulfuration suite à une incubation avec *Bacillus subtilis* : 18% des produits de sulfuration observés sont sous forme d'Ag₂S amorphe et/ou Ag-thiol. Ce type de sulfuration pourrait correspondre à une interaction entre les NPs et les protéines à groupement thiol sécrétées par *Bacillus subtilis*.

Cette étude permet de mettre en évidence l'influence de *Bacillus subtilis* ainsi que les molécules qu'elle sécrète sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules rejetées dans le sol. Ces caractéristiques sont importantes à évaluer dans les études de toxicologique car elles peuvent modifier leur toxicité. En effet, la sulfuration est connue pour diminuer la toxicité des nanoparticules, cependant l'impact de la spéciation l'Ag₂S (Ag-thiol, Ag₂S amorphe) sur leur toxicité est mal connue. De plus la sulfuration différentielle observée après une exposition à une culture totale de *Bacillus subtilis* (sulfuration totale) ou uniquement à son surnageant produit en l'absence d'Ag-NPs (sulfuration partielle), tend à montrer une modification du sécrétome de *Bacillus subtilis* après un stress aux NPs afin d'induire une sulfuration, une modification qui peut avoir de multiples conséquences sur la rhizosphère.

2. Interaction entre les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis* et les nanoparticules d'argent

2.1 Introduction

Une des caractéristiques de *Bacillus subtilis*, qui fait d'elle un bon modèle dans l'étude de l'impact biologique sur les modifications physico-chimiques des nanoparticules rejetées dans le sol est sa capacité à sécréter de nombreuses molécules, appelées EPS (extracellular polymeric substance). Les EPS sont constituées : de polysaccharides, de protéines (comprenant des enzymes), d'acides nucléiques, de lipopeptides et de poly- γ -glutamate. Ces molécules ont de nombreuses fonctions : antibiotique, résistance à des environnements hostiles, réserve nutritive ou même d'antifongique. La littérature recense essentiellement des études sur leur production, en raison de leur utilisation dans de nombreux process industriels. Notre hypothèse est que ces molécules sécrétées pourraient interagir avec les nanoparticules rejetées dans le sol, modifiant ainsi la biodisponibilité des nanoparticules mais également la fonction de ces molécules en interaction.

Parmi les molécules sécrétées, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'ADN et au poly- γ -glutamate (γ -PGA). En effet, l'ADN est déjà connu et même utilisé pour interagir avec l'argent (Rahban et al. 2010), le poly- γ -glutamate est quant à lui déjà utilisé pour la bioremédiation des métaux (Bajaj & Singhal 2011).

Ces études sont présentées sous forme d'article, elles révèlent des interactions entre le poly- γ -glutamate (γ -PGA) et les nanoparticules d'argent.

2.2 Article 2

Article soumis dans PLOS ONE (Août 2017).

The poly- γ -glutamate of *Bacillus subtilis* interacts specifically with the silver nanoparticles

Elise Eymard-Vernain ^{1,2}, Annie Adrait ³, Yohann Coute ³, Gallet Benoit⁴, Géraldine Sarret ¹, Thierry Rabilloud⁵, Cécile Lelong ².

¹ ISTerre (Institut des Sciences de la Terre), Université Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble, France ; ² Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux, BIG, ProMD-team Université Grenoble Alpes, CEA, UMR CNRS-CEA-UJF, Grenoble, France ; ³ Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant-Biologie à Grande Échelle, Université Grenoble Alpes, CEA, Grenoble, France ; ⁴ Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, F-38000 Grenoble, France ; ⁵ Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, BIG, Pro-MD team, UMR CNRS 5249, UMR CNRS-CEA-UJF, Grenoble, France.

Correspondance :

Dr., Lelong Cécile

E-mail : cecile.lelong@univ-grenoble-alpes.f

Abstract

For many years, silver nanoparticles, as with other antibacterial nanoparticles, have been extensively used in manufactured products. However, their fate in the environment is unclear and raises questions. We studied the fate of silver nanoparticles in the presence of bacteria under growth conditions that are similar to those found naturally in the environment (that is, bacteria in a stationary phase with low nutrient concentrations). We demonstrated that the viability and the metabolism of a gram-positive bacteria, *Bacillus subtilis*, exposed during the stationary phase is unaffected by 1 mg/L of silver nanoparticles. These results can be partly explained by a physical interaction of the poly- γ -glutamate (PGA) secreted by *Bacillus subtilis* with the silver nanoparticles. The coating of the silver nanoparticles by the secreted PGA likely results in a loss of the bioavailability of nanoparticles and, consequently, a decrease of their biocidal effect.

Introduction

Nanoparticles are used more and more frequently in industrial processes, food, medicine, or daily personal-care products. At the end of their life cycle, most of the nanoparticle products are discharged into the environment where they could potentially impact the ecological equilibria (Dimkpa 2014; Cox et al. 2017; Callaghan & MacCormack 2017; Sheng et al. 2015). For example, silver nanoparticles (n-Ag) are present as an antimicrobial agent in a range of consumer products (such as textiles, food packaging, and cosmetics) (Dizaj et al. 2014). They are easily able to leach from the products and, ultimately, end up in the environment. The majority of the released n-Ag are discharged into sewer systems. In wastewater treatment plants, 90% of Ag is retained in the sludge. It is now well known that in sewer systems and during wastewater treatment, n-Ag transforms into Ag₂S (Kim et al. 2010; Kaegi et al. 2011; Levard et al. 2011; Kaegi et al. 2013; Levard et al. 2012).

The toxicity of n-Ag to living organisms arises both from the released Ag⁺ and from the nanoparticles themselves (Choi et al. 2008; Maillard & Hartemann 2013; Marambio-Jones & Hoek 2010), but a clear picture of the mechanisms involved in the toxicity is still missing.

Moreover, the experimental conditions (that is, the physicochemical characteristics of the nanoparticles, the composition of the growth medium and the duration of the exposure) are suspected to influence the toxicity of n-Ag (Sheng & Liu 2017; Holden et al. 2016). Bacteria are one of the first targets of the nanoparticles in the environment. Some studies have already shown that nanoparticles may affect both bacterial physiology and microbial diversity (Holden et al. 2014). Alternatively, some resistance to n-Ag has been observed and has been attributed to an interaction between n-Ag and biocompounds present in the surrounding medium or produced by the bacteria (that is, DNA and proteins) (Morones et al. 2005; Wigginton et al. 2010). Bacteria are also more tolerant of n-Ag when the nanoparticles are applied on a mature bacterial biofilm (Sheng et al. 2015; Sheng & Liu 2017). Under this growth condition, the extracellular matrix produced by the bacteria protects itself by trapping the nanoparticles (Fabrega, Renshaw, et al. 2009). Thus, biomolecules excreted by bacteria seem to act as a buffer against the toxicity of n-Ag.

Despite the observations described above, very few studies have investigated the impact of bacteria on the chemicophysical properties of nanoparticles (Eymard-Vernain et al. n.d.) (Article 1). Our study is focused on the interactions between n-Ag and a model microorganism, *Bacillus subtilis*, that is present both in the gastrointestinal tract and in the rhizosphere. More precisely, our study is interested in the impact of the bioorganic molecules secreted by *Bacillus subtilis* on the nanoparticles.

Bacillus subtilis is studied and extensively used for its ability to secrete numerous biopolymers, also called extracellular polymeric substance (EPS). The EPS consists of polysaccharides, proteins, nucleic acids, lipopeptides and poly- γ -glutamate (PGA) (Marvasi et al. 2010). The EPS composition is complex and depends on the studied strain of bacteria and the growth conditions (for example, a medium that is liquid, solid, rich or minimal). These molecules have various functions, including antibiotic, fungicide and nutrient mobilisation, and are used for many commercial applications. Because of their tertiary structure and chemical properties, some of the components of the EPS (such as nucleic acids or PGA) can react with metals (such as chromium, zinc, arsenate, copper, lead or cadmium) and can be used for bioremediation of contaminated soils (Hakumai et al. 2016). PGA is also extensively studied because of its utilisation in several industrial processes in the food and medical

industries (Ogunleye et al. 2015; Luo et al. 2016; Khalil et al. 2017). Previously, we have shown that two types of nanoparticles, n-ZnO and n-TiO₂, drastically modify the central metabolism of *Bacillus subtilis* when exposed to these nanoparticles during the exponential growth phase in liquid culture. By contrast, in the present study, the bacteria are exposed to nanoparticles during the stationary phase. In this scenario we show, on one hand, that n-Ag or n-Ag₂S, have no significant effect on the intracellular physiology of the bacteria; on the other hand, we show that the secreted bioorganic molecules—and, more precisely, the PGA—specifically interact with the nanoparticles.

Materials and methods

Nanoparticles suspension

The silver nanoparticles and silver lactate were obtained from sigma: Ag (ref 758329, 5 wt% in ethylene glycol, <100 nm by TEM) and silver lactate (ref 85210, CH₃CH(OH)COOAg, molecular weight: 196.94). The n-Ag₂S was obtained from PVP-n-Ag after sulfidation as described by Levard and collaborators (Levard et al. 2011). Briefly, a suspension of 1mM of PVP-n-Ag (pH = 7) was mixed with 1mM Na₂S in a 0.01M NaNO₃ electrolyte. After 7 days of reaction, the solutions were centrifuged, washed three times with ultrapure water and dried. The total transformation of Ag⁰ from the PVP-n-Ag to n-Ag₂S was tested by x-ray diffraction (XRD). The physicochemical characteristics of the nanoparticles have been described by Eymard-Vernain and collaborators (Eymard-Vernain et al. n.d.) (Article 1)

Bacterial strain and culture media

The *Bacillus subtilis* strain used was the 3610 strain (wild type) (personal gift, Maria Laaberki). The cells were grown in LB medium: 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl. After 21 h of *Bacillus subtilis* growth under shaking in LB medium at 37°C (initial OD₆₀₀ = 0.01), the supernatant was recovered by centrifuging the culture at 15,000 g for 15 min and filtrating with 0.2 µm filters.

Nanoparticles exposures

Bacterial cells were grown in LB medium (250 ml) in Erlenmeyer flasks for 16 h with an initial OD₆₀₀ of 0.01. After 16 h of growth, the cell cultures were incubated without or with 1 mg/L of n-Ag, 1 mg/L of n-Ag₂S or 1.8 mg/L of silver lactate (equal to mg/L of silver) for 5 h while being shaken in 250 mL Erlenmeyer flasks. The pellets and supernatants were separated after centrifugation at 15,000 g for 15min. For the cell-free supernatants, the supernatants were incubated without or with 1 mg/L of n-Ag, 1 mg/L of n-Ag₂S or 1.8 mg/L of silver lactate for 5 h. The mixture was then centrifuged for 15 min at 15,000 g. All experiments were performed in triplicate (three independent growth cultures) with at least two technical replicates.

TEM

All samples were obtained after centrifugation at 15,000 g for 30 min. The samples were fixed using high-pressure freezing, freeze substitution and resin embedding , and then prepared as 400 nm sections and deposited on a TEM copper grid. Samples were observed using a Tecnai OSIRIS (FEI) in STEM mode and operated at 200 kV with a probe current close to 0.7 nA.

High pressure freezing and freeze-substitution

Cells were centrifuged at 4,500 g for 5 min. A pellet volume of 1.4 μ l was dispensed on the 200- μ m side of a type-A 3-mm gold platelet (Leica Microsystems). It was then covered with the flat side of a type-B 3-mm aluminium platelet (Leica Microsystems) and vitrified by high-pressure freezing using an HPM100 system (Leica Microsystems). Next, the samples underwent a process of freeze-substitution at -90°C for 80 h in acetone supplemented with 1% OsO_4 , and they were then warmed up slowly ($1^{\circ}\text{C}/\text{h}$) to -60°C in an automated freeze-substitution device (AFS2; Leica Microsystems). After 8 to 12 h, the temperature was raised ($1^{\circ}\text{C}/\text{h}$) to -30°C , and the samples were kept at this temperature for another 8 to 12 h. The samples were kept for 1 h at 0°C , brought to 30°C and then rinsed four times in pure acetone. The samples were then infiltrated with gradually increasing concentrations of agar low viscosity resin (LVR; Agar Scientific) in acetone (1:2, 1:1 and 2:1 [vol/vol], and pure) for 2 to 3 h while raising the temperature to 20°C . Pure LVR was added at room temperature. After polymerisation for 24 h at 60°C , 70- to 400-nm sections were obtained using an ultra-microtome UC7 (Leica Microsystems) and an Ultra 35° diamond knife (DiATOME). The sections were collected on formvar–carbon-coated 100-mesh copper grids (for TEM) or on grids with a Si_3N_4 window (for nanoXRF/nanoXANES). The sections for TEM imaging were post-stained for 10 min with 2% aqueous uranyl acetate, rinsed, and incubated for 5 min with lead citrate.

DNA

After 21 h of growth, 8 ml of WT culture were centrifuged at 3,500 g for 20 min. Next, 800 µl of sodium citrate buffer (1.5 M NaCl, 0.1 M sodium citrate) was added to the cell-free supernatant and incubated at 37°C for 30 min. After 30 min of incubation, 6.5 ml of NaCl was added and samples were centrifuged at 3,500 g for 10 min. Then supernatant was precipitated by the addition of one volume of ethanol and centrifuged at 15,000 g for 10 min. Finally, the sample was dried and resuspended in 50 µl of H₂O.

DNA separation

Before separation on 1% agarose gels in TBE buffer, 2 µl of loading buffer in 10 µl of DNA sample was added. To visualise the DNA, SYBR green was added to the gel and ultraviolet revelation was carried out.

PGA extraction

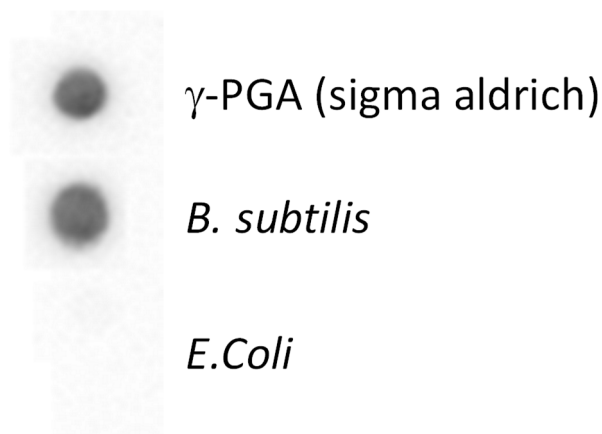
After 5 h of incubation, 12 ml of each sample were centrifuged at 3,500 g for 20 min at room temperature. The supernatant was precipitated by the addition of three volumes of cold ethanol, followed by the cooling of the supernatant at -20°C for at least 12 h. After the 12 h incubation, the samples were centrifuged at 10,000 g for 10 min, and the γ-PGA pellets were resuspended in 200 µL of 300 mM NaCl. All experiments were performed in triplicate (three independent growth cultures) with at least two technical replicates.

γ-PGA Separation

To begin, 10 µL γ-PGA samples were incubated with 5 µl of benzonase (25 units/µl) for 30 min at 37°C. Before separation on 0.8% agarose gels during 1 h at 90 mA in TAE buffer, 2 µl of loading buffer (Bromophenol blue 5 mg/L, 50% glycerol and 50% running buffer) was added to the γ-PGA samples. γ-PGA was visualised by staining with 0.5% methylene blue in 3% acetic acid for 30 min and destaining in H₂O. To verify the absence of DNA, SYBR green was added to the gel and ultraviolet revelation was realised.

Dot blot assay

Nitrocellulose membrane (Bio-Rad, ref 165-0115) was presoaked in a mixture of Tris (250 mM) and glycine (2 M) for 5 min and assembled onto a dot-blot apparatus (Bio-Rad). Next, 50 µl of PGA was extracted, as described previously; the PGA was added to appropriate wells; it was allowed to filter by gravity for 10 min; and it was followed by vacuum filtration for 5 min to remove all liquid from the wells. The membrane was removed and treated with a blocking solution (1% PVP40 in TBS–Tween) on a rocking shaker for 1 h at room temperature. A 1:2,000 dilution of anti-polyglutamate antibody (from Coger, ref: AG--25B-0030-C050) was added to the membrane as a primary Ab, and it was incubated for 1 h at room temperature. After three washes in TBS–Tween–1% PVP40, the membrane was incubated for 1 h with 1:5,000 secondary antibody, anti-rabbit IgG-HRP (Sigma, A0545). After three washes in PBS–Tween, the dot blot was developed using the Luminata Forte Western HRP substrate (from Merck millipore, ref: WBLUF0500). The specificity of the primary antibody (anti-polyglutamate chain) was checked on commercial PGA samples, PGA extracted from *Bacillus subtilis* supernatant culture and on an *Escherichia coli* extract as a negative control (supplementary data S1).



Supplementary data 1: Antibodies are specific to γ-PGA. Representative dot blot analysis of γ-PGA (sigma Aldrich) and of γ-PGA extracted from *Bacillus subtilis* or *Escherichia coli* supernatant. *Escherichia coli* does not produce any PGA.

Quantification of PGA

After revelation of the intensity of each sample is quantified using ImageJ software then normalised by the control and by the amount of proteins, the PGA samples quantified by Bradford assay. All experiments were performed in triplicate (three independent growth cultures) with at least two technical replicates.

Q-RT-PCR

Cell pellets from the different cultures were obtained as described in the section on nanoparticle stress. The cell pellets were lysed and the total RNA was extracted following the supplier's manual for NucleoSpin® RA II (Machery-Nagel®). The RNA preparations were rendered DNA-free using a two-step process. In the first step, water and lithium chloride (LiCl) were added to 60 µl of RNA preparation to create a final volume of 120 µl, with a concentration of 3 M. The samples were chilled for 2 h at -80°C and centrifuged, the pellets were washed twice with 100 µl ethanol and the samples were then centrifuged for 5 min at 13,000 g at 4°C. The supernatant was removed by aspiration and the pellets were dried for 20 min. The pellets were resuspended in 50 µl of H₂O. In the second step, RNA preparation precipitates with LiCl were incubated with DNase I (RNase-free) (Sigma-aldrich®), following the supplier's manual. The reverse transcription was realised using the kit manual for Enhanced Avian S RT-PCR of sigma supplier with 1 µg of RNA. Finally, RT-qPCR reactions were carried out in a final volume of 10 µl, with 2 µl of oligonucleotides as primers, 2 µl of cDNA diluted at 1:4 and 5 µl of iTaq universal SYBR Green supermix (Bio-Rad). The RT-qPCR reactions were carried out in automated thermocyclers (Bio-Rad), beginning by 20 sec of heating at 95°C. Then the amplifications were carried out by 39 cycles of incubation at 95°C (30 sec) and 55°C (20 sec). The final step was carried out as an extension to the incubation at 68°C for 5 sec. The RT-qPCR was realised with a fluorescent reporter molecule called SYBR® Green I, which allows the progress of the amplification reaction to be monitored. With each amplification cycle, the fluorescent intensity was measured, and it was proportional to the amplicon concentration. Next, a threshold level of fluorescence was set above the background. The cycle number at which an amplification plot crosses the threshold fluorescence level is called the "Ct", or threshold cycle. The expression of RNA was normalised by a control condition and by a reference gene, *codY*. All experiments were

performed in triplicate (three independent growth cultures) with at least two technical replicates.

Measurement of the lactate dehydrogenase activity

Cells grown with or without nanoparticle stress were harvested by centrifugation at 13,000 g for 15 min, and the supernatant was taken for detection of LDH release. In 700 μ L of supernatant, the following was added prior to analysis: 10 μ L of 3 mM phenazine methosulfate, 10 μ L of 30 mM of NAD⁺, 5 μ L of 42 mM iodonitrotetrazolium, 10 μ L of 500 nM lactate and 275 μ L of buffer (0.2M HEPES, 2mM MgCl₂, 2% Triton). The absorbance at 500 nm was measured after 15 min of incubation. A mix without lactate was used as a blank. All experiments were performed in triplicate (three independent growth cultures) with at least two technical replicates.

Proteomic methods

The proteomic methods are described in the PRIDE repository PXD007128.

Results

During the stationary growth phase, exposure to n-Ag has no significant impact on *Bacillus subtilis* central metabolism.

The lack or low availability of chemically complex nutrients corresponds to the natural growth conditions of bacteria in the environment. To try to get as close as possible to recreating these natural conditions and to be able to study the EPS secreted by the bacteria, the responses of *Bacillus subtilis* to n-Ag were studied during the stationary growth phase (before the cell death). To find the optimal growth conditions during which the bacteria were still alive but during which they were exposed to low levels of nutrients, (that is, the stationary phase), we measured the *Bacillus subtilis* growth curve (OD₆₀₀) in LB medium, and we followed their viability by plating onto LB agar over a 30 h period (Fig. 1a). In our experimental conditions, the bacteria reached the stationary growth phase after 10 h and began to die after 30 h (Fig 1a). To test the effects of n-Ag under growth conditions that are as close as possible to environmental growth conditions (that is, a complex biological medium that is low in nutrients), *Bacillus subtilis* cells were exposed, after 16 h of growth in LB medium, to silver (specifically, n-Ag, n-Ag₂S or silver lactate) at concentrations ranging from 0.1 to 10 mg/L during a 7 h period. The viability was assayed all along the exposition by plating on LB agar.

Regardless of the silver concentration tested and the exposure time, the viability was not significantly affected (Fig 1b). As this test would miss a low mortality of the bacteria, we further confirmed this observation by measuring the activity of an intracellular enzyme, the lactate dehydrogenase (LDH), in the cell free supernatant. After 5 h of exposure, the LDH-specific activity was $< 1.9 \mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g prot}$ with or without exposition to silver (nanoparticles or lactate). Furthermore, the observations of bacteria by transmission electron microscopy (TEM) showed that cells exposed to 1 mg/L of n-Ag, n-Ag₂S or silver lactate were intact and comparable to the control, with no sign of lysed cells (Fig 1c).

For all of the following experiments, the *Bacillus subtilis* cells were grown in LB medium for 16 h and then exposed for 5 h to 1 mg/L of silver, n-Ag, n-Ag₂S or silver lactate. A concentration of 1 mg/L was chosen for all of the following experiments in order to be as close as possible to recreating the environmental conditions (Sun et al. 2014). As previously

shown, this concentration did not induce cell death. However, silver could alter the cellular metabolism, even for viable cells, as demonstrated previously for zinc oxide (Luche et al. 2016). In order to investigate such effects, the intracellular proteome was analysed by mass spectrometry (data are available via ProteomeXchange with identifier PXD007128). Under our experimental conditions, no significant modifications of protein expression were detected after exposure to n-Ag, n-Ag₂S or silver lactate.

Taken together, the viability, the LDH activity and mass spectrometry data led us to conclude that the *Bacillus subtilis* cells did not appear to be affected by an exposure to 1 mg/L of silver during the stationary phase. In view of this hardly detectable impact of silver on *Bacillus subtilis* metabolism under our experimental conditions, our working hypothesis is that secreted molecules interact with n-Ag and buffer their toxic effects. Indeed, *Bacillus subtilis* is studied and extensively used because of its ability to secrete numerous biopolymers and, more specifically, to secrete soluble biopolymers that present an affinity for silver. DNA and PGA are known to have affinity for metals such as Ag⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ or Ni²⁺ due to the presence of phosphoryl or carboxyl groups and to their helical three-dimensional structure (Ogunleye et al. 2015). These biopolymers were extracted from the cell culture supernatants of growth cultures that were exposed or not to nanoparticles, as described in the Materials and Methods section, and they are tested for their binding abilities to n-Ag.

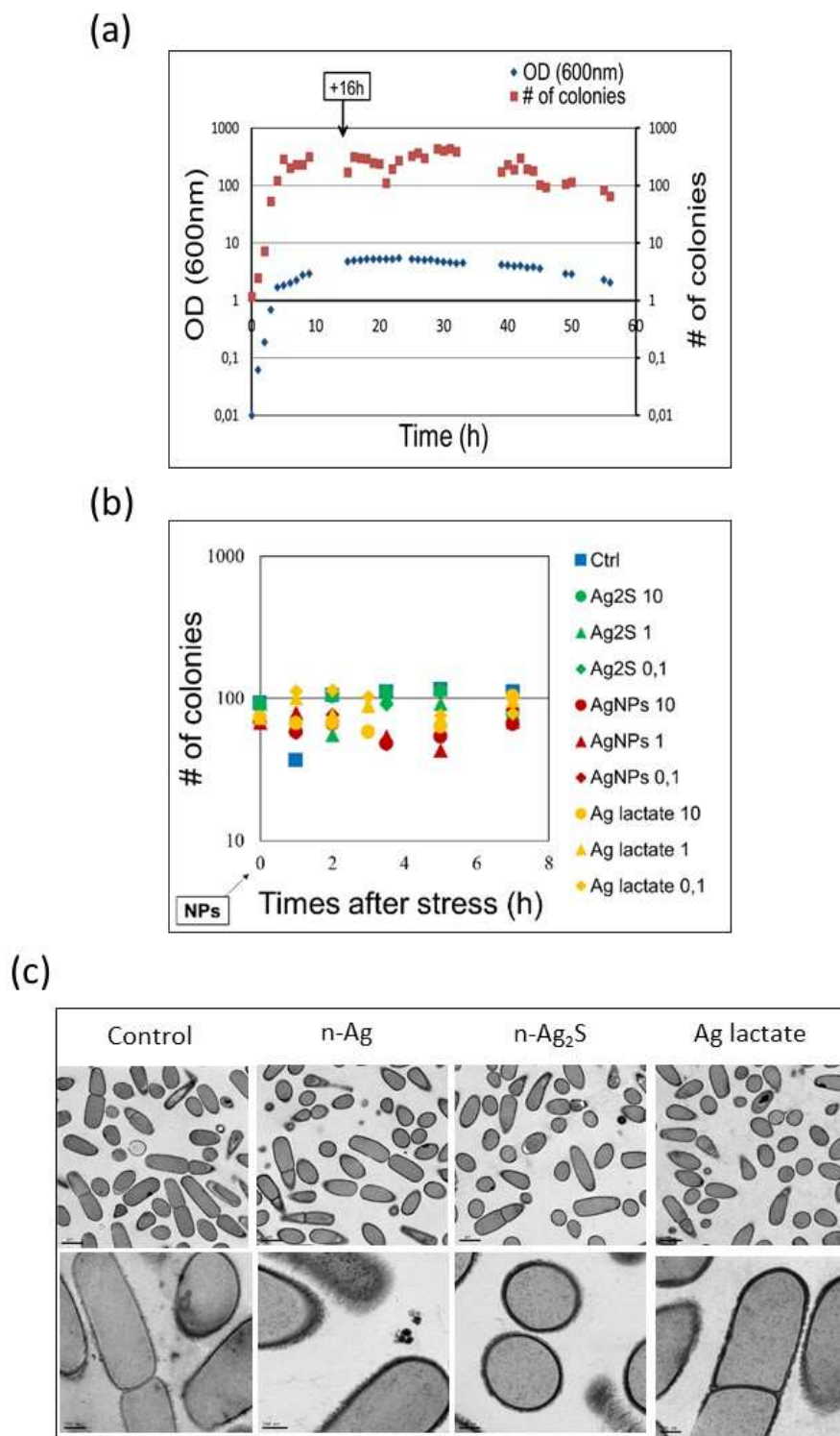


Figure 1: Effect of silver nanoparticles (n-Ag) on *Bacillus subtilis* growth and morphology.

(a) Growth curve of *Bacillus subtilis* without Ag: square, colony-forming unit and diamond, OD_{600} . (b) Viability of *Bacillus subtilis* exposed to different concentrations (in mg/L) of n-Ag, n-Ag₂S and silver lactate after 16 h of growth during 5 h. (c) Morphology of *Bacillus subtilis* after incubation with 1 mg/L of Ag. Scale: 1µm in the first line, and 200nm for second line.

Extracellular DNA does not interact with silver nanoparticles

The extracellular DNA extracted from the supernatant of cells exposed or not exposed to nanoparticles was quantified by spectrophotometric analysis and gel electrophoresis. No significant modifications to the quantity or the quality (that is, the migration profile on gel electrophoresis), was observed in the presence of silver (data not shown). Thus, under our experimental growth culture conditions, the presence of silver had no detectable impact on the extracellular DNA.

The silver nanoparticles specifically interact with the poly- γ -glutamate

The presence of silver, n-Ag, n-Ag₂S or silver lactate had no impact on the quality of the secreted PGA, as shown by their agarose gel electrophoresis profiles (Fig 2). Regardless of the experimental growth conditions, all of the secreted PGA displayed the same migration profile, with an average apparent weight of approximately 100 kDa (by comparison with the apparent weight of commercial PGA). By contrast, the dot blot analysis showed that the presence of n-Ag or n-Ag₂S during the stationary growth phase decreased the secreted PGA concentrations by about 20%, whereas the silver lactate had no significant effect (Fig. 3). The decrease of the extracellular PGA observed in the presence of nanoparticles may be the result of two mechanisms: either physical interactions between the PGA and the nanoparticles, or a physiological response of the bacteria to the presence of nanoparticles in the growth culture medium. This physiological response may be the result of an increase in PGA degradation through the activity of the endo- γ -glutamyl peptidase PgdS or the exo- γ -glutamyl peptidase Ggt, or a decrease of PGA synthesis through the enzyme coded by the *pgsBCA* (*capBCA*) operon (Candela & Fouet 2006). None of these enzymes were detected during the proteomic analysis. Thus, we studied the impact of nanoparticles on PGA metabolism at the transcriptional level using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The total mRNA was extracted 15 and 30 min after the addition of nanoparticles to the growth medium, and the expression profile was identical at both times points (data not shown). The *capBCA* operon was not expressed regardless of the growth conditions tested (data not shown). Ggt and pgdS were expressed, but no significant difference was observed when the cells were exposed to nanoparticles or silver lactate compared to the control (Fig. 4).

The results of our experiment allowed us to conclude that under our experimental conditions, PGA metabolism was not affected by n-Ag. Thus, the decrease in extracellular PGA was probably due to a physical interaction with the nanoparticles. To test this hypothesis, the growth culture supernatant without silver was recovered after 21 h of growth, and it was then cleaned by centrifugation and filtration to remove all of the bacteria cells and possible debris. The nanoparticles, n-Ag or n-Ag₂S, or silver lactate were added to the cell-free supernatant and incubated for 5 h. After centrifugation to sediment nanoparticles and precipitated biopolymers, the soluble PGA was recovered in the supernatant and quantified by dot blot (Fig. 5). As with the presence of bacteria, the PGA concentration decreased when nanoparticles, n-Ag or n-Ag₂S, were added to the cell-free supernatant, whereas the silver lactate has no effect. The control using silver lactate showed that the decrease in soluble PGA could be attributed to interactions with nanoparticles and not to silver ion-induced precipitation. In the absence of bacteria, 20% and 80% of PGA disappeared after the addition of n-Ag₂S and n-Ag, respectively. To confirm the interaction between the PGA and the nanoparticles, nanoparticles concentrations ranging from 0.1 mg/L to 100 mg/L were added to the cell-free supernatant (Fig. 6), and the free PGA was quantified as previously described. The free PGA detected after incubation was inversely related to the concentration of the nanoparticles added

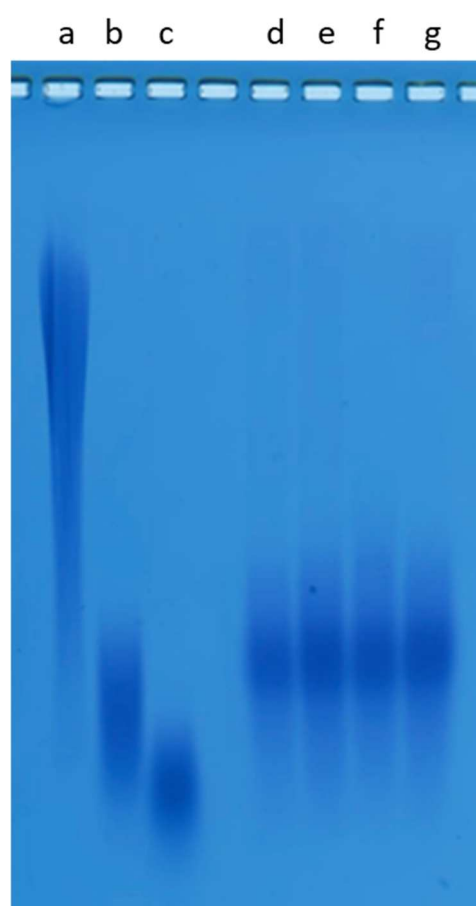


Figure 2: Profile migration of PGA (Poly- γ -glutamate) on agarose gel electrophoresis.

(a) γ -PGA (sigma aldrich); (b) commercial PGA 10–15 kDa; (c) commercial PGA 15–50 kDa; and PGA extracted from the supernatant of *Bacillus subtilis* growth, (d) after no exposure and after exposure to (e) silver nanoparticles (n-Ag), (f) n-Ag₂S or (g) Ag lactate.

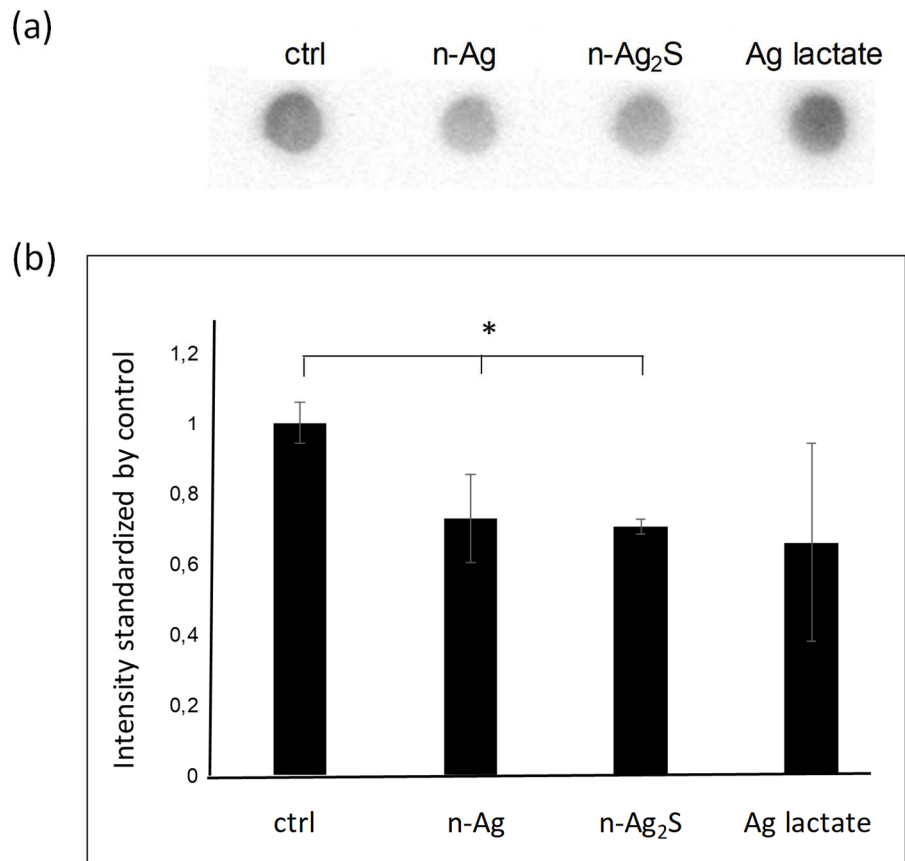


Figure 3: Less PGA is extracted from growth supernatant after exposure of *Bacillus subtilis* to silver nanoparticles (n-Ag). (a) Representative dot blot of the extracted PGA. (b) Quantification of dot blot intensity after stress to *Bacillus subtilis*. The intensities were normalised by the control and the amount of proteins. Error bars ± 1 standard deviation ($n \geq 3$). Asterisks (*) indicate significant differences vs the control ($p < 0.05$).

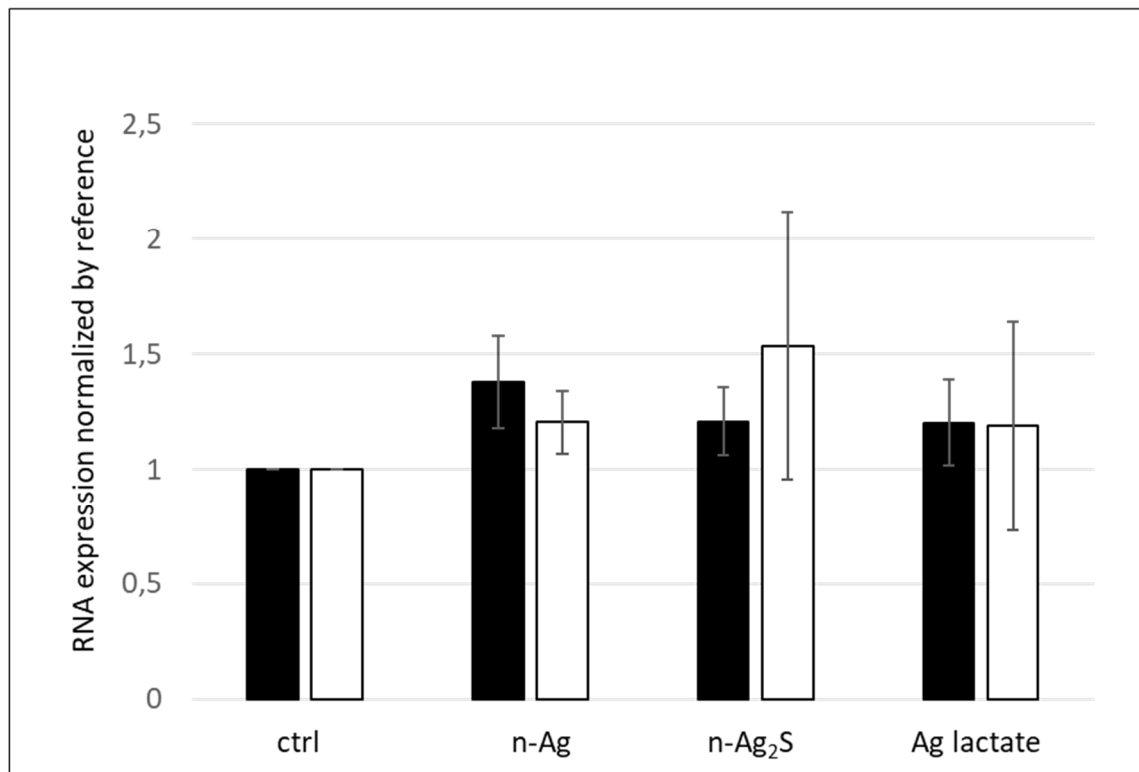


Figure 4: Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) of *ggt* and *pgdS* mRNA.

The expression of *ggt* (black) and *pgdS* (white) was measured by qRT-PCR on *Bacillus subtilis* exposed to 1 mg/L of silver nanoparticles (n-Ag), 1 mg/L of n-Ag₂S or 1.8 mg/L of Ag lactate. The RNA expression is described in the Materials and Methods section. Error bars ± 1 standard deviation ($n \geq 3$).

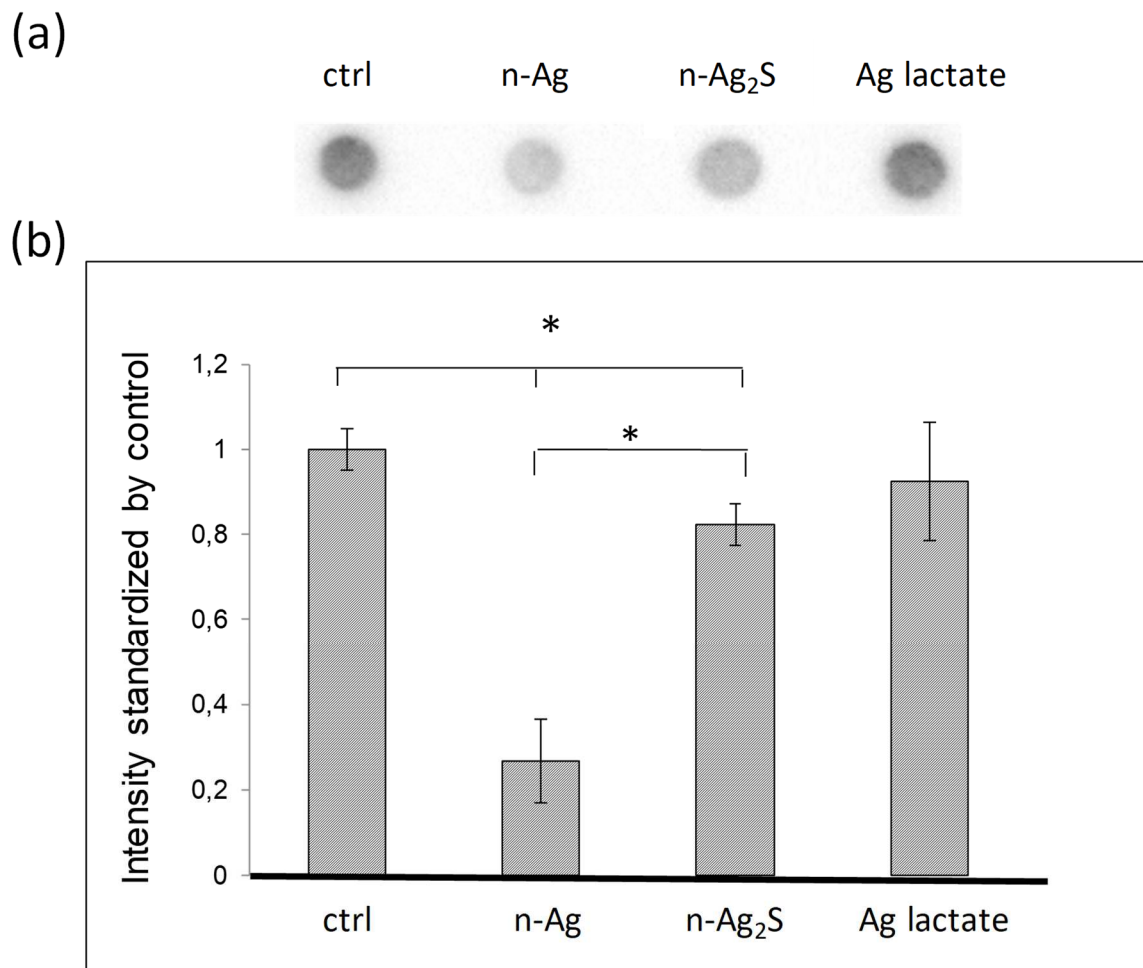


Figure 5: PGA interacts specifically with silver nanoparticles (n-Ag). (a) Representative dot blot of PGA after incubation of cell-free supernatant with n-Ag, n-Ag₂S or Ag lactate. (b) Quantification of dot blot. The intensity was normalised by the control and the amount of proteins. Error bars ± 1 standard deviation ($n \geq 3$). Asterisks (*) indicate significant differences ($p < 0.05$).

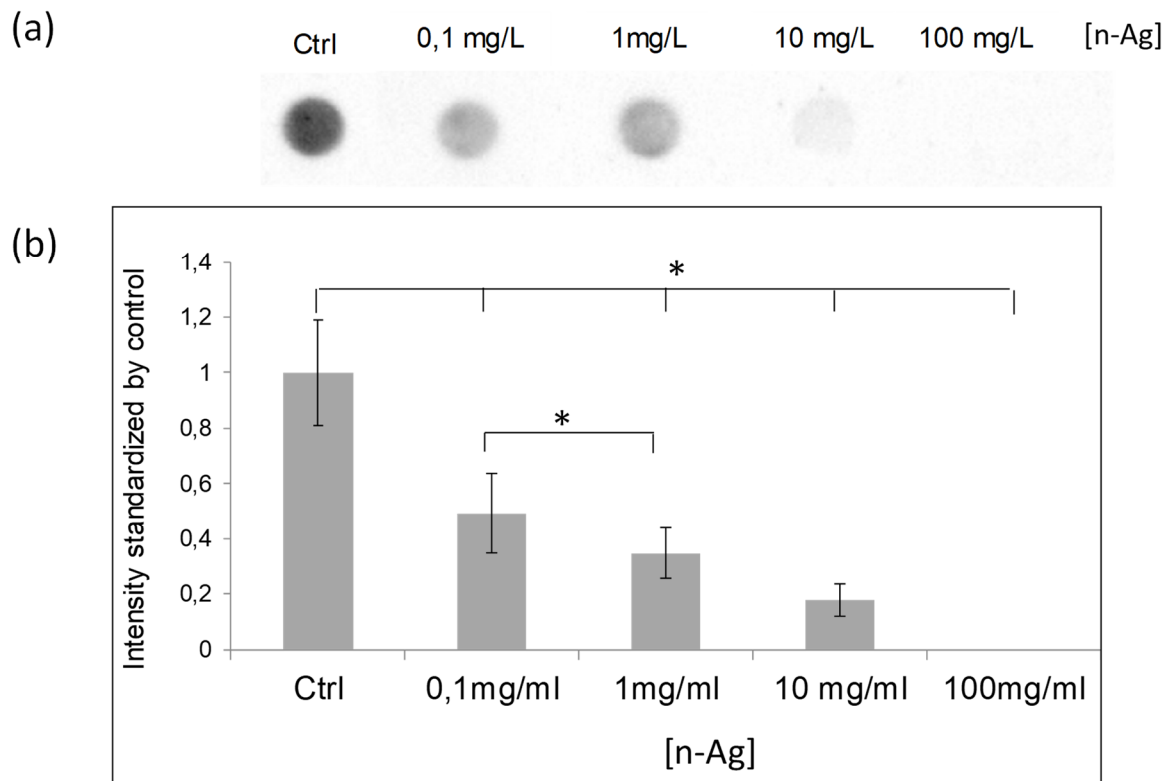


Figure 6: In the cell-free supernatant, the soluble PGA is inversely related to the silver nanoparticle (n-Ag) concentration. (a) Representative dot blot analysis of the soluble PGA in the cell-free supernatant after incubation with n-Ag at different concentrations, ranging from 0 to 100 mg/ml. (b) Quantification of dot blot intensity normalised by the control and the amount of proteins. Error bars ± 1 standard deviation ($n \geq 3$). Asterisks (*) indicate significant differences ($p < 0.05$).

Discussion

In this study, we have shown using viability assays, TEM observations and proteomic analyses that 1 mg/L of silver nanoparticles applied on a stationary phase growth culture has no significant effect on *Bacillus subtilis*. Using similar silver nanoparticles concentrations, Gambino and collaborators (Gambino et al. 2015) have described significant effects on protein expression in *Bacillus subtilis*, particularly when considering proteins involved in antioxidant responses. Zhang and collaborators (Zhang et al. 2008) also observed a drastic effects on *Bacillus subtilis* viability; almost 100% lethality after an overnight incubation with 1–2 mg/L of n-Ag. However, in both studies, the nanoparticles were applied at the beginning of the growth phase (that is, during the exponential phase). In contrast, under our experimental conditions, the nanoparticles were applied after 16 h of growth. The cells were in a different physiological state—the stationary phase—during which they had already adapted their metabolism to physiological stress (that is, low levels of nutrients). More generally, during the stationary phase, the bacteria expressed specific proteins to resist to environmental stresses. Our observations are in accordance with the observations that the bacteria are also more resistant to n-Ag when the nanoparticles are applied on a mature bacterial biofilm (Sheng et al. 2015; Sheng & Liu 2017). These results can also be correlated with our previous observations (Eymard-Vernain et al. n.d.) that showed that under these growth culture conditions, no Ag internalisation or adsorption on the cell wall was detected (Eymard-Vernain et al. n.d.).

One way to resist external aggressions is to secrete biomolecules, from enzymes to polymers (Marvasi et al. 2010). One EPS is PGA, which is specifically expressed and secreted during the stationary phase (Ashiuchi et al. 2001; Zeng et al. 2013; Scoffone et al. 2013). One of the reasons for the survival of *Bacillus subtilis* at the low doses of silver used in this experiment may be the interaction between PGA and the nanoparticles. During all of our experimental conditions, both with the incubation of nanoparticles with living cells and with a cell-free supernatant, we observed a specific interaction between the secreted PGA and the silver nanoparticles, while the extracellular DNA was not affected by the presence of nanoparticles. Yu has shown with colloidal silver nanoparticles stabilised by PGA that the bactericidal effect is inversely proportional to the PGA concentration (Yu 2007).

However, we noticed a significant difference in the percentage of PGA that interacted with the n-Ag under different conditions—20% and 80% when the incubation was performed with living cells and the cell-free supernatant, respectively. No significant difference was detected in the presence of n-Ag₂S—under both conditions (with cells and cell-free), 20% of the PGA interacted with n-Ag₂S. These results suggest that the interaction of PGA with the silver nanoparticles is drastically dependent on the speciation of the nanoparticles: the more that the n-Ag are sulfidized, the less that the PGA interact with the nanoparticles.

It is generally considered that n-Ag interacts mostly with thiol-containing molecules that are present in the environment (or with chlorine ions in saline environments). A parallel study of the chemical transformations of n-Ag in the presence of *Bacillus subtilis* and of its secretome demonstrated some sulfidation (Eymard-Vernain et al. n.d.). The present study showed that biomolecule-bearing carboxyl groups and those that are devoid of thiol groups are also able to interact with n-Ag. Putting the results of the two studies together, it can be concluded that the absence of toxicity of n-Ag may be explained by both the sulfidation process and the interaction between PGA and the nanoparticles, with PGA acting as a capping agent. These results provide evidence of the strong impact of bacteria on the speciation and, therefore, on the bioavailability of n-Ag in the environment.

We have shown here that under our experimental conditions, n-Ag has no impact on *Bacillus subtilis* central metabolism, but it does modify the concentration of free PGA in the medium. The role of PGA in the environment is not completely elucidated, but it is thought to be involved in several biological processes of the bacteria. PGA is also thought to be involved in the interaction between bacteria and plants, including as a probable carbon source reserve, as a protective factor against dehydration and heavy metals toxicity, in biofilm formation (Stanley & Lazazzera 2005)(Yu et al. 2016), in plant root colonisation (Yu et al. 2016), as a cryoprotectant that prevents crop from cold-induced damage (Lei et al. 2015), in the improvement of the capacity of plants to uptake nutrients (Zhang, Yang, et al. 2017) and as a biocontrol against fusarium root rot (Wang, Wang, et al. 2017). In pathogenic bacilli species, the shell formed by PGA may enhance the virulence of the bacteria by shielding it from the host's immune surveillance (Drysdale et al. 2005), and it may also protect bacteria from phagocytosis and from bacteriophages (Mamberti et al. 2015). In this context, by modifying the availability of PGA, the presence of silver nanoparticles in the soil may impact

the metabolism of the rhizosphere and of the plants. Even if bacterial metabolism is unaffected by the nanoparticles, it would be important in the future to study more precisely the fate of the bacterial secretome and its impact on the plants that grow in the vicinity.

We have shown here and in a previous study (Eymard-Vernain et al. n.d.) that bacteria play a crucial role in the fate of n-Ag in a complex biological medium. The presence of *Bacillus subtilis* induces not only the almost total sulfidation of the n-Ag (Eymard-Vernain et al. n.d.), but also influences the interaction of the n-Ag with the secreted PGA. In both cases, the modifications of the nanoparticles likely result in a loss of their bioavailability and, consequently, a decrease in their biocidal effect. But these results raise a new issue—that is, what is the fate of PGA-coated n-Ag in the environment? In a context of controlled wastewater treatment, understanding the interaction between PGA and n-Ag would be of great benefit for the removal of contamination as a result of silver nanoparticles. But in contaminated soil, will PGA-coated n-Ag stay in an inert state or will it migrate into other biological compartments, such as in the plant and then into the gut of cattle during plant ingestion? Several publications describe the role of PGA in the facilitation of drug delivery (Pereira et al. 2012; Liu et al. 2015; Shih & Van 2001; Ogunleye et al. 2015). If the PGA-coated n-Ag is ingested, will the PGA shell also promote the nanoparticle delivery into intestinal cells? Considering the biological context, future studies must bear in mind that PGA-coated n-Ag may have a specific biological impact.

2.3 Conclusion

Au vu des observations réalisées sur l'absence de toxicité des nanoparticules d'argent pour *Bacillus subtilis* dans nos conditions expérimentales, cette étude s'est concentrée sur les interactions potentielles entre les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis* et les nanoparticules d'argent. Contrairement à l'affinité connue entre l'argent et l'ADN, dans nos conditions expérimentales, nous n'observons pas d'interaction entre l'ADN sécrété par *Bacillus subtilis* et les nanoparticules. Par contre, nos résultats montrent une interaction avec une autre molécule sécrétée par *Bacillus subtilis*, le poly- γ -glutamate. Connaissant la sulfuration importante des nanoparticules d'argent lors de leur rejet dans les stations d'épuration ou après un contact avec *Bacillus subtilis* observé dans notre précédente étude (article 1), nous avons également testé l'interaction entre le γ -PGA et l'Ag₂S-NPs. Nous avons observé une interaction significative entre le γ -PGA et les nanoparticules sulfurées avec toutefois, un pourcentage inférieur à celui observé avec les Ag-NP.

Les résultats de cette étude montrent la possibilité d'interaction entre les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis* et les nanoparticules d'argent. Ces interactions peuvent ainsi conduire aussi bien à une diminution de leur biodisponibilité et par conséquent une diminution de leur effet biocide, qu'à une perturbation de la fonction des molécules sécrétées, essentielles pour la rhizosphère et pour les plantes. En effet, le γ -PGA est connu pour améliorer l'assimilation des nutriments des plantes (Zhang, Yang, et al. 2017), une diminution de la biodisponibilité du γ -PGA suite à une interaction avec les NPs peut donc avoir des conséquences directes sur la croissance des plantes.

.

Partie 2 : Effets des nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc sur *Bacillus subtilis*

De nombreuses études ont déjà été réalisées sur l'effet antibactérien des nanoparticules ; celles-ci montrent essentiellement une activation des ROS , conduisant ainsi à une mort cellulaire (Dizaj et al. 2014; Lipovsky et al. 2011). Cependant, ces études utilisent des doses importantes de nanoparticules très éloignées des doses environnementales. La particularité de notre étude est d'utiliser des doses plus réalistes afin d'aller plus loin dans l'identification des mécanismes mis en place par *Bacillus subtilis* en réponse à un stress aux nanoparticules, en renseignant sur les mécanismes moléculaires mis en place par *Bacillus subtilis*.

Pour cela les modifications du protéome intracellulaire de *Bacillus subtilis* ont été étudiées après un stress aux nanoparticules de TiO₂ et de ZnO. Dans ce but, les techniques utilisées passent de l'électrophorèse bidimensionnelle de protéine à la spectrométrie de masse, ces techniques ont permis de mettre en évidence la modification de plusieurs voies métaboliques. Nous avons validé ces modifications à l'aide de différents tests biochimiques et métaboliques. Ces différentes études seront présentées sous forme de deux articles (Article 4 et 5), qui révèlent des modifications du métabolisme central de *Bacillus subtilis* ainsi que l'induction de mécanismes de réponses au stress après un stress aux nanoparticules.

1. Induction de la réponse stringente et réorientation du métabolisme de *Bacillus subtilis* après un stress aux nanoparticules ZnO

1.1 Introduction

En raison d'une utilisation croissante des nanoparticules de TiO₂ et de ZnO dans diverses applications telles que les crèmes solaires, les médicaments ou les peintures, elles sont parmi les nanoparticules les plus rejetées dans l'environnement. Les premiers organismes en contact avec ce rejet sont les bactéries du sol, comme *Bacillus subtilis*. La littérature recense déjà des études sur la toxicité de ces nanoparticules sur *Bacillus subtilis* (Azam et al. 2012; Dizaj et al. 2014). Cependant, ces études utilisent des doses élevées de nanoparticules induisant rapidement une mort cellulaire suite à un stress oxydatif. Notre étude a été réalisée avec des doses bien inférieures afin de s'approcher des conditions environnementales et d'identifier les mécanismes de réponses mis en place par *Bacillus subtilis* pour s'adapter à une exposition à de plus faible dose, conforme aux concentrations attendues.

Pour cela une analyse protéomique du protéome intracellulaire de *Bacillus subtilis* a été réalisée après un stress aux nanoparticules. Cette analyse révèle notamment de nombreuses modifications d'expressions protéiques dans le métabolisme central de *Bacillus subtilis* ainsi que dans un des mécanismes de réponses au stress chez *Bacillus subtilis* (la réponse stringente), qui semble faire suite à l'induction d'un stress oxydatif par les nanoparticules.

1.2 Article 3

Article publié dans Journal of Proteomics, Mars 2016

Zinc oxide induces the stringent response and major metabolic reorientations in *Bacillus subtilis*

Sylvie Luche¹, Elise Eymard-Vernain¹, Hélène Diemer^{2,3}, Alain Van Dorsselaer^{2,3}, Thierry Rabilloud⁴, and Cécile Lelong¹.

¹ Pro-MD team, Université Joseph Fourier, CEA Grenoble, iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF, Grenoble ; ² Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, IPHC, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg, France ; ³ CNRS, UMR7178, 67087 Strasbourg, France ; ⁴ Pro-MD team, UMR CNRS 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF, Grenoble.

Running title: *Bacillus subtilis* responses to zinc oxide.

Correspondance :

Dr., Lelong Cécile

E-mail : cecile.lelong@univ-grenoble-alpes.f

Abstract

Microorganisms, such as bacteria, are one of the first targets of nanoparticles in the environment. In this study, we tested the effect of two nanoparticles, ZnO and TiO₂, with the salt ZnSO₄ as the control, on the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* by 2D gel electrophoresis-based proteomics. Despite a significant effect on viability (LD₅₀), TiO₂ NPs had no detectable effect on the proteomic pattern, while ZnO NPs and ZnSO₄ significantly modified *B. subtilis* metabolism. These results allowed us to conclude that the effects of ZnO observed in this work were mainly attributable to Zn dissolution in the culture media. Proteomic analysis highlighted twelve modulated proteins related to central metabolism: MetE and MccB (cysteine metabolism), OdhA, AspB, IolD, AnsB, PdhB and YtsJ (Krebs cycle) and XylA, YqjI, Drm and Tal (pentose phosphate pathway). Biochemical assays, such as free sulfhydryl, CoA-SH and malate dehydrogenase assays corroborated the observed central metabolism reorientation and showed that Zn stress induced oxidative stress, probably as a consequence of thiol chelation stress by Zn ions. The other patterns affected by ZnO and ZnSO₄ were the stringent response and the general stress response. Nine proteins involved in or controlled by the stringent response showed a modified expression profile in the presence of ZnO NPs or ZnSO₄: YwaC, SigH, YtxH, YtzB, TufA, RplJ, RpsB, PdhB and Mbl. An increase in the ppGpp concentration confirmed the involvement of the stringent response during a Zn stress. All these metabolic reorientations in response to Zn stress were probably the result of complex regulatory mechanisms including at least the stringent response via YwaC.

Introduction

In the past decade, nanoparticles (NPs) have been used more and more in research and in industry, which has raised questions about the potential toxicity of such materials. Nanomaterials are used in various fields including drug delivery, electronics, therapeutics, cosmetics, water treatment technology, environmental remediation and paint components. Due to these applications, many varieties of NPs are being industrially produced in massive amounts. These NPs are discharged into the environment during their life cycle or via nanomaterial-containing wastes. This waste or contamination may provide a path of entry into the food chain via microorganisms and/or eventually disturb the ecological balance. NPs are naturally present in the environment, e.g. in volcanic dusts in the atmosphere or as nanometer-scale particles from soil erosion. Ecosystems have evolved with these NPs for million years and organisms are adapted to them. By contrast, manufactured NPs released into the environment are new components that have arrived in significant amounts. Microorganisms, including bacteria present in the natural ecosystem, are among the primary targets that are exposed to NPs.

NPs are highly reactive and catalytic in nature compared to their ions or bulk counterparts (see (Nel et al. 2009) for review). They exhibit toxicity to living organisms mainly because of their small size, large surface-to-volume ratio and highly reactive facets. Because of their distinct properties compared to their corresponding ions or bulk material, NPs can lead to unpredictable effects on biological systems. TiO₂ and ZnO NPs are commonly used in sunscreens and other personal care products, paints, electronic devices and solar cells because of their optical, piezoelectric, magnetic and gas sensing properties, which leads to the release of these NPs into environment *via* industrial and domestic waste. Thus, it is very important to evaluate their environmental impact using one of the first pathways of entry into the ecosystem, bacteria. *Bacillus subtilis*, the Gram-positive bacterium, can be isolated from a wide range of environments, both terrestrial and aquatic, suggesting that this species is ubiquitous and broadly adapted to grow in diverse settings within the biosphere (Ran et al. 2012; Tareq et al. 2013; Earl et al. 2008). This bacterium is known to have a highly versatile metabolism, which can quickly and easily adapt to numerous environmental modifications.

Every modification due to the presence of toxic elements such as NPs will impact its physiology (Hecker et al. 2009; Hahne et al. 2010; Zuber 2009). This property is one of the reasons explaining why this bacterium has been found in many biotopes in which it has genetically evolved to obtain the best possible fitness. One of the natural biotopes of this bacterium is the upper layer of soil where it can modify the growth of some vegetal species by modulating the carbon and nitrogen cycles surrounding the roots. It has been isolated from the rhizosphere of a variety of plants in greater numbers than most other spore-forming bacteria (Cazorla et al. 2007; Fall et al. 2004; Pandey & Palni 1997; Vullo et al. 1991). Considering that *Bacillus subtilis* is found on and around plants and that many animals consume plants, it is no wonder that this bacterium is often found in feces (Barbosa et al. 2005; Tam, Uyen, et al. 2006). The passage of *B. subtilis* through the gastrointestinal tract may not be without effect. However, *B. subtilis* is a ubiquitous organism, not solely a consequence of spore persistence in these environments, but also because of its capacity to grow in diverse environments including soils, plant roots and the gastrointestinal tract of animals. The presence of NPs in the environment in an increased concentration will have significant consequences on *B. subtilis* metabolism, which will also impact the physiology of surrounding organisms in the plant and animal kingdoms.

Most of the analysis performed on the effect of NPs on bacteria have only studied the antibacterial properties of NPs (Adams et al. 2006; Azam et al. 2012; Baek & An 2011). Some studies have also shown effects on membrane disorganization (Fang et al. 2007), the production of reactive oxygen species (ROS) (Kim & An 2012; Lyon et al. 2008; Lyon & Alvarez 2008) or the production of exopolysaccharide (Raliya et al. 2014), as well as altered enzyme expression profiles (Santimano & Kowshik 2013). We are the first to study the metabolic effects of NPs on *B. subtilis* using a proteomic approach. Despite a significant effect on viability, TiO₂ NPs had no detectable effect on the proteomic pattern, while ZnO NPs and ZnSO₄ salt significantly modified central metabolism and the stringent response of *B. subtilis*.

Materials and methods

Bacterial strain and culture media

The *B. subtilis* strain used was the 168 strain (*trpC2*, wild type) (personal gift, Maria Laaberki). The medium was LB: 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl supplemented with 12 g/l agar when necessary. Cells were grown in Erlenmeyer flasks with shaking at 200 rpm at 37°C.

The nanoparticles were from SIGMA: TiO₂ (ref 700347, mixture 80:20 of anatase and rutile, 33-37 wt.% in water, <150 nm volume distribution, DLS (dynamic light scattering)), and ZnO (ref 721077, 50% in water, <100 nm by DLS) were already purchased as water dispersions. Their principal features have been described elsewhere (Triboulet et al. 2014) and (Triboulet et al. 2015) in press.

Nanoparticles stresses

Cells were grown in LB medium (250 ml) in Erlenmeyer flasks. When the OD₆₀₀ reached 0.6, 50 ml of the culture was transferred to a new Erlenmeyer flask, and the cells were incubated without for the control and with 130 µg/ml TiO₂, or 170 µg/ml ZnO or 0.3 mM ZnSO₄ for 1 h under shaking at 37 °C. Then, aliquots (100 µl) of the samples were diluted in H₂O and appropriate dilutions were plated onto LB agar, and incubated overnight at 37 °C. The CFUs were counted and the viability was determined. At the same time, the remaining 50 ml was harvested by centrifugation at 5000 rpm for 15 min at 4 °C. The pellet was washed twice with 50 ml of PBS and then frozen at – 20 °C until used. For the metabolic assays, the sample was separated in 2 or 10 ml aliquots before harvest by centrifugation. The pellet was frozen in liquid N₂. All experiments were performed in triplicate and at least two technical replicates from each dilution were plated to determine the number of CFUs.

DLS measurements

Nanoparticles were diluted in three different solutions just before measurement with the DLS (dynamic light scattering) apparatus (Wyatt technology): H₂O, LB medium or

preconditioned LB medium. The preconditioned LB was prepared as follows: *B. subtilis* strain 168 was grown in LB until an OD₆₀₀ of 0.6. Then, 2 ml of culture was harvested by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. The supernatant was filtered through a 0.2 µm filter. The filtered solution constituted preconditioned LB. Each measurement was performed at least in triplicate.

Sample preparation of the cytosolic crude extract for 2D-gel electrophoresis experiments

The frozen pellets were resuspended and incubated in 225 µl of lysis solution containing 200 µl of TES buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2 M sucrose) + 20 µl of 30 mg/ml lysozyme, and 5 µl of 1/50 benzonase solution for 20 min at 37 °C. The samples were sonicated in a water bath for 5 min. Next, 6 µl of 20% SDS and 80 µl of 1 M DTT were added before incubation at 100 °C for 5 min. The lysis was achieved by sonication in a water bath for 5 min. Finally, 800 µl of rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% carrier ampholytes (Pharmalytes 3–10)) and 100 mM dithiodiethanol (Luche et al. 2004; Rabilloud et al. 1997) was added. Each sample was quantified after separation by SDS-PAGE and staining: known quantities (10, 20 and 30 µg) of total protein extracts and two dilutions of cytosolic crude extract extracts were separated on the same gel. Proteins were stained with colloidal Coomassie blue (Neuhoff et al. 1988) (data not shown).

2D-gel electrophoresis

IEF: Homemade 160 mm long 4-8 or 3-10.5 linear pH gradient (Gianazza et al. 1989) gels were cast according to published procedures (Rabilloud et al. 1994). Four millimeter-wide strips were cut and rehydrated overnight with the sample, diluted in a final volume of 0.6 ml of rehydration solution and 100 mM dithiodiethanol (Luche et al. 2004; Rabilloud et al. 1997).

The strips were then placed on a Multiphor plate and IEF was carried out with the following electrical parameters: 100 V for 1 h, then 300 V for 3 h, then 1000 V for 1 h, then 3400 V up to 60–70 kVh. After IEF, the gels were equilibrated for 20 min in 125 mM Tris, 100 mM HCl, 2.5% SDS, 30% glycerol and 6 M urea. Gels were then transferred on top of SDS gels and

sealed with 1% agarose dissolved in Tris 125 mM, HCl 100 mM, SDS 0.4% and 0.005% (w/v) bromophenol blue.

SDS electrophoresis and protein detection: 10% T gels (160 × 200 × 1.5 mm) were used for protein separation. The Tris taurine buffer system was used at an ionic strength of 0.1 and a pH of 7.9 (Tastet et al. 2003). The final gel composition was 180 mM Tris, 100 mM HCl, 10% (w/v) acrylamide and 0.27% bisacrylamide. The upper electrode buffer was 50 mM Tris, 200 mM taurine and 0.1% SDS. The lower electrode buffer was 50 mM Tris, 200 mM glycine and 0.1% SDS. The gels were run at 25 V for 1 h, then at 12.5 W per gel until the dye front had reached the bottom of the gel. Detection was carried out by fast silver staining (Chevallet et al. 2006).

Image analysis: Image analysis was performed with Delta2D software (v.3.6) (Decodon, Germany). Briefly, three gel images arising from three different cultures and protein preparations were warped for each group onto a master image, one for the culture in LB (control without nanoparticles or salt) and one for each stress condition (TiO₂, ZnO nanoparticles and ZnSO₄ salt). The control master gel image was then warped onto each stress condition master gel image and a union fusion image of all the gel images was then made. Detection was carried out on this fusion image, and the detection results were then propagated to each individual image.

The resulting quantification table was then analyzed using the Student's t-test function in the software, and the spots having both a p-value lesser than 0.05 and an induction/repression ratio of 1.5 or greater were selected for further analysis by mass spectrometry after being manually verified. For the global analysis of the power and reproducibility of the experiments, the Storey and Tibshirani approach was used (Storey & Tibshirani 2003), as described by Karp and Lilley (Karp et al. 2007) (Supplementary Figure S2).

The spots of interest were excised from a silver staining gel by a scalpel blade and transferred to a 96-well microtitration plate. Destaining of the spots was carried out by the ferricyanide–thiosulfate method (Gharahdaghi et al. 1999) on the same day as silver staining to improve sequence coverage in the mass spectrometry analysis (Richert et al. 2004).

Mass spectrometry

Analysis was carried out essentially as described previously (Triboulet et al. 2013), except that only the nanoLC–QTOF–MS system was used for nanoLC–MS/MS analysis and the version of the UniProtKB/SwissProt database was 2012_12 (538,585 sequences) for protein identification. The detailed protocol can be found in the supplementary data (S1).

Crude extract preparation for enzymatic and biochemical (SH, CoA, ppGpp) assays

Cells pellets were obtained from 10 ml aliquots of *B. subtilis* strain 168 cultures grown with or without stress, as described above. Cells were incubated in a 200 µl final volume of 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 15 µl of 30 mg/ml lysozyme and 4 µl of 1/50 benzonase solution for 20 min at 37 °C. This was then centrifuged at 13,000 rpm at 4 °C for 10 min. Total protein quantification was performed using the Bradford assay.

Malic enzymes activity assay

NAD(P)H malic enzyme assays were performed as previously described (Lerondel et al. 2006). Briefly, crude extract supernatants were obtained as described above and stored on ice until malic enzyme assays were performed. Total protein quantification was performed using the Bradford assay.

Malic enzyme activities were measured by spectrophotometrically monitoring at 340 nm, i.e. NAD(P)H formation during the reductive decarboxylation of malate (malate + NAD(P) = pyruvate + NAD(P)H). The reaction mixture was composed of 10 µl of an appropriate dilution of crude extract supernatant in 1 ml of buffer (50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 50 mM KCl and 10 mM thioglycerol). The reaction was started by the addition of 5 mM of NAD⁺ or NADP⁺. The specific activity was calculated using the initial rate data normalized by the total protein quantity.

SH assay

Crude extracts were obtained as described above. Aliquots of the crude extract were used to measure the total protein quantity using the Bradford assay and the total sulfhydryl

groups (total SH). To measure the free sulfhydryl groups, proteins of the crude extracts were precipitated with 10% TCA for 1 h on ice, harvested by centrifugation (13,000 g, 5 min). Free SH was measured in the supernatant. SH concentrations were determined spectrophotometrically as follows: 20 µl of the crude extract or 100 µl of the supernatant were mixed in 1 ml of 30 mM Tris HCl pH 8, 3 mM EDTA, 1.5 mM DTNB and 40% ethanol, then incubated 1 h at room temperature before measuring the optical absorbance at 412 nm.

CoA assay

Coenzyme A concentrations were determined using the Coenzyme A assay kit from Sigma-Aldrich; 40 µl of crude extracts were used for each tested condition. CoA concentrations were normalized by the protein concentrations measured by the Bradford assay.

Catalase activity assay

A 10 ml volume of bacteria grown until 0.6 OD₆₀₀ was stressed with 130 µg/ml TiO₂, 170 µg/ml ZnO, 0.3 mM ZnSO₄ or 5 mM H₂O₂ for 1 h under shaking at 37 °C. Bacteria were then pelleted by centrifugation at 6000 rpm for 10 min. The pellets were washed with 1 ml of PBS and centrifuged (13,000 rpm, 5 min). The pellets were finally resuspended in 8 ml of PBS. The catalase activities were immediately determined on cells using a Clarke-type electrode (Hansatech, Kings Lynn, UK), as described by Rorth and Jensen (Rorth & Jensen 1967). The specific activities were calculated as the number of generated O₂ moles/min/CFU.

Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)

Shimadzu ICP 9000 (with mini plasma torch in axial reading mode) was used to measure the zinc content. Standard solution for AAS (Sigma Aldrich) was used to generate the calibration curve between 10 to 500 µg/L in pure water with 1% of HNO₃ (Fluka). Samples were routinely incubated in HNO₃ 10% ON at RT. Briefly, 500 µl of each cytosolic crude extract was incubated with 90 µl of HNO₃ 65% ON at RT. The sample was centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. Before to be measured pure water was added to the supernatant extemporaneously to obtain a final volume of 7 ml. Ytterbium solution standard for AAS

(Sigma-Aldrich) was used as an internal standard to prevent calibration drift and fluidic perturbation. The result was express in $\mu\text{g/l}$ [Zn] per mg of protein.

ppGpp assay

The ppGpp content was measured as previously described (Zhang et al. 2013), using an on-off fluorescent probe. ppGpp extraction was performed on crude extracts of *B. subtilis* obtained as described above (growth in LB medium as the control and LB medium with a stress agent (130 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 , 170 $\mu\text{g/ml}$ ZnO , 0.3 mM ZnSO_4 or 1% norvaline)). Aliquots of the crude extract were used to measure the total protein quantity using the Bradford assay. The same quantity of each crude extract was precipitated with 10% formic acid for 1 h on ice and cleared by centrifugation. The pH of the supernatant was adjusted to 7.4 by the addition of N-ethylmorpholine (130 μl for a sample of 200 μl).

Fluorescent probe preparation: 3 μM of oligonucleotide DNA (5'-GGC AGG TTG GGG TGA CTA AAA ACC CTT AAT CCC C-3') and 90 μl of freshly prepared 1 mM silver lactate (Fluka BioChemika) were first mixed in 20 mM phosphate buffer (pH 6.6) for 5 min in a final volume of 1 ml, and kept protected from light at room temperature. After 20 min, 90 μl of freshly prepared 1 mM NaBH_4 (Sigma-Aldrich) was quickly injected, thoroughly mixed, and the mixture was kept in the dark without further disturbance at 4 °C overnight.

Fluorescent detection: 20 μl of ppGpp extract was quickly mixed with the fluorescent probe (at a final concentration of 300 nM) in 20 mM phosphate buffer pH 7.4 in a final volume of 200 μl . The mix was incubated 45 min at room temperature and protected from light before the first measurement (F_0). Then, Cu^{2+} was added at a final concentration of 800 nM and the mix was incubated 45 min at room temperature and protected from light before the second measurement (F). Fluorescent spectra were measured with a Tecan Infinite® M1000 instrument at a fluorescent excitation wavelength of 585 nm and fluorescent emission wavelength of 635 nm. The results show the average of a technical duplicate for each biological triplicate and are expressed as follows: $[F/F_0]$ stress condition normalized by $[F/F_0]$ without stress.

Results

NPs sizes in growth medium and cell viability

Nanoparticle suspensions of TiO₂ and ZnO were diluted in H₂O, LB medium or preconditioned LB medium before measurements with a DLS apparatus (Figure 1a,b). DLS measurements revealed that the different media modified the diameter of both nanoparticles. The TiO₂ NP diameter was increased in LB medium, preconditioned or not, compared to their size in H₂O. Nevertheless, the preconditioned medium decreased the diameter of TiO₂ NPs compared to the LB medium. ZnO NP diameter was decreased in both LB and preconditioned LB compared to the H₂O dilution, which may be explained by partial dissolution of the NPs (Li, Zhu, et al. 2011). DLS measurements of TiO₂ and ZnO suspensions in the different media performed over time (up to 1 h) after mixing showed no significant differences with the initial values (data not shown).

Different dilutions of TiO₂ and ZnO NPs (from 10⁻¹ to 10⁻⁴ mg/ml) and ZnSO₄ (from 0.03 to 0.5 mM) were investigated on *B. subtilis* growth (Figure S3). 130 µg/ml TiO₂, 170 µg/ml ZnO and 0.3 mM ZnSO₄ were chosen because at these concentrations there is no major alteration of the growth curves. In these conditions, the viability levels were around 50% after 1 h of treatment (Figure 1c). Such viability allowed for obtaining sufficient number of stressed, but not dead, cells to perform 2DE analysis.

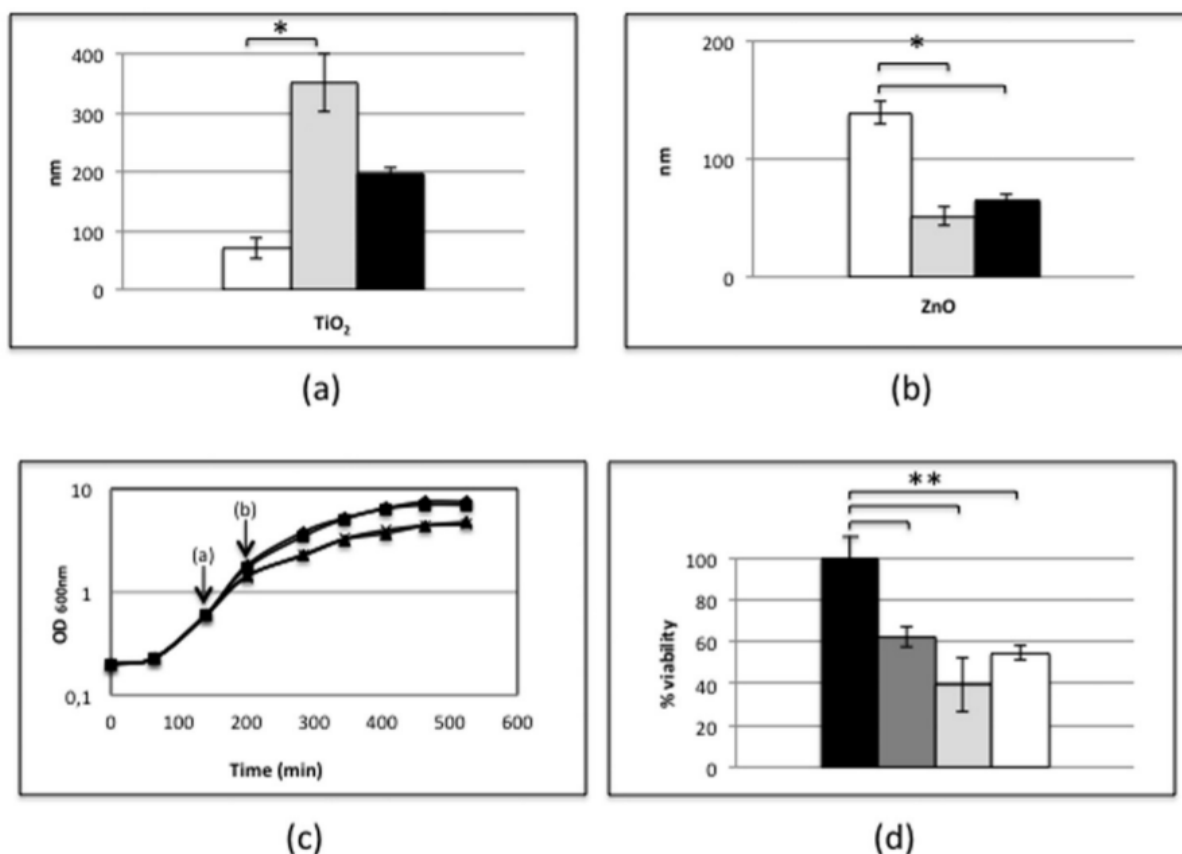


Figure 1: DLS and viability measurements DLS measurements using a Wyatt Dynapro Nanostar instrument of (a) TiO_2 and (b) ZnO nanoparticles in different freshly prepared solutions: white for H_2O , grey for LB medium, black for conditioned LB medium (see Experimental procedures, section 2.3). (c) Viability measurements: all the assays were performed in triplicate with at least two technical replicates. The viability frequencies were normalized by the value obtained with the control. (d) Normalized viability frequency of the control (LB) and the bacteria stressed with TiO_2 , ZnO or ZnSO_4 are respectively represented in black, dark gray, soft gray and white histograms. Error bars $\pm 1\text{SD}$ ($n \geq 3$). Asterisks * and ** indicate significant differences $p < 0.05$ and $p < 0.006$, respectively.

Differential patterns of protein synthesis in the presence of TiO_2 and ZnO NPs and ZnSO_4

In order to investigate the effects of NPs on the protein pattern, 2D protein gels of equal amounts of protein crude extract, from three independent cultures, were carried out. The gels were silver stained and analyzed with Delta 2D software: protein patterns from the crude extracts obtained after growth in LB medium were compared with the protein patterns of crude extracts obtained after growth in the presence of NPs or ZnSO_4 . Despite a mortality of 40% after the addition of 130 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TiO_2 for 1 h, no significant difference was detected between the protein pattern from bacteria grown in LB medium and TiO_2 stressed bacteria (Figure 2a, b). In contrast, Delta 2D software analyses of the protein patterns of cells grown in the presence of ZnO NPs or ZnSO_4 highlighted 23 spots (Figure 2a, c, d), which were differentially expressed by a factor equal to or greater than 1.5 with a p-value lower than 0.05 in a two-tailed t-test. With the exception of YqjI, all highlighted spots showed the same profile in the presence of ZnO NPS and ZnSO_4 (Table 1). The proteins were identified by mass spectrometry. Proteins affected by ZnO NPs or ZnSO_4 stress were assigned to two main classes: proteins related to central metabolism and proteins related to the stringent response.

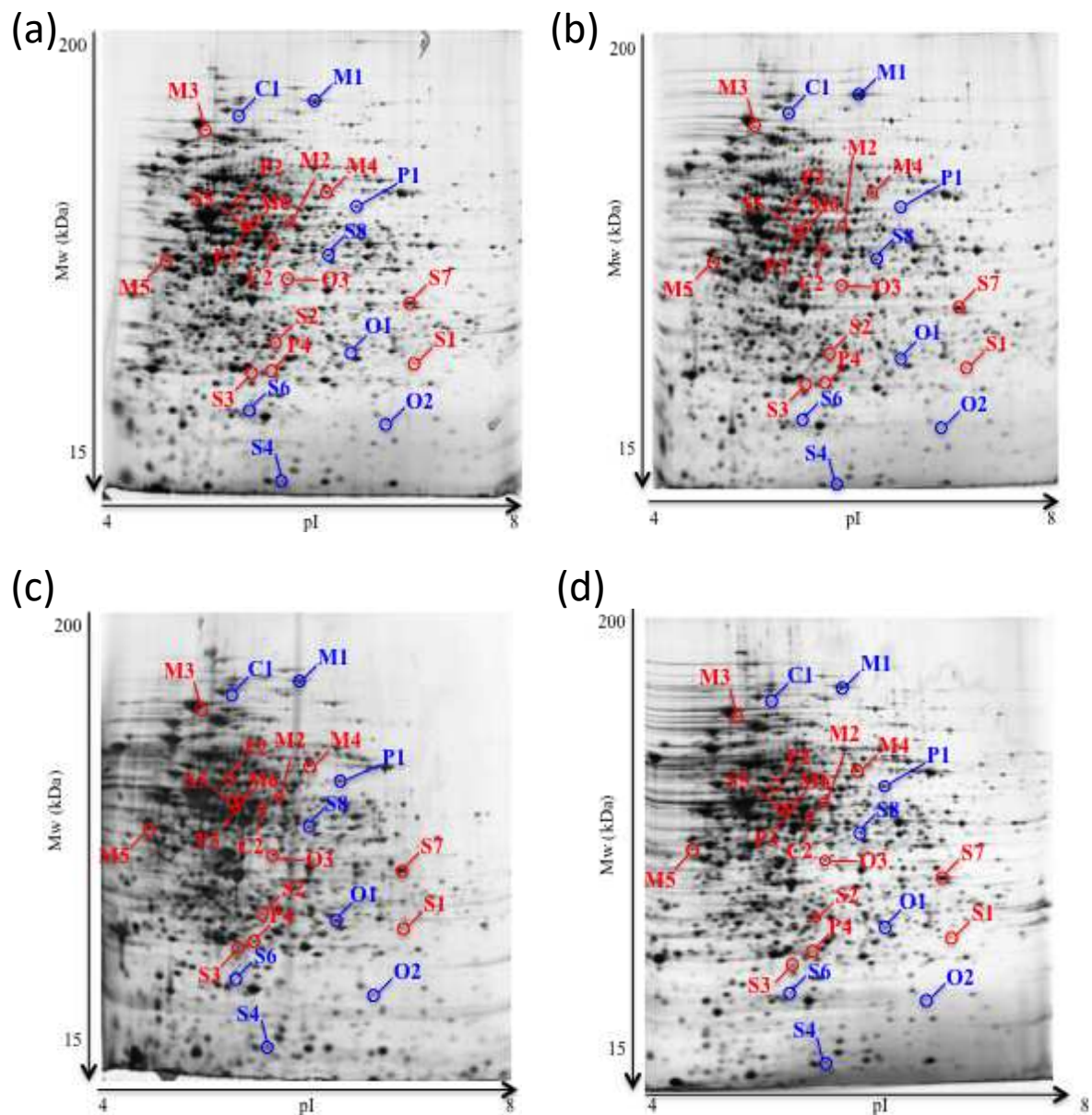


Figure 2: 2DE gels of 168 *Bacillus subtilis* strain after ZnO or ZnSO₄ stresses. 2 DE gels of 168 *Bacillus subtilis* strain after ZnO or ZnSO₄ stresses. Total protein extracts of *B. subtilis* 168 were separated by two-dimensional gel electrophoresis. The first dimensions covered a pH range of 4–8 and the second dimension was in the range of 15–200 kDa. Total cellular proteins (120 µg) were loaded on the first dimension gel, and the spots were detected by silver staining. (a) Gel obtained from the bacteria grown on LB medium, (b) gel obtained from bacteria stressed with 130 µg/ml TiO₂ for 1 h, (c) gel obtained from bacteria stressed with 170 µg/ml ZnO or 0.3 mM ZnSO₄ for 1 h and (d) gel obtained from bacteria stressed with 0.3 mM ZnSO₄ for 1 h. The arrows point to spots that showed reproducible and statistically significant changes between the control conditions (LB) and the stress conditions (ZnO or ZnSO₄).

Protein						Known regulon	Mass spectrometry Data		Delta 2D Data			
N°	Symbol	UniProt accession number	function	PM (Da)	pI		nb peptides	Percent age sequenc e coverag e	ratio mean % Volume ZnO/ mean % Volume LB	t-test mean % Volume ZnO / mean % Volume LB	ratio mean % Volume ZnSO4 / mean % Volume LB	t-test mean % Volume ZnS O4 / mean % Volume LB
Stringent response												
S1	YwaC	P39583	GTP pyrophosphokinase	24600	6.2	SigM, SigW	2	14%	7.2	96.5	5.8	99.7
S2	SigH	P17869	RNA polymerase sigma-H factor	25448	5.1	AbrB	7	47%	0.6	98	0.6	99.8
S3	YtxH	P40780	Uncharacterized protein	16555	5.1	SigB, SigH, stringent response	4	32%	1.7	98.1	1.3	51.6
S4	YtzB	O32065	Uncharacterized protein	11666	8.1	stringent response	3	52%	0.6	97.4	0.7	90.5
S5	TufA	P33166	Elongation factor Tu	43593	4.7	stringent response	10	44%	2.3	97.3	2.4	94.1
S6	RplJ	P42923	50S ribosomal protein L10	18078	5.5	stringent response	2	17%	0.6	98.3	0.6	98.4
S7	RpsB	P21464	30S ribosomal protein S2	27968	6.2	stringent response	10	51%	3.2	93.8	2.5	97.4
S8	Mbl	P39751	MreB-like protein	35861	5.7	stringent response, sigE	12	46%	0.5	95.9	0.5	97.8
Metabolism												
Cysteine metabolism												
C1	MetE	P80877	5- methyltetrahydropteroyltriglu tamate--homocysteine methyltransferase	86808	4.8	S-box	17	31%	0.4	99.8	0.6	87.6
C2	MccB	O05394	Cystathionine gamma-lyase	40886	5.2	CymR , Spx	10	44%	1.5	97.6	2.1	98.0
Central metabolism												
M1	OdhA	P23129	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	106280	5.9	CcpA	31	43%	0.6	92.9	0.5	98.0
M2	AspB	P53001	Aspartate aminotransferase	43089	5.3	constituti ve	8	36%	1.6	99.9	1.6	92.3

						expressio n						
M3	IolD	P42415	3D-(3.5/4)- trihydroxycyclohexane-1.2- dione hydrolase	70381	5.1	CcpA, IolR	17	42%	0.6	99.4	0.6	97.3
M4	AnsB	P26899	Aspartate ammonia-lyase	52505	5.6	AnsR	7	29%	2.0	97	1.3	79.2
M5	PdhB	P21882	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	35474	4.5	stringent response	11	53%	1.8	99.4	1.8	99.7
M6	YtsJ	O34962	Probable NAD-dependent malic enzyme 4	43667	5.1	unknown	16	66%	1.4	94.9	2.0	98.8
pentose pathway												
P1	XylA	P0CI80	Xylose isomerase	50283	5.6	CcpA, XylR	11	36%	0.5	97.6	0.4	98.7
P2	YqjI	P80859	6-phosphogluconate dehydrogenase. decarboxylating 2	51776	5.1	Unknown	20	67%	2.5	99.8	0.9	60.2
P3	Drm	P46353	Phosphopentomutase	44020	4.9	CcpA	14	52%	2.3	97.3	2.4	94.1
P4	Tal	P19669	Transaldolase	22972	5.9	Unknown	3	20%	2.9	98.3	2.5	95.5
Other												
O1	FabL	P71079	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADPH]	27178	5.9	SigG, SpoVT, YfhP	6	35%	0.6	96.3	0.6	98.4
O2	QcrA	P46911	Menaquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	18736	6.1	AbrB, CcpA, ResD	5	43%	0.6	99	0.6	95.8
O3	Nfo	P54476	Probable endonuclease 4	33069	5.4	SigG	6	34%	1.6	99.8	1.2	80.3

Table 1: Differentially-expressed proteins identified in the proteomic screen. Comparison between 168 cytosolic crude extracts from 168 *Bacillus subtilis* strains grown in LB medium with or without stress (ZnO nanoparticles or ZnSO₄ salt stress) ([Fig. 2](#)) (1) Spot number pointed out in [Fig. 2](#), (2) accession number from UniProKB, (3) protein function described by UniProtKB, (4) molecular weight, (5) pI, (6) number of peptides identified by mass spectrometry (7) percentage of coverage, (8) and (10) average quantification of the spot using Delta2D software from three independent 2-DE gels in the control, (9) and (11) standard deviation of the considering spot growth condition and (9) ratio of the average quantification determined by the Delta 2D analysis: stressed/not stressed.

Metabolic reorientations

Pentose pathway and TCA shift: twelve modulated proteins were related to central metabolism: MetE and MccB are related to cysteine metabolism, OdhA, AspB, IolD, AnsB, PdhB and YtsJ to the Krebs cycle and XylA, YqjI, Dm and Tal to the pentose phosphate pathway (PPP) (Figure 3). The two main enzymes involved in the oxidative branch and the non-oxidative branch of the PPP, YqjI and Tal, respectively, were increased after the addition of ZnO NPs or ZnSO₄. The non-oxidative branch converts ribose-5-phosphate back to glucose-6-phosphate, the substrate for the oxidative branch. The Tal enzyme, which catalyzes the reversible transfer of a dihydroxyacetone moiety derived from fructose-6-phosphate to D-erythrose-4-phosphate, forming D-sedoheptulose-7-phosphate and releasing D-glyceraldehyde-3-phosphate, is a rate-limiting enzyme in the non-oxidative branch of the pathway in eukaryotic cells (Reitzer et al. 1980). *Via* the oxidative branch, the pentose phosphate pathway is responsible for the generation of NADPH, which contributes to cellular defenses against oxidative stress. YqjI, which is the principal 6-P-gluconate dehydrogenase (Zamboni et al. 2004), was the only spot showing different profiles with ZnO NPs and ZnSO₄; its intensity increased in the presence of ZnO and was not significantly modified by ZnSO₄. The second main metabolic effect of ZnO NPs and ZnSO₄ was a reorientation of the Krebs cycle; the enzymes YtsJ, AspB and AsnB were significantly increased while OdhB was decreased. The activity of YtsJ, a malate dehydrogenase, described to function with both cofactors NAD or NADP (Lerondel et al. 2006; Meyer & Stülke 2013), measured in the different crude extracts, was increased in all stressed conditions (Figure 4a,b). These modifications in expression lead to a partial shunt of the Krebs cycle in the part from α -ketoglutarate to malate, in a way to increase the production of NAD(P)H and to release free CoA-SH in response to stress induced by ZnO NPs or ZnSO₄ (Figure 3 and Figure 4a,b).

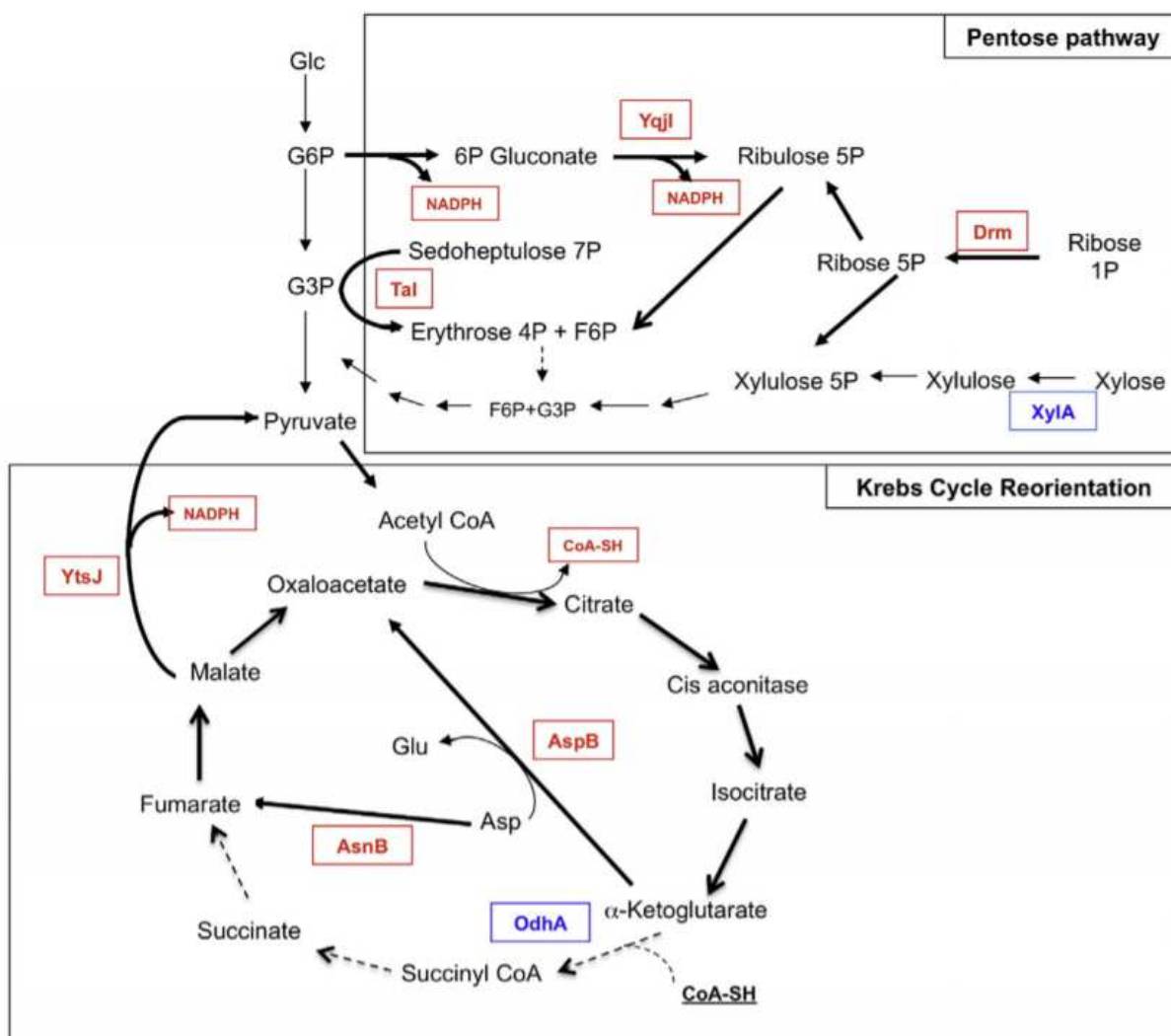


Figure 3: Metabolism reorientation. Enzymes highlighted in red and blue are proteins with an increase and decreased expression in presence of Zn stresses (see Table 1).

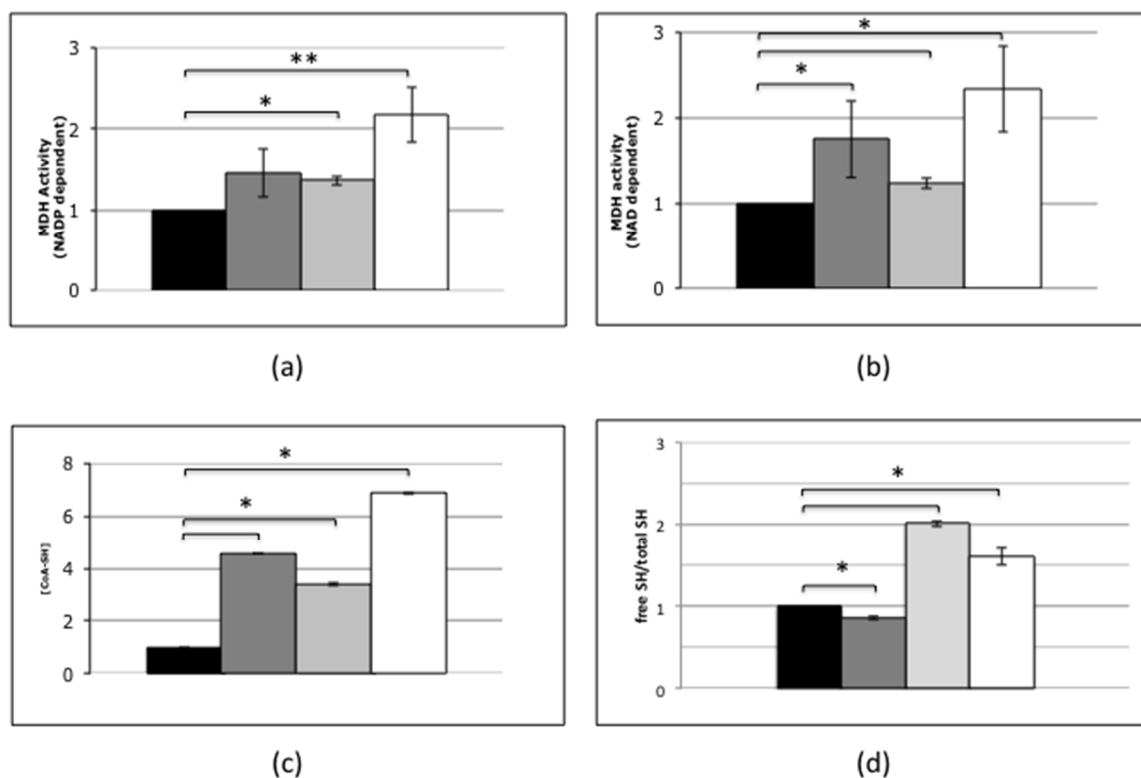


Figure 4. Malic enzyme activities (a) with NADP and (b) NAD as the cofactor. Histograms in (c) and (d) show the CoA assays and (free SH / (total SH – free SH)), respectively. All the assays were performed in triplicate with at least two technical replicates. The results were normalized by the value obtained with the control. Assays with the control bacteria (LB) and the bacteria stressed with TiO_2 , ZnO or ZnSO_4 are respectively represented in black, dark gray, soft gray and white histograms. Error bars $\pm 1\text{SD}$ ($n \geq 3$). Asterisks * and ** indicate significant differences $p < 0.05$ and $p < 0.006$, respectively.

Thiol metabolism: MetE and YrhB enzymes are involved in cysteine metabolism in opposite ways: MetE catabolizes the synthesis of methionine and YrhB catabolizes the synthesis of cysteine (Figure 5). Their expressions were also modified in opposite ways in the presence of ZnO NPs or ZnSO₄ salt: YrhB was increased and MetE was decreased (Figure 5, Table 1). The modifications in MetE and YrhB expression and the reorientation of central metabolism let us infer an increase in cysteine and CoA-SH concentrations in the cell under stress conditions (ZnO NPs and ZnSO₄ salt). The CoA-SH concentration on one hand and the ratio of free sulfhydryl groups/protein-bound sulfhydryl groups on the other were therefore measured in the presence or absence of NPs or Zn salt stress (Figure 4c, d). The proportion of free sulfhydryl was significantly increased in the presence of ZnO NPs and ZnSO₄, whereas the CoA-SH concentration was increased in all stress conditions, ZnO and TiO₂ NPs and ZnSO₄. *B. subtilis* possesses three main low molecular weight (LMW) thiols, CoA-SH, cysteine and bacillithiol. Ma and colleagues (Ma, Chandrangu, et al. 2014) showed that bacillithiol is the major buffer of labile zinc in *B. subtilis*, so most of the increase in free thiol in the presence of ZnO NPs and ZnSO₄ was probably the result of an increase in bacillithiol. The increasing of free intra cellular thiols following a stress with ZnO or Zn salt, was probably the consequence of an increasing of intracellular [Zn], in a concentration exceeding the physiological concentration. The intra cellular [Zn] was measured in all conditions. Figure 6b shows that in the presence of Zn, nanoparticles or salt, the intracellular [Zn] was increased by four to six-fold, respectively.

The LMW thiols, in particular bacillithiol, are often described to play roles in the protection of cells against a variety of stresses, including oxidative stress (Posada et al. 2014; Chi et al. 2011; Gaballa et al. 2010; Helmann 2011; Lee et al. 2007). To test the hypothesis of oxidative stress induction by ZnO NPs or ZnSO₄, catalase activity was measured in all conditions. Figure 6a shows that catalase activity was unchanged in the presence of TiO₂ NP, but increased by two-fold in the presence of ZnO, by four-fold in the presence ZnSO₄ and by three-fold in the presence of H₂O₂ compared to the levels in control bacteria grown in LB medium. Taken together, the protective role of LMW thiols, the probable increase in NAD(P)H and the increased activity of catalase suggest that ZnO NPs and ZnSO₄ induce oxidative stress and/or thiol chelation stress in *B. subtilis*.

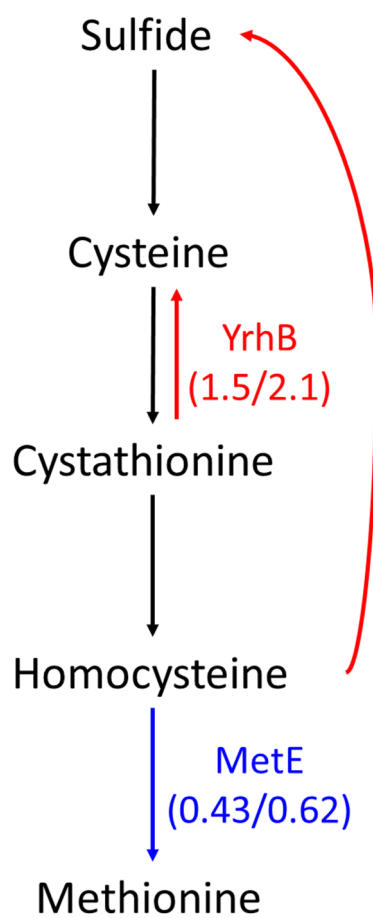


Figure 5: Cysteine-methionine metabolism.

Values associated with YrhB and MetE refer to their expression modulations after a ZnO or ZnSO₄ stress compared to the (LB) control (Table 1).

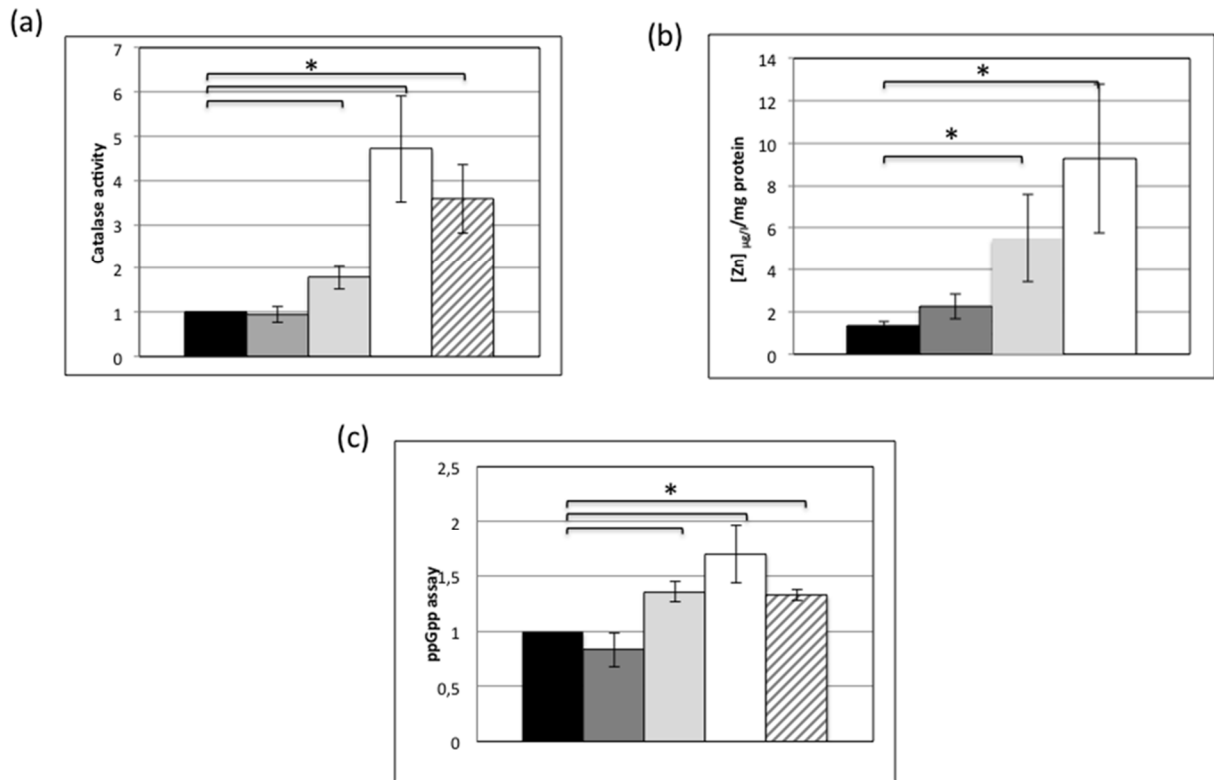


Figure 6: Histograms in (a), (b) and (c) show catalase activity, intracellular Zn concentration/mg protein and ppGpp assays, respectively

All the assays were performed in triplicate and at least two technical replicates. The results were normalized by the value obtained with the control (cells grown in LB medium at the same time as the stressed cells). Assays with the control bacteria (LB medium) and the bacteria stressed with TiO_2 , ZnO , ZnSO_4 and (a) 5 mM H_2O_2 or (c) 1% norvaline are respectively represented in black, dark gray, light gray, white and dashed gray histograms. Error bars $\pm 1\text{SD}$ ($n \geq 3$). Asterisk indicates significant differences $p < 0.05$.

Stringent response and sporulation

The other main pattern affected by ZnO and ZnSO₄ was the stringent response. Nine proteins involved or controlled by the stringent response had their expression profile modified in the presence of ZnO NPs or ZnSO₄: YwaC, SigH, YtxH, YtzB, TufA, RplJ, RpsB and Mbl (Figure 2, Table 1). SigH is a sigma factor that controls the transcription of many genes involved in the transition from exponential growth to the stationary phase, including the initiation of spore formation and entry into the genetic competence state. Tam Le and collaborators (Tam, Antelmann, et al. 2006), Eymann and colleagues (Eymann et al. 2001) have shown that sigmaH activity and the stringent response are linked.

YwaC is a GTP pyrophosphokinase that catalyzes the synthesis of ppGpp, the alarmone produced during the stringent response in response to number of nutritional or environmental stresses (Nanamiya et al. 2008; Natori et al. 2009; Tagami et al. 2012; Kriel et al. 2014). *B. subtilis* possesses three ppGpp synthases: RelA, YjbM and YwaC. RelA is a bifunctional enzyme that synthesizes and hydrolyses ppGpp, while YjbM and YwaC are only ppGpp synthases. In the presence of ZnO NPs or ZnSO₄, the expression of YwaC was increased by seven-fold. At the same time, the expression of several proteins known to be negatively or positively regulated by the stringent response was modified: YtxH, TufA, RpsB were increased and YtzB, RplJ and Mbl were decreased. YjbM, which presents a similar pI and MW as YwaC, was not detected among the spots as having undergone a modification in expression. As YwaC is a ppGpp synthetase, the ppGpp concentration was measured in the different crude extracts. In the presence of ZnO NPs, ZnSO₄ and norvaline, the proportion of ppGpp was significantly increased (by 1.8, 2.1 and 1.8-fold, respectively) while it was unchanged in the presence of TiO₂ (Figure 6b) compared to the cells grown in LB medium without any stress.

Discussion

The proteomic analysis of *B. subtilis* in the presence of nanoparticles or of the corresponding metallic ions showed that, despite 40% mortality, TiO₂ NPs led to no significant modification in the protein pattern, while ZnO NPs and ZnSO₄ led to important modifications in cell physiology. TiO₂ had no detectable effect on the *B. subtilis* proteome, but although the free SH ratio was unchanged, Figure 4c and d show a significant increase in CoA-SH and sporulation after TiO₂ incubation, respectively. These observations led us to suppose that TiO₂ nanoparticles induce a stress which is not an oxidative stress leading to an increased expression of catalase, but to which cells probably respond via the activation of sporulation and of some parts of the oxidative stress pathway response, through not in a way detectable via 2D gels analysis.

Oppositely ZnO nanoparticles and ZnSO₄ salt induce marked responses in bacteria: the opposite response to that caused by TiO₂ considering obvious stress with metabolic reorientation and activation of the stringent response. The presence of Zn in the form of NPs or salt induced reorientation of central metabolism in a way to protect the cell by the production of NAD(P)H and free thiols. The diversion of methionine sulfur to cysteine is hypothesized to increase the concentration of low-molecular weight biothiols, in particular bacillithiol, which serves to maintain the reduced environment of the cytoplasm and/or to generate mixed disulfides in order to protect protein thiols from irreversible oxidation (Hochgräfe et al. 2007). Moreover, cysteine is a substrate for the synthesis of CoA and very likely a substrate for the production of bacillithiol (Gaballa et al. 2010). ICP assays have shown that [Zn] intracellular was significantly increased after a stress with the ZnO nanoparticles or Zn salt. The effects observed with Zn led us to suppose that ZnO nanoparticles are dissolved, the Zn salt enter into the cell and thus disturb cell homeostasis. Zn is redox-inert but has a high affinity for the side chains of Cys, Asp, Glu and His. Naturally, Zn binds proteins at structural sites or at the catalytic site of enzymes. When metal ions exceed their physiological concentration, they bind to enzymes, leading most of the time to their inhibition (Maret & Li 2009; Maret 2013). In most of the studied enzymes, Zn bound to cysteine thiols, are involved in the structural or catalytic site. This binding to cysteine has two

consequences on cell metabolism: first, it modifies the balance between free cysteines and disulfide bridges involved in combating oxidative stress (Maret & Li 2009; Wouters et al. 2011) and second, it impedes central metabolism by the inactivation of several enzymes belonging to the TCA, glycolysis, the pentose phosphate pathway or respiration. In hepatocytes, aconitase, alpha-ketoglutarate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase- (NAD⁺ dependent), succinate dehydrogenase and cytochrome C oxidase are severely inhibited by Zn (Lemire et al. 2008). In *Saccharomyces cerevisiae*, Zn accumulation affects the correct [Fe-S] cluster assembly of aconitase, leading to inactivation of the enzyme (Guirola et al. 2014). In *Escherichia coli*, Zn ions strongly inhibit succinate dehydrogenase (Kasahara & Anraku 1974) and modulate the activity of several enzymes of central metabolism, e.g. enolase, cysteine synthase, serine hydroxymethyltransferase, phosphoglyceromutase, malate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Sigdel et al. 2006). In some reports, the role of Zn ions has been correlated with modifications in detoxification activity by glutathione or modulation of thiol-related enzymes such as thioredoxin reductase. In *B. subtilis*, Ma and collaborators (Ma, Chandrangsu, et al. 2014) and Eide (Eide 2014) showed that an excess of Zn is mainly buffered by low molecular weight bacillithiol. In our work, we observed an increasing production of free thiols and a reorientation of the Krebs cycle. In this latter pathway, the following enzymes: α -ketoglutarate dehydrogenase, succinyl-CoA synthetase and succinate dehydrogenase were shunted in the presence of Zn NPs or ions. Zn ions are already known to inhibit two of these, α -ketoglutarate dehydrogenase and succinate dehydrogenase, in eukaryotes and prokaryotes. To circumvent this problem, bacteria used the amino acids present in the LB medium to shunt the inhibited steps. AspB is used to convert aspartate and α -ketoglutarate into glutamate and oxaloacetate. AnsB is used to produce fumarate directly from aspartate. Moreover, as Zn also inhibits pyruvate production from glycolysis, YtsJ produces the necessary pyruvate from malate originating from the AsnB–FumC pathway. This shunt leads to an increasing concentration of NADH and free CoA-SH. Both NAD(P)H and free thiols (CoA-SH, Cys and bacillithiol) are known to be produced in response to oxidative stress. Even though no specific protein of oxidative stress, such as PerR or OhrR, was detected by the proteomic approach, metabolism reorientation (Krebs cycle and Cys production) seems to be the result of oxidative stress, which is the consequence of the modification of the free

thiol homeostasis in response to the presence of an excess of ZnO and ZnSO₄. However, as CoASH and NADP(H) are also involved in fatty acid metabolism and as FabL was found to be regulated in the proteome, we cannot rule out an effect on fatty acid metabolism.

The second main pattern affected by the presence of ZnO and ZnSO₄ was the induction of the stringent response via the ppGpp synthase YwaC. The production of the ppGpp “alarmone” may be the result of the activity of RelA, and/or YwaC and/or YjbM (Nanamiya et al. 2008; Natori et al. 2009; Tagami et al. 2012; Kriel et al. 2014). ppGpp is synthesized by the cell following nutrient starvation to switch off all reactions appropriate for growing cells such as ribosome synthesis, but it is also involved in the induction of RpoS, which controls the general stress and starvation response in Gram-negative bacteria (Spira et al. 2008). In most Gram-positive bacteria, three genes coding for ppGpp synthase have been found. The most studied is the *relA* gene coding for the bifunctional protein RelA, a ppGpp synthase and hydrolase enzyme. The role and condition of expression of YjbM and YwaC are less known. YwaC has been shown to induce the transcription of *yvyD* via the sporulation-specific factor SigH. Proteomic analysis of the stringent response using a *relA* mutant and DL-norvaline to induce the stringent response (Eymann et al. 2002) has shown that RplJ, TufA, RpsB and Mbl are negatively regulated by the stringent response while YtzB and YtxH are positively regulated by the stringent response. All of these regulations are at least partially under the control of RelA (Eymann et al. 2002). Under our conditions, the expression of YtzB, TufA and RpsB was modified in the opposite way compared to the data obtained by Eymann and colleagues (Eymann et al. 2002). YtxGHI is also under the control of σ^H . However, ppGpp is the main player of the stringent response. Gram-positive bacteria have at their disposal three ppGpp synthases, which are probably differentially expressed in response to various stimuli. YwaC has already been shown to be activated under salt, heat and EtOH stresses, independently of the stress response regulator SigB (Petersohn et al. 2001). [70]. The induced expression of YwaC in a triple $\Delta relA \Delta ywaC \Delta yjbM$ mutant caused growth arrest in LB medium (Tagami et al. 2012), probably due to a decrease in intracellular GTP, while the expression of YjbM in the same mutant background had no effect. Moreover, the expression of YwaC in the triple mutant drastically modified the transcriptome profile of the cell. All these observations led us to suppose that YwaC has a particular and fundamental role when *B. subtilis* has to combat an environmental stress. The cell activates the stringent

response to survive not only to amino starvation but also to chemical or physical stresses. Interestingly, it is more and more apparent that the stringent response is involved in the regulation of stress as well as in virulence or pathogenic processes (Bowden et al. 2013; Nowicki et al. 2014; Oh et al. 2014; Tabone et al. 2014).

Gram-positive bacteria can activate different pathways to respond to stress: the general stress pathway, the stringent response or the activation of sporulation (for sporulating bacteria). In the case of ZnO nanoparticles and ZnSO₄, the expression of SigH was decreased. Spo0H is the first sigma factor in a gene expression cascade involving a total of five factors, including spo0A, which leads to the formation of heat-resistant spores in *B. subtilis* (Eymann et al. 2001). Spo0A is repressed by the stringent response via RelA (Eymann et al. 2002). Contradictorily, Ochi and colleagues (Ochi et al. 1982) have shown that sporulation is induced by the stringent response, probably as an indirect effect due to the decrease in GTP. Mirouze and colleagues (Mirouze et al. 2011) have shown that the triple ppGpp mutant exhibits a delay in sporulation. Clearly, ppGpp plays a central role in the induction of sporulation, which may depend on the growth conditions. But more than its presence (or absence), its concentration and in parallel GTP availability fine-tune sporulation and the cell response to stress. CodY and stringent response are intimately linked in different Gram-positive bacteria (Geiger & Wolz 2014; Geiger et al. 2012; Kriel et al. 2014; Lemos et al. 2008). In *Staphylococcus aureus*, Schoenfelder and colleagues (Schoenfelder et al. 2013) have shown that CodY and the stringent response regulate methionine biosynthesis. Considering the complex roles of CodY, the stringent response, and SigH in the response to stress demonstrated by proteomic analysis, we could speculate that the metabolic reorientations observed in response to Zn stress are the result of a complex regulation mechanism including at least the stringent response via YwaC, the SigH regulator and perhaps CodY.

Here, we have demonstrated that the presence of ZnO nanoparticles induces a stress that bacteria fight via large modifications of the metabolism. Similar observations have already been described by Hsueh and collaborators (Hsueh, Ke, et al. 2015), who have demonstrated that ZnO nanoparticles affect the viability of *B. subtilis* through the inhibition of cell growth, cytosolic protein expression and biofilm formation. Our study is a first step to understand, at a physiological level, the long-term adaptation of a Gram-positive bacteria in response to

nanoparticles. *B. subtilis* is an ubiquitous bacteria which can grow in very different environments such as the upper layer of soil, marine sediment or mammalian gut. In all these places, *B. subtilis* can adapt very rapidly its metabolism to survive to strong modifications of its environment (Zuber 2009) and it also interacts with, and contributes, to the growth of numerous biological organisms via the secretion of biopolymers e.g. lipoprotein, protease or DNA in the rhizosphere (Marvasi et al. 2010). Nanoparticles are more and more used in industrial process and in everyday consumer products (solar screen, paint or medicine) (Notter et al. 2014; Gottschalk et al. 2013). This uncontrolled consumption induces an increasing amount of nanoparticles released in the environment. Nanoparticles contaminating the soil have direct cytotoxic, phytotoxic and genotoxic effects on plant physiology (Antisari et al. 2015; Thiruvengadam et al. 2015; Larue, Castillo-Michel, Sobanska, Cécillon, et al. 2014; Larue, Castillo-Michel, Sobanska, Trcera, et al. 2014). Modification of the bacteria metabolism also impacts indirectly the plant physiology via the plant-bacteria interaction. Moreover, the physico-chemical characteristics of the medium, as the soil for the plant, influence the effect of nanoparticles on its biological surrounding (Bandyopadhyay et al. 2015). For example, nanoparticles have a non-negligible effect on the symbiotic process necessary for an optimal growth of plants by modifying, for example, the exchange of metal at the root level (Dimkpa 2014; Dimkpa 2014) or nitrogen fixation, or the root structure (Fan et al. 2014). Understanding the effect of nanoparticles on bacteria physiology leaving in symbiosis with plants will allow thinking ahead potential consequences of such contamination on the evolution of the ecosystem (Maurer-Jones et al. 2013) and will give forceful arguments for a better management of nanoparticle wastes.

Acknowledgments

The financial support of the CEA toxicology program (Nanobiomet and Nanostress grants) is gratefully acknowledged. The support of the Labex SERENADE (11-LABX-0064) is also acknowledged. Finally, Dr. Caroline Barette is acknowledged for her assistance in performing the fluorometric ppGpp assays.

Supplementary data

Materials and Methods

Supplementary Data 1: Mass spectrometry detailed protocol

In gel digestion

In gel digestion was performed with an automated protein digestion system, MassPrep Station (Waters, Milford, USA). The gel plugs were washed twice with 50µL of 25mM ammonium hydrogen carbonate (NH_4HCO_3) and 50 µL of acetonitrile. The cysteine residues were reduced by 50µL of 10mM dithiothreitol at 57°C and alkylated by 50µL of 55mM iodoacetamide. After dehydration with acetonitrile, the proteins were cleaved in gel with 10µL of 12.5ng/µL of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25mM NH_4HCO_3 . The digestion was performed overnight at room temperature. The generated peptides were extracted with 30µL of 60% acetonitrile in 0.1% formic acid. Acetonitrile was evaporated under vacuum before nanoLC-MS/MS analysis.

NanoLC-MS/MS analysis

NanoLC-MS/MS analysis was performed using on nanoLC-QTOF-MS system, composed of the nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (Waters Corporation, Milford, USA) coupled to the SynaptTM High Definition Mass SpectrometerTM (Waters Corporation, Milford, USA). The system was fully controlled by MassLynx 4.1 SCN639 (Waters Corporation, Milford, USA).

The nanoLC system was composed of ACQUITY UPLC[®] BEH130 C18 column (250 mm x 75µm with a 1.7µm particle size, Waters Corporation, Milford, USA) and a Symmetry C18 precolumn (20 mm x 180 µm with a 5 µm particle size, Waters Corporation, Milford, USA). The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). 4 µL of sample were loaded into the enrichment column during 3 min at 5µL/min with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution of the peptides was performed at a flow rate of 300nL/min with a 8-35% linear gradient of solvent B in 9 minutes.

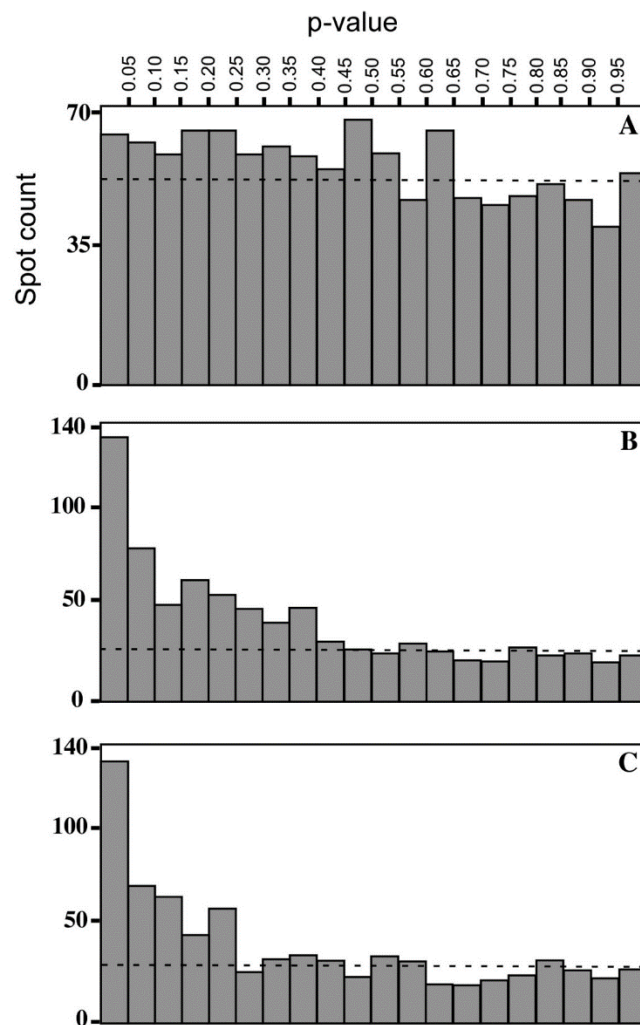
The tandem mass spectrometer was equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. The capillary voltage was set at 2.8 kV and the cone voltage at 35 V. Mass calibration of the TOF was achieved using fragment ions from Glu-fibrino-peptide B on the [50;2000] m/z range. Online correction of this calibration was performed with Glu-fibrino-peptide B as the lock-mass. The ion $(M+2H)^{2+}$ at m/z 785.8426 was used to calibrate MS data and the fragment ion $(M+H)^+$ at m/z 684.3469 was used to calibrate MS/MS data during the analysis. The system was operated in Data-Dependent-Acquisition (DDA) mode with automatic switching between MS (0.5 s/scan on m/z range [150;1700]) and MS/MS modes (0.5 s/scan on m/z range [50;2000]). The two most abundant peptides (intensity threshold 20 counts/s), preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation using collision energy profile. Fragmentation was performed using argon as the collision gas.

Mass data collected during analysis were processed and converted into .pkl files using ProteinLynx Global Server 2.3 (Waters Corporation, Milford, USA). Normal background subtraction type was used for both MS and MS/MS with 5% threshold and polynomial correction of order 5. Smoothing was performed on MS/MS spectra (Savitsky-Golay, 2 iterations, window of 3 channels). Deisotoping was applied for both MS (medium deisotoping) and MS/MS (fast deisotoping).

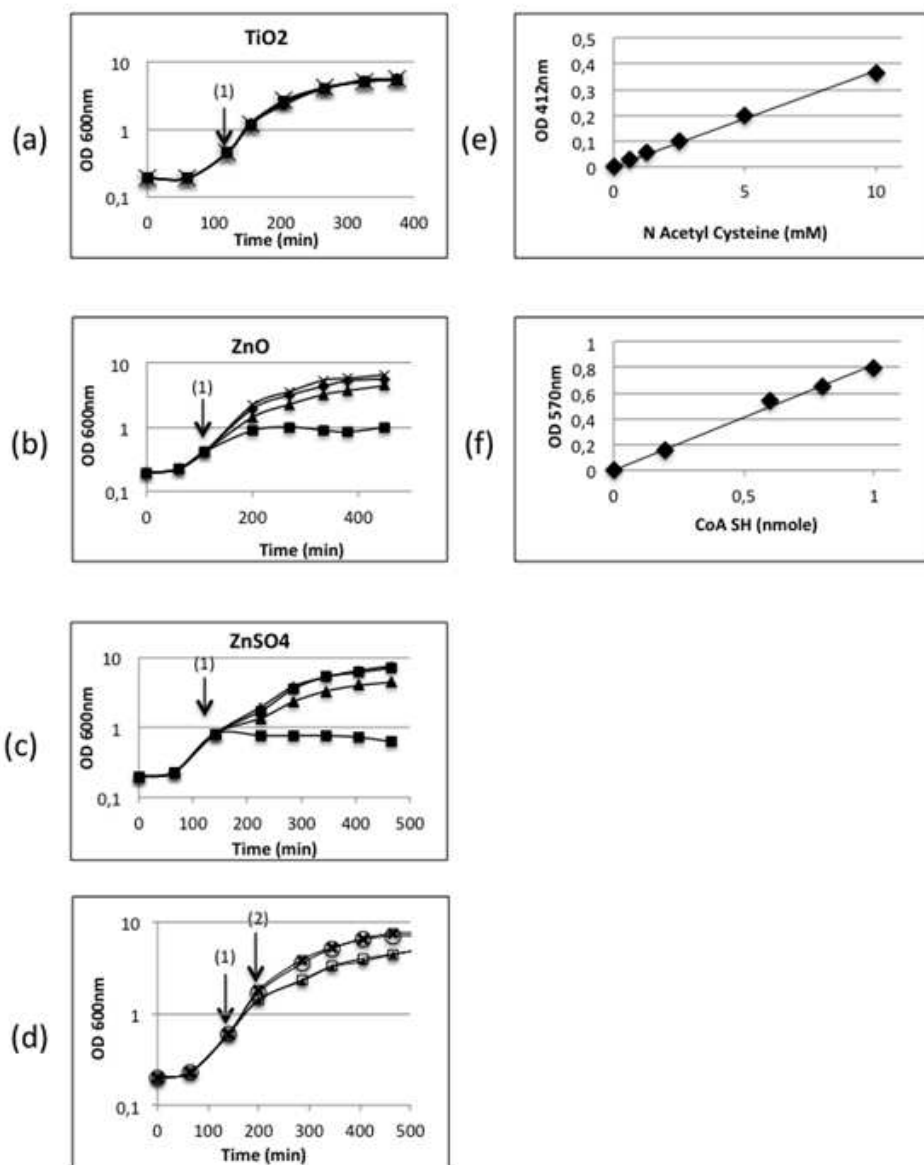
Protein identification

For protein identification, the MS/MS data were interpreted using a local Mascot server with MASCOT 2.4.0 algorithm (Matrix Science, London, UK) against UniProtKB/SwissProt (version 2012_12, 538,585 sequences). The research was carried out in all species. A maximum of one trypsin missed cleavage was allowed. Spectra were searched with a mass tolerance of 15 ppm for precursor ions and 0.02 Da for fragment ions. Carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were specified as variable modifications. Protein identifications were validated with at least two peptides with Mascot ion score above 20.

Results



Supplementary Figure S2. Statistical analysis of the proteomic results. This figure shows the distribution of the t-test for all spots in the image analysis of the 2D gels (at last three independent biological replicates per condition). This allows us to estimate the proportion of false positive, i.e. spots detected only through random processes, in the selected spots, i.e. those with t-test lower than 0.05. The dotted line indicates the false positive threshold. A: TiO₂ nanoparticles compared with control, B: ZnO nanoparticles compared with control and C: ZnSO₄ salt compared with control. This figure indicates that TiO₂ nanoparticles do not induce significant changes, while ZnO nanoparticles and ZnSO₄ salt induced more significant changes.



Supplementary Fig. S3. (a), (b) and (c) growth curves of *Bacillus subtilis* 168 measured at OD 600 nm with a range of nanoparticles or salt concentration (TiO₂, ZnO and ZnSO₄, respectively): cross, control without stress agent, [TiO₂] = (square) 2.10⁻², (triangle) 2.10⁻³ and (circle) 2.10⁻⁴ mg/ml, [ZnO] = (square) 2.5.10⁻¹, (triangle) 2.5.10⁻² and (circle) 2.5.10⁻³ mg/ml and [ZnSO₄] = (square) 0.05, (triangle) 0.5 and (circle) 5 mM. (d) Growth curves of *Bacillus subtilis* 168 measured at OD 600 nm, (cross) LB, (circle) 130 µg/ml TiO₂, (triangle) 170 µg/ml ZnO and (square) 0.3 mM ZnSO₄. The arrows show the times of (1) the addition of stress and (2) of the recovery of the bacteria for the proteomic analysis. (e) and (f) standard curves of the SH assay and CoA-SH assays, respectively.

1.3 Conclusion

Lors cette étude, nous avons exposé la souche 168 de *Bacillus subtilis* aux nanoparticules durant sa phase exponentielle de croissance, la souche 168 est une souche qui a subi de nombreuses mutations l'éloignant de la souche environnementale. Ces choix expérimentaux (souche et phase de croissance) plus éloignés des conditions environnementales, ont été sélectionnés en première intention afin de réaliser une analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle de protéine, une technique reproductible, et bien maîtrisée dans notre laboratoire mais impossible avec la souche 3610 qui secrète de nombreuses protéases. Elle nous a permis de mettre en évidence une réorientation du métabolisme central de *Bacillus subtilis*, suite à un stress oxydatif induit par les ZnO-NPs et le ZnSO₄.

En effet, les modifications d'expressions protéiques montrent l'induction d'une réorientation du métabolisme des soufres ainsi qu'une réorientation du métabolisme central du carbone, au profit de la production respectivement de thiol libre et de NADPH. Tous deux sont connus pour être des mécanismes de défense contre un stress oxydatif et/ou un stress thiol. Cette hypothèse a été confirmée par l'observation d'une augmentation de l'activité d'une enzyme connue pour être impliquée lors de la réponse aux stress oxydatif, la catalase. Nos résultats montrent également une augmentation de la réponse stringente, une réponse connue pour réguler l'expression de nombreux gènes afin de permettre à *Bacillus subtilis* de résister à des environnements hostiles. Nous n'avons pas vu l'induction de tous ces mécanismes après un stress aux TiO₂-NPs même si un stress oxydatif semble également être induit, au vu de l'activité catalase augmentée qui a été observée

2. Effet des nanoparticules sur la compétence chez *Bacillus subtilis* : Impact des nanoparticules sur le transfert horizontal des gènes

2.1 Introduction

Cette dernière étude utilise une toute autre approche concernant l'application du stress aux nanoparticules. En effet, les nombreuses études réalisées jusqu'à présent appliquent un stress aux nanoparticules sur une culture en milieu liquide ; dans notre étude ce stress sera appliqué lors d'une croissance de *Bacillus subtilis* sur un milieu solide permettant le « swarming ». De plus la souche sélectionnée dans cette étude est 3610, une souche plus proche de la souche environnementale qui permet le développement d'un biofilm, état où *Bacillus subtilis* est le plus souvent dans l'environnement. De la même façon que dans notre précédente étude (article 3) une approche protéomique a été choisie. La séparation par électrophorèse bidimensionnelle de protéines étant impossible sur la souche sélectionnée nous avons réalisé une approche par spectrométrie de masse. Cette étude nous a permis, entre autres, de révéler des modifications d'expressions protéiques d'un mécanisme de transport de peptides impliqué dans différents processus cellulaires telles que la sporulation et la compétence.

2.2 Article 4

Article soumis dans Scientific Reports (Juillet 2017).

Nanoparticles affect the competence of the bacterium 3610 *Bacillus subtilis*: Role of nanoparticles in the horizontal transfer of genes

Elise Eymard-Vernain^{1,2}, Sylvie Luche¹, Thierry Rabilloud¹ and Cécile Lelong¹.

¹ Université Grenoble Alpes, CNRS, CEA, BIG, CBM, 17 rue des Martyrs, Grenoble cedex 9, FR 38054, +33438783212, ² ISTerre (Institut des Sciences de la Terre), Université Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble, France.

Correspondance :

Dr., Lelong Cécile

E-mail : cecile.lelong@univ-grenoble-alpes.f

Abstract

Due to the physicochemical properties of nanoparticles, the use of nanomaterials increases every year in industrial and medical processes. At the same time, the increasing number of bacteria becoming resistant to many antibiotics, mostly by a horizontal gene transfer process, is a major public health concern. We herein report, for the first time, the role of nanoparticles in the physiological induction of horizontal gene transfer in bacteria. Besides the most well-known impacts of nanoparticles on bacteria, i.e. death or oxidative stress, two nanoparticles, n-ZnO and n-TiO₂, significantly and oppositely impact the transformation efficiency of *Bacillus subtilis* in biofilm growth conditions, by modification of the physiological processes involved in the induction of competence, the first step of transformation. This effect is the consequence of a physiological adaptation rather than a physical cell injury: two oligopeptide ABC transporters, OppABCDF and AppDFABC, are differentially expressed in response to nanoparticles. Interestingly, a third tested nanoparticle, n-Ag, has no significant effect on competence in our experimental conditions. Overall, these results show that nanoparticles, by altering bacterial physiology and especially competence, may have profound influences in unsuspected areas, such as the dissemination of antibiotic resistance in bacteria.

Introduction

Due to the specific physicochemical properties of nanoparticles, e.g. high specific area, the use of nanomaterials increases every year in industrial and technological processes or in medical applications. Despite their exceptional qualities, their deleterious impact on the environment and health also gives rise to an increasing number of publications (Fröhlich & Fröhlich 2016; Tripathi et al. 2017; McGillicuddy et al. 2017; Sierra et al. 2016). Among their numerous uses, nanoparticles and particularly metal-oxide nanoparticles, have often been used for their antibacterial properties, reviewed in (Wang, Hu, et al. 2017; Dizaj et al. 2014). They are also considered an alternative to antibiotic treatment because they can efficiently kill bacteria with no or a very limited emergence of drug resistance to date.

Most often, the deleterious impacts of nanoparticles on cells and especially on bacteria are described as the result of a physical injury to cell integrity, either by disruption of the membrane and/or by the production of reactive oxygen species (Wang, Hu, et al. 2017; Yousefi et al. 2017). Some recent publications have shown that nanoparticles can also impact internal physiological processes of bacteria such as stringent response, respiration, central metabolism, motility, sporulation or chromosome condensation (Luche et al. 2016; Poirier et al. 2016; Mu et al. 2016). We have shown that exposure of the soil bacterium *Bacillus subtilis* (laboratory strain, 168) to n-TiO₂ and n-ZnO, under long-term adaptation growth conditions in a liquid medium, impacts its physiological state by modifying the central metabolism and stringent response (Luche et al. 2016).

However, the natural biotope of *Bacillus subtilis* is the upper layer of soil, where it grows as a biofilm. To mimic this physiological development and study the impact of nanoparticles during the formation of a biofilm in a contaminated soil, we studied the proteomic response of the ancestral strain *Bacillus subtilis* 3610, which is able to form a biofilm, contrary to the well known 168 laboratory strain. The bacteria were grown on soft agar plates containing n-ZnO and n-TiO₂. We show here that under these growth conditions, where the nanoparticles are not physically in contact with bacteria, n-TiO₂ and n-ZnO impact, in an opposite way, the expression of two oligopeptide ABC transporters, OppABCDF and AppABCDF, and consequently, the competence of *Bacillus subtilis*. The competence being

one of first step of the transformation process, our results suggest that nanoparticles impact horizontal gene transfer in, at least Gram positive bacteria and may have significant impact on the appearance of antibiotic-resistant bacteria.

Materials and methods

Bacterial strain culture media and chemicals

The *Bacillus subtilis* strain used was the 3610 strain (wild type) (personal gift, Dr Maria Laaberki). The medium was Luria-Bertani (LB): 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl. Cells were grown in Erlenmeyer flasks with shaking at 200 rpm at 37°C. Erythromycin final concentration was: 0.5 µg/ml. pJim plasmid was a personal gift from Dr. Etienne Dervyn (INRA, Micalis). The nanoparticles were from SIGMA: n-TiO₂ (ref 700347, mixture 80:20 of anatase and rutile, 33-37 wt.% in water, <150 nm volume distribution, DLS, n-ZnO (ref 721077, 50% in water, <100 nm by DLS), and n-Ag (ref 758329, 5 wt% in ethylene glycol, <100 nm by TEM) were already purchased as soluble dispersions. Their principal features have been described elsewhere (Triboulet et al. 2014; Triboulet et al. 2015). Biofilm agar plate preparation: The growth on soft solid agar LB medium was performed using a six well multi-well plate. Each well was filled with 7 ml of LB agar (10g/L) containing or not a stress agent: 13 µg/ml n-TiO₂, 17 µg/ml n-ZnO, 0.03 mM ZnSO₄, 10⁻³ g/l silver lactate or 10⁻³ g/l n-Ag. The multi-well plate was dried overnight (15h) at 37°C before being used.

Biofilm growth conditions

A 3610 *Bacillus subtilis* culture grown overnight on liquid LB at 37°C was diluted to A_{600nm}= 0.1 in 10 ml of fresh LB medium and incubated at 37°C and 200 rpm until the A_{600nm} reached 0.7. 3 µl of this culture were inoculated in the middle of each well of the multi-well plates. The plates were then incubated at 30°C for 48h. All the cells contained in a well were recovered using a sterile plastic öse. For mass spectrometry experiments, the cells were directly put in sterile microtube and quickly froze at -20°C. For the competence tests, the cells were resuspended in competence medium (Spizizen medium 1x (2g/l (NH₄)₂SO₄, 14g/l K₂HPO₄, 6g/l KH₂PO₄, 1g/l Sodium citrate), 3 mM MgSO₄, 0.5% Glucose) containing 20% Glycerol to final A_{600nm}=4 and quickly froze at -80°C.

All experiments were performed in triplicate (three independent growth cultures) and at least two technical replicates.

Proteomic methods are described in the PRIDE repository PXD006444.

Competence tests

Cells which were frozen as described above were quickly diluted ten times in warmed (37°C) competence medium (1x Spizizen medium, 0.5% Glucose and 3mM MgSO₄). Then, 1-5 µg of plasmid DNA (pJim) was added to 100 µl of defrosted cells (corresponding to 10⁸ viable cells/ml) and the mix was incubated 1h at 37°C and 200rpm. After the addition of 300 µl of LB and incubation 1h30 at 37°C and 200 rpm, 100 µl of mix was plated on LB-Erythromycin and 100 µl of appropriate dilutions were plated on LB agar without antibiotics for CFU determination. The presence of the pJim plasmid in cells growing on LB-Erythromycin plates was assessed by PCR analysis using the RepE primers: RepE-R (gacttgaacgagtaaagccc) and RepE-F (cgctcaatcactaccaagcc). YomS primers, YomS-F (ccagcaatgtcgaagtcccaa) and YomS-R (cgcaacttccccatctgaag), were also used to determine the *Bacillus subtilis* strain identity. All experiments were performed at least in triplicate (three independent growth cultures) and with at least two technical replicates.

Proline assay

Crude extracts were prepared as described above. Aliquots of the crude extract were used to measure the total protein quantity using the Bradford assay. To measure the free proline, proteins of the crude extracts were precipitated with 10% TCA for one hour on ice, and harvested by centrifugation (13,000g, 5 min). Proline content was assayed in the supernatant according to (Bates et al. 1973). Briefly, 900 µl of ninhydrine mix (0.4ml of H₂PO₄ 6M + 0.6 ml Acetic acid + 25mg ninhydrine) was added to 100 µl of supernatant, incubated for one hour at 100°C, and then cooled at room temperature, before 1 ml of toluene was added. The mix was vigorously mixed during 10sec and the optical absorbance at 520 nm was measured in the aqueous phase. All experiments were performed in triplicate (three independent growth cultures) with at least two technical replicates.

Sporulation assay

All of the cells contained in each well were recovered using a sterile plastic öse and diluted in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) to an OD₆₀₀ approximately of 1 before being incubated at 80°C for 10 min. Aliquots of appropriate dilutions taken before and after heat treatment were plated on LB plates. CFU were counted after overnight incubation at 37°C.

All experiments were performed in triplicate (three independent growth cultures) and with at least two technical replicates.

Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)

Shimadzu ICP 9000 (with Mini plasma Torch in axial reading mode) was used to measure the zinc content. Standard solution for AAS (Sigma Aldrich) was used to generate the calibration curve between 10 to 500 µg/L in pure water with 1% of HNO₃ (Fluka). Samples were routinely incubated in HNO₃ 10% ON at RT. Briefly, 500µl of each cytosolic crude extract was incubated with 90µl of HNO₃ 65% ON at RT. The sample was centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. Before to be measured pure water was added to the supernatant extemporaneously to obtain a final volume of 7 ml. Ytterbium solution standard for AAS (Sigma Aldrich) was used as an internal standard to prevent calibration drift and fluidic perturbation. The result was express in µg/L [Zn] per mg of protein.

Results

Proteomic analysis

The 3610 *Bacillus subtilis* strain was grown on a soft agar LB plate to promote the swarming motion during the formation of biofilm. Figure 1 shows the macroscopic phenotypes from 24 to 72h of growth on soft agar containing nanoparticles: the growth was similar with or without n-TiO₂ nanoparticles. In contrast, the growth seems to be slowed down and stopped after 24h in the presence of n-ZnO and ZnSO₄ salt, respectively. The cells were collected after 48h of growth to be analysed by shotgun proteomics, and the data are available at the PRIDE repository (data set identifier PXD006444). In view of the very different macroscopic phenotypes of the biofilms observed in response to n-TiO₂ and n-ZnO or ZnSO₄ (Fig. 1a), we decided to focus our analysis on proteins for which the proteomic data showed an opposite expression profile when we compared, on one hand, the direction of the variation of n-ZnO or ZnSO₄/control and, on the other hand, the variation of n-TiO₂/control. Among all of the proteins showing a significant modification in their expression, ten proteins were highlighted: OppA, OppB, OppC, OppD, OppF, AppA, AppB, AppC, AppD and AppF, which are encoded by two operons, *oppABCD* and *appDFABC*, respectively (Fig. 1d). All of the proteins coded by both operons have been detected by proteomic analysis. The fold change between control and the exposed cells was always low, from 1.1 to 1.4 for an increase and from 0.7 to 0.95 for a decrease. However, their expression profiles were consistently modified in the same way in both operons: they were all increased in the presence of n-TiO₂ and decreased in the presence of n-ZnO or ZnSO₄ salt (Fig 1b-c), with only two exceptions, OppF and AppC for the ratio n-ZnO/control and n-TiO₂/control, respectively, for which the t-test were not significant. Both operons code for the same functional multimer protein, an oligopeptide ABC transporter. The App transporter can completely substitute Opp transporter in two main cellular mechanisms: the sporulation and the competence (Koide & Hoch 1994; Lazazzera et al. 1997; LeDeaux et al. 1997; Koide et al. 1999; Solomon et al. 2003). Zaprasis and collaborators (Zaprasis et al. 2013) have also described the involvement of Opp and App transporters in the osmoprotection of the bacteria by the import of proline-containing peptides. Their transcriptional expression is dependent on the growth phase: the

transcription of *opp* occurs during the exponential growth, while *app* is expressed during the stationary phase (Koide et al. 1999). In our conditions, both operons show the same protein expression profile, which is not correlated to the growth phase but to the response to an external signal produced directly or indirectly by the presence of the nanoparticles and salts. We decided to explore the effect of nanoparticles on the three cellular mechanisms known to be linked to the Opp and App ABC transporters: osmoprotection, sporulation and competence.

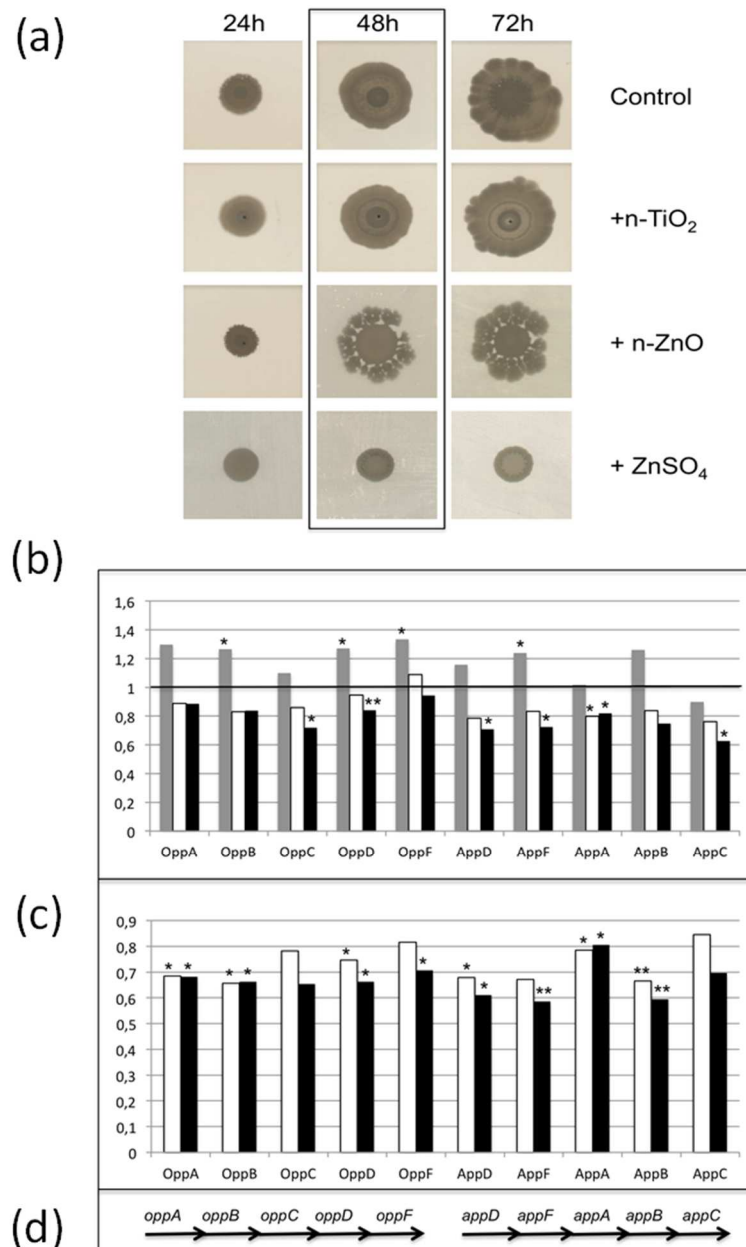


Figure 1: (a) Effect of nanoparticle on *Bacillus subtilis* growth. Colony biofilms formed on LB soft agar containing: no nanoparticle, n-TiO₂, n-ZnO or ZnSO₄ salt after 24h, 48h and 72h of growth at 37°C. (b-d) Expression ratio of the OppABCD and AppDFABC proteins determined by proteomic analysis: (b) Compared to the control: in grey, ratio of the protein expression in presence of n-TiO₂/protein expression in the control growth condition; in white, in presence of n-ZnO and in black in presence of ZnSO₄. (c) Compared to the n-TiO₂ exposition: in white, ratio of the protein expression in presence of n-ZnO/protein expression in presence of n-TiO₂; in black, ratio of the protein expression in presence of n-ZnSO₄/protein expression in presence of n-TiO₂. (d) Schematic representation of the operons coding for both oligopeptides ABC transporter. Asterix * and ** indicate significant differences $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively.

Role of the Opp and App ABC transporters in response to nanoparticles

The osmotic stress controlled by the import of proline-containing peptides. To determine whether the nanoparticles and salts have been sensed as an osmotic stress controlled by the import of proline-containing peptides, which is mediated by the App and Opp transporters, we measured the intracellular proline concentration. No significant differences were observed after 48h of growth on soft agar, with or without nanoparticles or salt (Fig. 2a). Moreover, except Dpp, a dipeptide transporter permease, no other protein known to be involved in this type of osmotic response (Kempf & Bremer 1995; Moses et al. 2012; Zaprasis et al. 2013) such as OpuAA, the glycine betaine ABC transporter, PutP, responsible for the proline uptake, PapA, an Xaa-Pro amino-peptidase, or its paralogue PapB, showed a similar expression profile to those of the Opp and App transporters (Fig. 2b). The expression profile of Opp and App, in the presence of nanoparticles or salt, is not the result of osmotic stress controlled by the import of proline-containing peptides.

The sporulation. Then, we compared the percentage of sporulation (= number of spores/total CFU) x 100) after the exposition to nanoparticles. In all treated cells, we observed an increase in sporulation in the same order of magnitude, of around ten (Fig. 2c), compared to the control condition, which cannot be correlated with the differential expression profile of Opp and App transporters observed in the presence of nanoparticles (Fig. 1b). The sporulation process is under the control of a complex regulatory network reviewed in (de Hoon et al. 2010). It should be noted that the proteomic analysis has allowed the identification of proteins specific to the sporulation state but no significant difference concerning their expression has been detected (PRIDE repository PXD006444). Thus, the differential expression of the Opp and App transporters is not directly linked to the sporulation process.

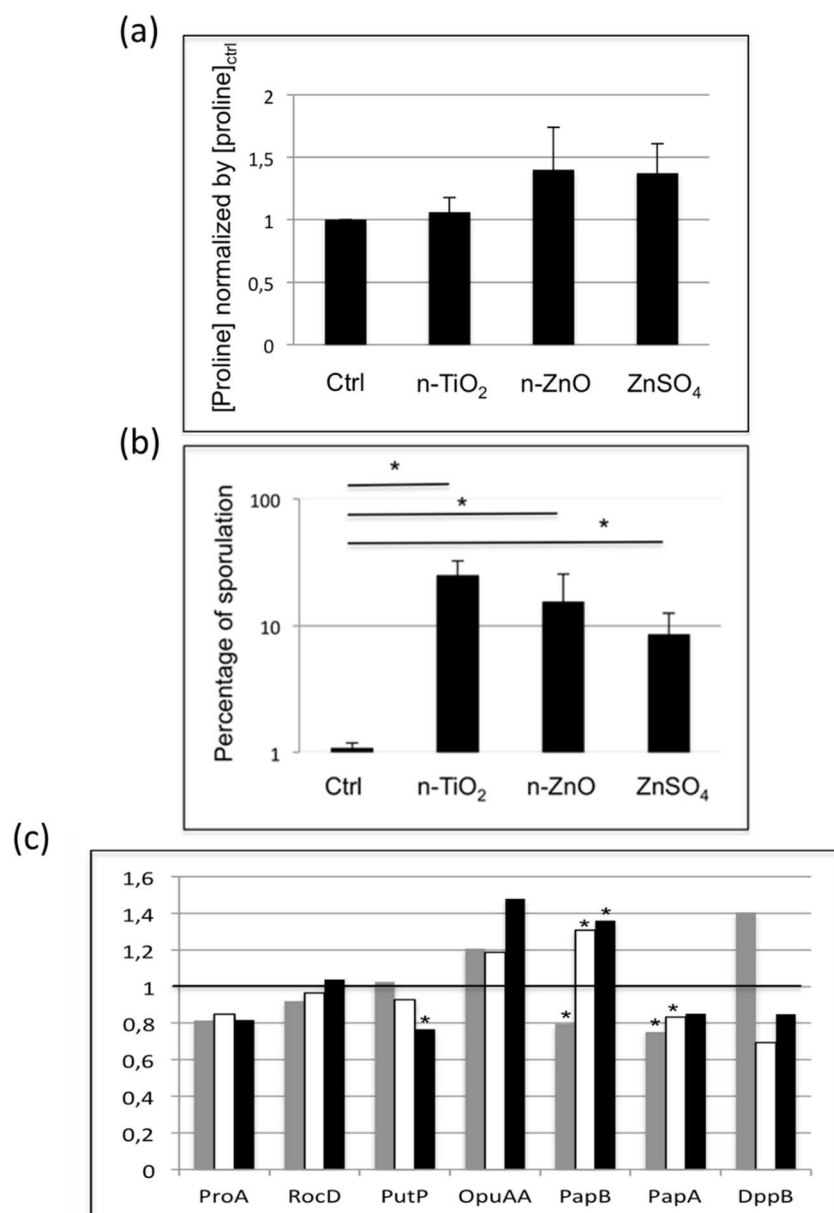


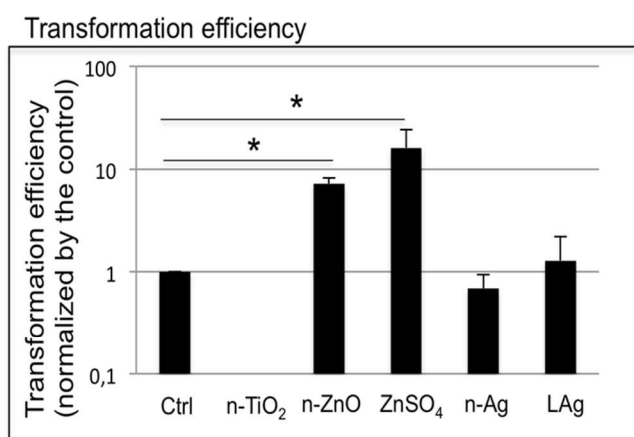
Figure 2: Effect of nanoparticles on the [proline]_{intracellular} and the sporulation (a) Proline assay: [Proline] was normalised by the [proline] measured in the control (b) Percentage of sporulation = (number of spore forming/CFU) x100. Error bars $\pm$ 1SD ($n \geq 3$). Asterix indicates significant differences $p < 0.05$. (c) Expression ratio of the ProA, the glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase, RocD, the ornithine transaminase, PutP, responsible for the proline uptake, OpuAA, the glycine betaine ABC transporter, PapA, an Xaa-Pro aminopeptidase, and its paralogue PapB and DppB, a dipeptide transporter permease, proteins determined by proteomic analysis: in grey, ratio of the protein expression in presence of n-TiO₂/protein expression in the control growth condition, in white, in presence of n-ZnO and in black, in presence of ZnSO₄. Asterix indicates significant differences $p < 0.05$

Competence. The expression profile of the Opp and App ABC transporters in the presence of n-TiO₂ and n-ZnO and ZnSO₄ salt was not correlated to a modification of the sporulation or a response to osmotic stress by the import of proline-containing peptides; therefore, we tested the third mechanism linked to both ABC transporters, the competence of bacteria, i.e. their ability to bring DNA into the cells, which is the first step of transformation, one of the mechanisms involved in horizontal gene transfer. We measured the transformation efficiency using a replicative plasmid pJim, after 48h of growth on soft agar containing nanoparticles or salt, as described in the methods. The presence of the plasmid pJim in cells resistant to erythromycin was controlled by PCR analysis using primers specific to the pJim plasmid. All erythromycin resistant colonies contained the pJim plasmid (data not shown). Figure 3a-b shows that the transformation efficiency was significantly affected after exposure of the cells to nanoparticles or salt: under the control conditions, we observed a transformation frequency (transformants/CFU) of around 10⁻⁹, whereas in the presence of n-TiO₂, we were never able to observe a transformant cell. Also in the presence of n-ZnO and ZnSO₄, we observed a 10-fold increase in the transformation frequency, of around 10⁻⁸. Despite the fact that biofilm growth conditions are clearly not optimised to trigger the competent process, we have observed significant and opposite effects of the nanoparticles n-TiO₂ and n-ZnO on the competence. The effect was the same with n-ZnO and ZnSO₄ salt: an increase of the competence with the same magnitude order. It has already been described that in rich liquid bacteria medium, n-ZnO is dissolved in Zn²⁺ ions and complexed with amino acids contained in the medium (Li, Zhu, et al. 2011). If we consider total dissolution, the soft agar plates would contain 0.2 mM and 0.03 mM of Zn²⁺ ions with n-ZnO and ZnSO₄, respectively. Under both conditions, the amino acid and peptide concentrations provided by the tryptone and yeast extract in the LB medium were quite sufficient to complex all of the Zn²⁺ ions. The fact that similar phenotypes, macroscopic growth (Fig. 1a), Opp and App transporter expression profiles (Fig. 1b-c) and competence (Fig. 3a-b), were observed with n-ZnO and ZnSO₄ salt drove us to hypothesise that only a portion of n-ZnO was effectively dissolved in soft agar medium. This may correspond to ≤ 0.03 mM dissolved Zinc, which corresponds to ≤ 15% of n-ZnO dissolved in the agar medium. This hypothesis was confirmed by the total absence of growth on soft agar plates containing 0.3 mM of ZnSO₄ salt (data not shown) and moreover, by the ICP assays, which have shown

that [Zn] intracellular was significantly increased but with the same magnitude order, in both conditions while the potential total quantity of Zn ions is ten times higher with n-ZnO than with ZnSO₄ (Fig. 4). Because of the absence of physical contact between nanoparticles and bacteria in our conditions and the homology of phenotypes, we concluded that the observed phenotypes were due to the $\approx 15\%$ of dissolved Zn²⁺ ions.

To test the specific role of nanoparticles in the variation of the competence of a bacterial cell, we have measured the transformation efficiency in the presence of a third nanoparticle which is also known to have a high level of dissolution in growth culture medium: n-Ag. As for the exposure with n-TiO₂ and n-ZnO, the bacteria were exposed to 1-ppm n-Ag or Silver lactate embedded in soft agar for 48h. In all conditions, the biofilm has the same macroscopic phenotype (Fig. 3c). The cell exposed to n-Ag or silver lactate were recovered and incubated with the pJim plasmid. Figure 2a-b shows that in the presence of n-Ag or silver lactate as an ionic control, no significant difference in the transformation efficiency was observed.

(a)



(b)

nb Ery^R colonies/10⁹ CFU

Ctrl	n-TiO ₂	n-ZnO	ZnSO ₄	n-Ag	LAg
1.03 ± 1	<1.03	7.4 ± 1	16.6 ± 0.8	0.91 ± 0.3	1.6 ± 1.2

(c)

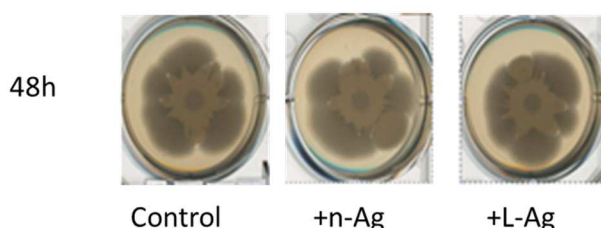


Figure 3: Effect of nanoparticles on the *Bacillus subtilis* competence.

The cell exposed to n-TiO₂, n-ZnO, ZnSO₄, n-Ag or silver lactate were recovered and incubated with the pJim plasmid. We measured the transformation efficiency using a replicative plasmid pJim, after 48h of growth on soft agar containing nanoparticles or salt, as described in the methods. The presence of the plasmid pJim in cells resistant to erythromycin was detected by PCR analysis using primers specific to the pJim plasmid. The presence of the plasmid pJim in cells resistant to erythromycin was controlled by PCR analysis using primers specific to the pJim plasmid. All erythromycin resistant colonies contained the pJim plasmid (data not shown). (a) Transformation efficiency after exposition to nanoparticles or salt normalized by transformation efficiency in the control growth condition. Error bars ± 1SD ($n \geq 3$). Asterix indicates significant differences $p < 0.05$. (b) Transformation efficiency (transformants/CFU): Number of erythromycin resistant colonies/10⁹ colony forming unit. (c) Colony biofilms formed on LB soft agar containing no nanoparticle, n-Ag or Silver Lactate after 48 of growth at 37°C.

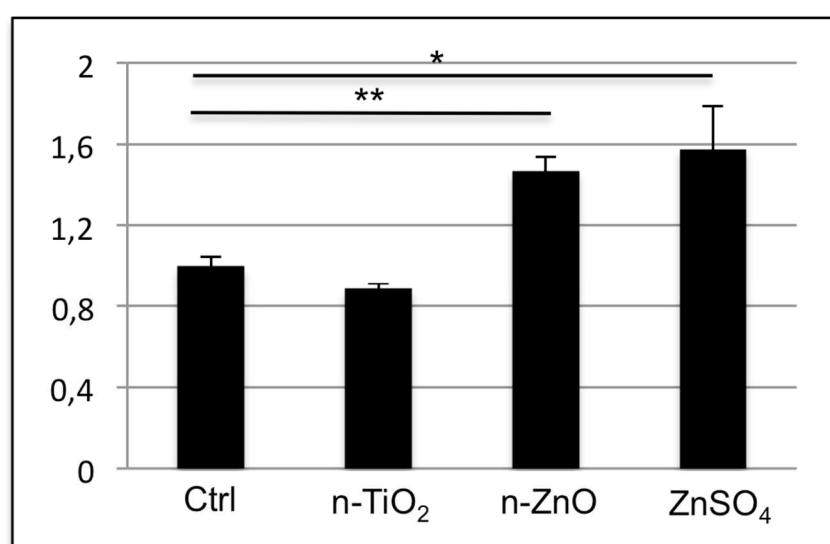


Figure 4: Intracellular Zn concentration/mg protein.

All the assays were performed in triplicate and at least two technical replicates. The results were normalized by the value obtained in the control condition. Error bars $\pm 1SD$ ($n \geq 3$). Asterix * and ** indicate significant differences $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively.

Discussion

The presence of three different nanoparticles, n-TiO₂, n-ZnO and n-Ag, in soft agar during the biofilm growth of *Bacillus subtilis*, induced three different effects on the competence process: n-Ag has no effect, while n-TiO₂ inhibits and n-ZnO increases the *Bacillus subtilis* competence. The competence process from its induction to the complete entry of DNA in the cell is very complex and not totally understood: it involves many regulation cascades, transporters, sensors and enzymes and the situation is probably even more complex in the context of a biofilm formation (Freyre-González et al. 2013; Hamoen, Kausche, et al. 2003; Jakobs & Meinhardt 2015; Romero 2013).

DNA uptake, followed by the recombination and/or the replication, is a natural way for bacteria to survive and adapt their genome to environmental modifications. The transformation frequency measured in the control conditions is far lower than the values reported in the literature, even for the 3610 strain (Nijland et al. 2010; Konkol et al. 2013; Parashar et al. 2013), where it is less than 10⁻⁸ to 10⁻⁶. However, in all of these publications, the authors have optimised the competence of the cells by conditioning them with growth conditions known to induce the competent process (e.g. deficiency in amino acids) or by genetic modifications (curing the pBS32 plasmid (Konkol et al. 2013)). The population of a biofilm is extremely heterogeneous in its architecture and cell composition (Shank & Kolter 2011). *Bacillus subtilis* can be differentiated in different communities, considering their main physiological pathway, that coexists in the same environment: motile cells, spores, cannibal cells, matrix producers, competent, surfactin producers, dead cells or undifferentiated cells (Lopez et al. 2009; Shank & Kolter 2011). It is well documented that even under favourable conditions, only a small proportion of the population induces the cascade of gene expression required for the competent phenotype. However, low transformability seems to be standard for wild-type *Bacillus subtilis* strains, such as the 3610 strain, but the ecological parameters favouring genetic competency remain largely obscure, as described by Jakobs and Meinhardt (Jakobs & Meinhardt 2015).

It has to be noticed that several publications have already shown that nanoparticles may be involved in a better transformation efficiency (Varela et al. 2014; Mattos et al. 2011;

Hollanda et al. 2011; Rojas-Chapana et al. 2005; Ding et al. 2016; Qiu et al. 2012). But, in all these cases, the authors demonstrated that it was due to a mechanical effect of the nanoparticles: protection of the DNA from DNase activity by interaction between DNA and nanoparticles (Mattos et al. 2011) or damage to the cell envelope which improves the DNA uptake (Rojas-Chapana et al. 2005; Ding et al. 2016; Qiu et al. 2012), i.e. phenomena that occur only under laboratory growth conditions in an agitated liquid medium. In our case, where the nanoparticles were embedded in the agar and have at most a very limited direct contact with the bacteria, the proteomic data show that nanoparticles have significant impacts on the physiology of bacteria by indirect mechanisms that are still unclear. One physiological consequence is modification of their competence and, consequently, their ability to acquire new characteristics by horizontal gene transfer.

In the presence of n-ZnO, the modification of competence is probably the result of a partial dissolution of the nanoparticles into Zn ions. Li and colleagues have shown, on the one hand, that n-ZnO is completely dissolved into Zn^{2+} ions in liquid LB medium and, on the other hand, that most Zn^{2+} ions are complexed with amino acids resulting in a dramatic decrease of the n-ZnO toxicity (Li, Zhu, et al. 2011). In our conditions, where n-ZnO is embedded in agar plate, the results let suppose that n-ZnO in a solid and complex biological medium is not totally dissolved and moreover, may act as sustained delivery zinc storage with a long-term toxicological impact.

We have demonstrated that, besides the most known impacts of nanoparticles on bacteria, i.e. death or the induction of oxidative stress, the nanoparticles also modify the competence of the Gram positive bacteria, *Bacillus subtilis*. This modification has been observed in growth conditions corresponding to a long-term adaptation to nanoparticles and at concentrations close to those observed in the natural environment ($\leq 1\text{ppm}$) (Gottschalk et al. 2013). In the case of n-ZnO and n-Ag, which are known to be largely dissolved in the corresponding ion in liquid biological media, the physiological effects were completely different: an increase of competence and no impact, respectively. In contrast, after exposure to n-TiO₂, the competence was significantly decreased. Under the same growth conditions, long-time adaptation and biofilm formation on soft agar, the exposure to nanoparticles has

given rise to very different and opposite phenotypes depending on the nanoparticle considered.

The increasing number of bacteria becoming resistant to many antibiotics by horizontal gene transfer has become a major public health problem. This increase is the result of human activity which has created hotspots for horizontal gene transfer, such as wastewater systems, hospitals (Gillings 2017) or intensive farming. It is also in such locations that nanoparticles of variable types can be found in appreciable amounts: for example, n-ZnO as a nutritional element for cattle (Buff et al. 2005) or food additive, n-TiO₂ and n-Ag, in personal care or medical products as a biocide, or in waste-water sludges as a result of industrial processes. In the future, the impact of nanoparticles, in realistic exposure conditions (e.g. without shaking) and especially nanoparticle mixtures, on the appearance of antibiotic-resistant bacteria has to be studied and taken in account.

Acknowledgments

This work was funded by the CNRS, The University of Grenoble Alpes. This work is a contribution to the Labex Serenade (n° ANR-11-LABX-0064) funded by the « Investissements d'Avenir » French Government program of the French National Research Agency (ANR) through the A*MIDEX project (n° ANR-11-IDEX-0001-02).

Author contributions

SL and EEV performed the biofilm growth experiments, the preparation of the proteomics extracts and the ICP-AES. EEV and CL performed the competence assays. CL performed the analysis of the proteomic data and the proline assays. EEV performed the sporulation assays. CL and TR conceived the project and designed the whole study and drafted the manuscript. All authors approved the manuscript.

Competing Financial Interests statement

The authors declare having no competing financial interest statement.

2.3 Conclusion

Une analyse protéomique différentielle par spectrométrie de masse sur un biofilm de *Bacillus subtilis* après un stress aux ZnO-NPs, TiO₂-NPs et ZnSO₄ a été réalisée dans cette étude. Pour cela, le protéome intracellulaire de *Bacillus subtilis* non exposé aux nanoparticules a été comparé au protéome intracellulaire de *Bacillus subtilis* exposé aux ZnO-NPs, ZnSO₄ ou TiO₂. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence une expression différentielle des protéines composant les transporteurs OppABCDF et AppDFABC.

Ces transporteurs sont connus pour être impliqués dans différents mécanismes comme la compétence, la sporulation et la protection contre un stress osmotique. L'étude de ces trois mécanismes après un stress aux ZnO-NPs, TiO₂-NPs et ZnSO₄ nous a permis de mettre en évidence l'induction de la sporulation dans les trois stress testés et de la compétence après un stress aux ZnO-NPs et ZnSO₄. Une même expérience réalisée sur des nanoparticules d'argent ne montre pas d'induction de la compétence.

Plusieurs publications ont déjà identifiées une transformation bactérienne améliorée après une exposition aux nanoparticules (Ding et al. 2016; Hollanda et al. 2011; Mattos et al. 2011; Qiu et al. 2012). Cependant, contrairement aux études réalisées jusqu'à présent qui montrent que cette amélioration fait suite à des effets mécaniques des nanoparticules (abrasion de la paroi, protection de l'ADN), nous montrons dans cette étude qu'elle est due à une réponse physiologie de *Bacillus subtilis* suite à un stress aux nanoparticules. En effet, dans notre étude, réalisée en milieu solide, les nanoparticules sont piégées dans l'agar des boîtes. Cette modification de la compétence est donc une réponse physiologique induite par *Bacillus subtilis* suite à un stress aux nanoparticules.

Cette étude réalisée sur un biofilm bactérien, état où *Bacillus subtilis* est le plus souvent dans l'environnement, montre qu'outre l'impact le plus connu des nanoparticules, c'est-à-dire la mort cellulaire et/ou l'induction d'un stress oxydatif, les nanoparticules peuvent modifier également la compétence des bactéries Gram⁺, qui peuvent avoir d'importantes conséquences sur l'équilibre écosystémique. Nous montrons donc l'importance d'évaluer l'impact d'un rejet des nanoparticules, qui peut aller au-delà de l'induction d'une mort cellulaire.

Discussions et perspectives

1. Discussion méthodologique

1.1 A propos des nanoparticules

Les nanoparticules de TiO_2 , ZnO et d'Ag sont les trois nanoparticules métalliques les plus utilisées en industrie. En raison de l'accumulation croissante de ces nanoparticules dans les sols prévue dans les modèles (Keller et al. 2013), elles ont été choisies pour cette étude.

Au vu de l'importance de la sulfuration des nanoparticules d'argent au cours de leur cycle de vie, notamment dans les stations d'épuration des eaux usées, nous avons étudié les nanoparticules d'argent dites « pristine » et les nanoparticules d'argent après sulfuration, dites « vieilles » (Article 1). Cette sulfuration se fait par réaction entre les nanoparticules d'argent et du Na_2S . Nos études de caractérisation montrent cependant que ces nanoparticules vieilles forment de gros agrégats ($> 1 \mu\text{m}$) d' Ag_2S (forme acanthite), et ne sont pas vraiment représentatives des nanoparticules sulfurées observées dans les boues d'épuration et dans les sols amendés par les boues. En effet, ces dernières sont présentes dans les boues d'épuration sous forme d' Ag_2S d'acanthite nano- et micrométrique, et d' Ag_2S amorphe et/ou Ag-thiols (Pradas del Real et al., 2016). Les résultats obtenus pour les nanoparticules d'argent vieilles sont donc à prendre avec précaution car ils sous-estiment probablement les effets toxiques et la biodisponibilité de l'Ag.

1.2 A propos des concentrations et des modalités d'exposition aux nanoparticules

Les réponses des bactéries aux stress dépendent de l'état physiologique dans lequel elles sont considérées. Une bactérie ne répondra pas de la même manière suivant par exemple : son stade de croissance (phase exponentielle ou phase stationnaire), le milieu de croissance utilisé, la formation de biofilm ou de spore. Contrairement à la majorité des études sur l'impact des nanoparticules sur les bactéries, nous avons testé différentes

modalités d'exposition aux nanoparticules et différentes concentrations en nanoparticules afin de nous rapprocher des conditions environnementales.

Les concentrations d'exposition des nanoparticules dans ces différentes études ont été choisies selon plusieurs critères. Pour l'étude des modifications du métabolisme central suite à un stress aux nanoparticules (Article 3), nous avons fait le choix d'appliquer une concentration en nanoparticules qui induit 50% de mortalité (soit 130 µg/ml pour les TiO₂-NPs, 170 µg/ml pour les ZnO-NPs). Cette dose reste bien supérieure aux doses environnementales mais bien inférieure aux doses appliquées le plus souvent dans la littérature. Elle permet de faire un compromis entre les limites techniques de détection d'une réponse bactérienne et les doses attendues dans les sols. Dans notre seconde étude réalisée sur milieu solide (Article 4), nous avons choisi de diminuer cette dose par 10 (soit 13 µg/ml pour les TiO₂-NPs, 17 µg/ml pour les ZnO-NPs), car nous avons observé une mortalité plus élevée. Nous avons donc choisi une dose permettant d'observer un phénotype macroscopique tout en permettant une croissance bactérienne. Ces concentrations permettent également de se rapprocher de celles mesurées dans l'environnement (Gottschalk et al. 2013). Toutes les études réalisées sur le devenir des nanoparticules d'argent dans l'environnement ont été effectuées à des doses inférieures aux doses les plus souvent utilisées dans les études de toxicologie, afin de s'approcher des doses environnementales à 1 mg/L (Article 1).

Plusieurs modalités d'exposition de *Bacillus subtilis* aux nanoparticules ont également été choisies. En effet, deux types de conditions de croissance ont été utilisés pour ces expériences : une exposition en milieu liquide (Article 3) et une exposition en milieu solide (Article 4). Durant la culture en milieu solide nous avons exposé un biofilm *Bacillus subtilis* aux nanoparticules, état où elle est le plus souvent dans l'environnement, en particulier au niveau des racines des végétaux (Vlamakis et al. 2013). Pour cette étude nous avons également fait le choix d'une exposition plus longue (48h) afin d'observer des réponses de *Bacillus subtilis* sur le long terme. Néanmoins, dans une culture en milieu solide, contrairement aux cultures en milieu liquide, *Bacillus subtilis* n'est pas en contact direct avec les nanoparticules, qui sont alors piégées dans la gélose. Un autre mode d'exposition a donc été choisi dans les trois autres études (Articles 1,2,3) : une exposition en culture liquide. Elle

permet non seulement un contact plus important entre *Bacillus subtilis* et les nanoparticules ainsi qu'une extraction, et donc une caractérisation, plus facile des nanoparticules, mais également une exposition au sécrétome seul, de *Bacillus subtilis* (sans les bactéries elles-mêmes).

Enfin, deux types de souches ont été étudiés : La souche 168 et la souche 3610. La souche 168, dérivée de la souche dite « ancêtre » 3610, est la souche de laboratoire couramment utilisée dans des études fondamentales en raison de certaines de ses caractéristiques, telles que sa compétence améliorée et sa production plus limitée de protéases. Mais les modifications génétiques ayant permis l'acquisition de ces compétences ont aussi induit la perte de certaines capacités telles que la formation de biofilms structurés. La souche 168 plus éloignée des souches environnementales, a été choisie en première intention afin de réaliser des analyses protéomiques par électrophorèse bidimensionnelle de protéines, une technique robuste, reproductible et bien maîtrisée dans notre laboratoire. En effet, ce type d'analyse est impossible avec la souche 3610 en raison de la sécrétion de nombreuses protéases. Cependant, dans le souci d'être au plus proche des conditions environnementales, toutes les autres parties de cette étude ont été réalisées sur la souche 3610. En effet, le sécrétome de cette souche est bien plus proche du sécrétome de *Bacillus subtilis* dans l'environnement. De plus cette souche nous a permis d'étudier l'impact des nanoparticules sur un biofilm bactérien, état, où *Bacillus subtilis* est le plus souvent dans l'environnement. Pour cela une collaboration avec le laboratoire EDyP a été établie pour étudier son protéome par spectrométrie de masse.

1.3. A propos des techniques utilisées

De nombreuses techniques de caractérisation des nanoparticules ont été utilisées, ayant chacune des avantages et des inconvénients. La première technique classiquement utilisée pour déterminer l'état d'agglomération des nanoparticules (*via* leur diamètre hydrodynamique) est la DLS. Cette technique nous a permis de caractériser les tailles hydrodynamiques des nanoparticules (Article 1 pour les Ag-NPs et Ag₂S-NPs, Articles 3 pour les ZnO-NPs et les TiO₂-NPs) dans nos conditions expérimentales (H₂O, milieu de culture,

urnageant). Les nanoparticules de TiO_2 tendent à s'agglomérer dans le surnageant et le milieu de culture (diamètre hydrodynamique augmentant de < 100 nm dans l'eau à respectivement 200 nm et 300 nm), alors que les nanoparticules de ZnO se dissolvent (diamètre hydrodynamique diminuant de 150 nm dans l'eau à 50 nm dans le milieu de culture et le surnageant). Les nanoparticules d'argent subissent quant à elles, une dissolution partielle dans le milieu de culture, tandis que dans le surnageant deux phénomènes sont observés : une dissolution partielle et une agglomération avec l'apparition de diamètres hydrodynamiques inférieurs à 20 nm et d'autres supérieurs à 100 nm allant jusqu'à 900 nm, contre 20 et 100 nm dans l'eau.

L'avantage de cette technique est la possibilité d'analyser l'échantillon dans le milieu utilisé lors des expériences (milieu de culture et surnageant) sans nécessité de sécher l'échantillon. L'inconvénient est que cette technique fournit un diamètre hydrodynamique, sans information sur la nature de la particule (agglomérat, agrégat ou particule isolée). Lorsque nous observons une diminution du diamètre des nanoparticules de ZnO dans le milieu de culture et le surnageant dans l'article 3, nous ne pouvons pas conclure entre une diminution de l'agglomération ou une dissolution partielle si nous ne connaissons pas la taille nominale des nanoparticules initiales. Néanmoins, la capacité importante de dissolution des ZnO-NPs observée dans la littérature tend à favoriser la deuxième hypothèse. Pour trancher la question, il est nécessaire de combiner la DLS avec TEM, comme nous l'avons fait dans l'article 1, pour les nanoparticules d'argent. Cette combinaison nous a permis de mettre en évidence une dissolution partielle des nanoparticules d'argent dans le milieu de culture et le surnageant de *Bacillus subtilis*. Le TEM apporte également d'autres informations sur la morphologie et la structure des particules, comme la formation d'agrégats d' Ag_2S observée dans l'article 1. Elle nous a également permis de conclure une absence d'interaction entre les nanoparticules d'argent et la paroi bactérienne. Cependant, contrairement à la DLS, le TEM nécessite un conditionnement préalable de l'échantillon impliquant une déshydratation (nous n'avons pas eu accès au cryo-TEM dans cette étude). La déshydratation peut modifier l'état d'agglomération des nanoparticules. Dans notre cas, nous avons réalisé une préparation par séchage simple, ce qui rend impossible l'analyse d'agglomérats, à l'exception de l'échantillon avec *Bacillus subtilis* qui a été traité par congélation haute pression et cryosubstitution.

Concernant l'analyse de la composition chimique des nanoparticules, deux techniques ont également été utilisées : le TEM couplé à l'EDX et la nanoXRF. La nanoXRF possède une résolution de 50x50 nm environ, elle permet une analyse de zones de plusieurs μm^2 de l'échantillon et possède une limite de détection inférieure au mg kg^{-1} . Le TEM-EDX possède lui une meilleure résolution (quelques nm) mais une moindre sensibilité (10 voire 100 mg kg^{-1}), et le temps d'acquisition ne permet pas de cartographier des zones aussi grandes qu'en NanoXRF. Ces deux techniques peuvent être combinées à une analyse de spéciation : la diffraction des électrons pour le TEM et la spectroscopie nanoXANES pour la nanoXRF. Enfin, l'analyse par nanoXRF nécessite l'accès au synchrotron, *via* un comité de programme, or les lignes nanoXRF et nanoXAS sont encore très peu nombreuses et très demandées.

La détermination de la concentration intracellulaire des ions métalliques relargués par les nanoparticules puis internalisés dans les bactéries est classiquement analysée par ICP. Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'entrée de zinc dans la cellule. Concernant les études avec les nanoparticules d'argent, cette technique a été beaucoup plus compliquée à mettre en place et moins précise, plus particulièrement pour les nanoparticules d' Ag_2S , en raison d'une minéralisation incomplète, ne permettant pas de faire un bilan de masse entre le milieu et les bactéries. L'analyse par nanoXRF a permis cependant de confirmer la tendance observée par ICP, c'est-à-dire une entrée très faible d'argent dans les bactéries.

2. Discussion Générale sur les résultats

2.1 Effets de *Bacillus subtilis* sur la biodisponibilité des nanoparticules d'argent

Tout d'abord, nous avons étudié l'impact des nanoparticules d'argent, dans nos conditions de croissance, sur *Bacillus subtilis*. Contrairement aux différentes études réalisées jusqu'à présent (Dakal et al. 2016; Kim, Lee, et al. 2011; Rai et al. 2009), nous n'avons pas observé de toxicité majeure des nanoparticules d'argent pour *Bacillus subtilis*. En effet, après un stress aux nanoparticules d'argent, la viabilité ainsi que le protéome intracellulaire sont inchangés dans nos conditions expérimentales. Ceci est cohérent avec l'absence de l'entrée d'argent ionique dans les cellules. Ces résultats peuvent paraître surprenants en raison des propriétés antibactériennes reconnues de l'argent, qui ont fait de lui un élément essentiel en industrie (Durán et al. 2016). Cependant, dans nos études, nous avons fait le choix de mimer les conditions environnementales, pour cela nous avons exposé les bactéries durant la phase stationnaire de croissance aux nanoparticules. La plus grande tolérance des bactéries aux agents antimicrobiens et aux antibiotiques durant cette phase est bien connue (Anderl et al. 2003; Ito et al. 2009). Elle serait due à la limitation en nutriments qui diminue fortement : la division cellulaire, le métabolisme des cellules et les échanges avec le milieu. En plus de ces phénomènes, la résistance de *Bacillus subtilis* aux nanoparticules pourrait s'expliquer par la mise en place de nombreux mécanismes de protection tels que la sporulation et la compétence, comme nous l'avons vu pour les nanoparticules de ZnO.

L'absence de réorientation majeure du métabolisme central de *Bacillus subtilis* après un stress aux nanoparticules d'argent ne signifie pas absence de toxicité. Nous avons montré que le protéome intracellulaire n'était pas modifié. Cependant, il est envisageable que *Bacillus subtilis* réponde à un stress aux nanoparticules *via* une modification de son sécrétome. Des analyses du protéome extracellulaire qui doivent être validées montrent en effet un protéome extracellulaire modifié après un stress aux Ag-NPs et aux Ag₂S-NPs (données non présentées).

L'impact de ces molécules sur la spéciation et donc la biodisponibilité des nanoparticules a également été étudié. L'ensemble des résultats montre que *Bacillus subtilis* a un impact majeur sur l'état physico-chimique des nanoparticules d'argent. La première modification physico-chimique observée est une agglomération ainsi qu'une dissolution des nanoparticules suite à une mise en contact avec le sécrétome de *Bacillus subtilis*. Cette observation ne nous permet pas de conclure sur leur biodisponibilité. En effet, l'agglomération tend à la diminuer mais la dissolution à l'augmenter (Angel et al. 2013; Kvítek et al. 2008). Cependant, une autre modification physico-chimique a été observée et est connue pour diminuer leur biodisponibilité : la sulfuration. Cette sulfuration est totale en présence de *Bacillus subtilis* et est partielle (sous forme de « coating » autour de la nanoparticule) en présence des molécules sécrétées seules. Au vu des observations faites sur l'absence d'entrée de l'argent (ionique ou nanoparticulaire) dans la bactérie ainsi que l'absence d'interaction entre la paroi et les NPs, cette différence doit être la conséquence d'une interaction entre les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis* et les Ag-NPs. Nous savons que dans nos conditions expérimentales, le facteur limitant de la sulfuration n'est pas la quantité de soufre réduit mais l'oxygène dissout, nécessaire pour réaliser l'étape d'oxydation de Ag^0 en Ag^+ . En effet, cette réaction est grandement améliorée lorsque le milieu est aéré, elle est même totale avec notre contrôle argent ionique (lactate d'argent), pour lequel la sulfuration ne nécessite pas d'étape préalable d'oxydation d' Ag^0 . *Bacillus subtilis* pourrait donc sécréter des molécules en réponse à un stress aux nanoparticules d'argent qui favoriseraient l'oxydation de Ag^0 en Ag^+ .

Les produits de sulfuration suite à une incubation avec *Bacillus subtilis* incluent deux formes, l'acanthite (forme cristalline d' Ag_2S) et une forme d' Ag_2S amorphe et/ou Ag-thiol. Cette deuxième forme pourrait résulter de l'interaction entre des peptides ou des protéines à groupement thiol sécrétées par *Bacillus subtilis* et les ions Ag^+ libérés par oxydation des nanoparticules d'argent. La détoxification des ions Ag^+ par des molécules thiolées a déjà été mise en évidence chez les plantes (Larue, Castillo-Michel, Sobanska, Cécillon, et al. 2014) et les mammifères (Smulders et al. 2015 ; Veronesi et al. 2015). Concernant *B. subtilis*, une détoxification du zinc en intracellulaire *via* l'utilisation du bacillithiol pour contrôler le pool de zinc libre a également été mise en évidence (Ma, Chandrangu, et al. 2014). Dans notre étude (partie 2) nous montrons même que *Bacillus subtilis* réoriente son métabolisme du

soufre suite à un stress aux nanoparticules de zinc, afin d'augmenter la production de thiols libres et de bacillithiol.

Dans le souci d'être au plus proche des conditions environnementales, nous avons fait subir une étape de vieillissement par sulfuration aux nanoparticules d'argent, suite à un contact avec du Na₂S. Ces Ag₂S-NPs forment de larges agrégats (> 1 µm) d'Ag₂S cristallin, qui ne sont pas altérés en présence de *Bacillus subtilis* ou en présence des molécules qu'elles secrètent. Cette forme est cependant, bien différente de l'Ag₂S formée après un contact avec *Bacillus subtilis*, elle est donc sûrement très éloignée de la sulfuration qui se produit dans le sol. Il serait sûrement plus pertinent désormais d'utiliser la sulfuration bactérienne des nanoparticules d'argent pour étudier l'impact des nanoparticules sulfurées sur l'environnement.

En plus des molécules thiolées, les nanoparticules d'argent peuvent interagir avec d'autres types de molécules. Parmi les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis*, une est particulièrement connue pour interagir avec l'argent, c'est l'ADN (Swasey et al. 2015; Yuan et al. 2014). Contrairement à ce que nous nous attendions, nos études ne montrent pas ce type d'interaction entre l'ADN sécrété et les nanoparticules d'argent. Une de nos hypothèses est une compétition avec d'autres types de molécules, qui jouerait en défaveur de l'ADN. En effet, nos résultats montrent une interaction entre le poly-γ-glutamate (γ-PGA) et les nanoparticules d'argent, diminuant ainsi la quantité de γ-PGA libre dans le surnageant. Nous avons montré que la concentration en γ-PGA libre dans le surnageant est inversement proportionnelle à la concentration de nanoparticules d'argent. Nous avons vu qu'à des concentrations de nanoparticules d'argent proche de l'environnement (1mg/L), une part importante du γ-PGA sécrété par *Bacillus subtilis* est liée aux nanoparticules, jusqu'à ne plus être détectable à des concentrations d'argent de 10mg/L. Le γ-PGA est connu pour protéger *Bacillus subtilis* contre des stress environnementaux comme le stress hydrique et la présence d'agents pathogènes (Bajaj & Singhal 2011; Candela & Fouet 2006). Il est également connu pour se lier aux métaux lourds, être une source de glutamate lors de famine et un facteur de mobilisation des cations du sol vers les plantes dans la rhizosphère (Ashiuchi 2013; Zhang, Yang, et al. 2017). Nos résultats suggèrent qu'il pourrait être également un moyen de protection contre un stress aux nanoparticules. Sa sécrétion est finement régulée, elle est

notamment augmentée en phase stationnaire. Cependant, notre étude ne montre pas de modification de sa production après un stress aux nanoparticules d'argent.

La plupart des études réalisées à ce jour sur les interactions entre bactéries et nanoparticules d'Ag se sont focalisées sur le compartiment intracellulaire (Durán et al. 2016; Marambio-Jones & Hoek 2010). Notre étude montre qu'à faible dose et en phase stationnaire, l'essentiel des phénomènes se produit à l'extérieur des cellules. Les interactions entre les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis* et les nanoparticules d'argent conduisent à des changements de spéciation de l'Ag, mais également à une perturbation des molécules excrétées comme le γ -PGA. Cela peut donc avoir des conséquences pour *B. subtilis* mais aussi pour l'équilibre de la rhizosphère et donc les plantes. Il serait intéressant de tester si les mêmes perturbations dues aux Ag-NPs existent pour d'autres classes de molécules comme les peptides ou protéines à groupement thiol, ou si d'autres nanoparticules métalliques se fixent également au γ -PGA.

Concernant la résultante des phénomènes observés (sulfuration et interaction avec le γ -PGA) sur la biodisponibilité de l'Ag, des mesures par DGT (diffusive gradient in thin films) ou par ultrafiltration (Navarro et al. 2008) permettraient de répondre à cette question. La sulfuration des nanoparticules est connue pour diminuer la toxicité, cependant l'impact de la fixation de protéines à groupement thiol (ou dérivés thiolés, type bacillithiol) ou de γ -PGA n'est pas connu. Une interaction γ -PGA -NPs pourrait aussi bien diminuer leur biodisponibilité en protégeant *Bacillus subtilis* du relargage d'ions Ag^+ , que l'augmenter suite à un transfert trophique par ingestion de *Bacillus subtilis* par le mammifère *via* l'ingestion des plantes. Une fois dans le tractus intestinal un tel complexe γ -PGA -Ag-NPs pourrait faciliter la livraison de nanoparticules dans les cellules eucaryotes intestinales et donc augmenter leur biodisponibilité. En effet, plusieurs travaux ont été publiés sur le rôle du γ -PGA pour faciliter la délivrance de médicaments (Khalil et al. 2017).

En dehors des sols contaminés, l'interaction entre le γ -PGA et les nanoparticules peut avoir des applications intéressantes dans la dépollution des eaux usées. En effet, du fait de ses propriétés biochimiques remarquables (biopolymère biodégradable, soluble dans l'eau, non immunogène et non toxique pour l'homme et l'environnement, à forte capacité de sorption), le γ -PGA est utilisé pour l'absorption de cations métalliques dans le traitement des

eaux usées. Cette nouvelle compétence d'interaction avec les nanoparticules d'argent observée dans cette étude rend le γ -PGA encore particulièrement pertinent pour le traitement des eaux usées.

2.2 Effets des nanoparticules de TiO_2 -NPs et de ZnO -NPs sur *Bacillus subtilis*

Les nombreuses études réalisées sur l'impact des nanoparticules sur *Bacillus subtilis* sont essentiellement des études descriptives, qui montrent principalement une mort cellulaire après l'induction de la production d'espèces réactives à l'oxygène. Peu d'entre elles renseignent sur les mécanismes moléculaires mis en place par *Bacillus subtilis* pour répondre à un tel stress. Les analyses protéomiques utilisées dans cette étude nous ont permis d'aller plus loin et d'identifier l'induction de plusieurs mécanismes de réponse au stress autres que ceux d'un stress oxydant classiquement mis en évidence (Durán et al. 2016). Deux approches protéomiques ont été employées dans cette étude, une approche par électrophorèse bidimensionnelle de protéines et une approche par spectrométrie de masse. Ces approches nécessitent ensuite des validations, qui ont été réalisées par dosages biochimiques, mesure d'activité enzymatique ou dans le cas de l'utilisation de la souche 3610 qui sécrète de nombreuses protéases, ces validations ont été réalisées par analyse de phénomènes physiologiques plus globaux. Pour exemple, nous avons observé l'induction de la compétence génétique en observant l'augmentation du transfert d'ADN après un stress aux nanoparticules.

Ces analyses protéomiques nous ont permis de mettre en évidence une réorientation métabolique, ainsi qu'une induction de la compétence génétique, et une augmentation de la réponse stringente et de la sporulation.

Réponse métabolique suite à un stress oxydant et/ou thiol :

La première réorientation métabolique observée suite à un stress aux ZnO -NPs et Zn ionique (ZnSO_4) est une réorientation du métabolisme des thiols. En effet, nous montrons qu'un stress aux ZnO -NPs ou au ZnSO_4 induit une augmentation de la production de cystéine

au profit de la méthionine. Notre hypothèse est que cette réorientation permet non seulement l'augmentation de thiols libres mais également la fabrication de Bacillithiol, une molécule essentielle pour la protection contre une variété de stress dont le stress oxydatif (Gaballa et al. 2010). En effet, la cystéine est connue pour être un des substrats de la synthèse du CoA, lui-même un substrat de la synthèse du bacillithiol. La deuxième réorientation observée est celle du métabolisme central du carbone, avec une réorientation du cycle de Krebs, de la glycolyse ainsi que de la voie des pentoses phosphates. Nous montrons qu'en présence de ZnO-NPs ou de ZnSO₄, *Bacillus subtilis* modifie son cycle de Krebs afin d'augmenter la production d'acétyl-coA et de NADPH au dépend de la production d'acides aminées, qui seront alors puisés du milieu de culture. Quant à la voie des pentoses phosphates, nous montrons qu'elle est privilégiée au dépend de la glycolyse, afin d'augmenter la production de NADPH.

Ces différentes réorientations conduisent à une augmentation de la production de thiol libre et de NADPH. Or, ils sont tous deux connus pour être des molécules de défense contre les espèces réactives à l'oxygène ou contre la chélation des thiols. Notre hypothèse serait que ces deux stress seraient induits suite à l'augmentation du zinc intracellulaire que nous avons observée après un stress aux ZnO-NPs et ZnSO₄. Nous pensons qu'une fois dans la cellule, le zinc va se lier aux groupements thiols des acides aminés, provoquant une perte de fonction de certaines protéines ainsi qu'une diminution de la concentration du pool de thiols libres qui sont connu pour induire un stress oxydant. Une augmentation de l'activité enzymatique d'une enzyme antioxydante, la catalase, confirme cette observation. La réorientation métabolique a été observée uniquement avec les ZnO-NPs et ZnSO₄, aucune réorientation n'est observée suite à un stress aux TiO₂-NPs, même si le stress oxydatif semble également être induit.

Compte tenu des précédents résultats, concernant la formation de complexe entre l'argent et les groupements thiol, nous pourrions penser qu'un stress aux nanoparticules d'argent peut induire le même type de réponse cellulaire que les ZnO-NPs, suite à une diminution du pool de thiol-libre. Notre analyse du protéome intracellulaire de *Bacillus subtilis* après un stress aux Ag-NPs ne nous permet cependant pas de le confirmer. Les doses utilisées de Ag-NPs étant bien inférieures aux doses de ZnO-NPs, l'entrée d'ions métalliques

est moindre, et donc ce type de réponse cellulaire de *Bacillus subtilis* n'est peut-être pas induite ou pas détectable. Nous pouvons cependant imaginer qu'une exposition chronique de *Bacillus subtilis* aux nanoparticules d'argent dans le sol, peut conduire à une augmentation de la concentration intracellulaire d'argent ionique, et donc à ce type de réponse bactérienne. Il serait donc intéressant de réaliser cette même expérience soit en utilisant des doses un peu plus élevées d'argent soit en réalisant des expériences sur des temps plus longs.

Induction des mécanismes de réponse au stress :

- La réponse stringente :

En plus de la réorientation du métabolisme, *Bacillus subtilis* réagit aux nanoparticules en induisant la réponse stringente (Article 3). Ces résultats ont été obtenus avec la souche 168 en culture liquide. La réponse stringente est un mécanisme mis en place le plus souvent lors de carence nutritionnelle, permettant la diminution de la synthèse d'ARN tout en augmentant la dégradation protéique. Son mécanisme est détaillé en partie 2 chapitre 2.6 de l'introduction. L'effecteur de la réponse stringente est le (p)ppGpp. Le (p)ppGpp est synthétisé par trois (p)ppGpp synthases : YjbM, YwaC et RelA. Il est dégradé par une hydrolase, RelA, qui est une (p)ppGpp synthétases et hydrolase.

Nous montrons dans cette étude une induction de cette réponse après un stress aux ZnO-NPs et au ZnSO₄. Nous observons une augmentation de l'expression protéique de YwaC ainsi qu'une augmentation de la production de (p)ppGpp après un stress aux ZnO-NPs et au ZnSO₄. Cette induction métabolique de la réponse stringente après un stress aux nanoparticules peut avoir de multiples conséquences. Celles-ci font suite à une diminution du GTP intracellulaire induite par la production de (p)ppGpp. En effet, de nombreux gènes sont activés par le GTP, les gènes dit iGTP, alors que d'autres sont inactivés par le GTP, principalement les gènes régulés par CodY. CodY est un répresseur transcriptionnel de nombreux gènes, activé par le GTP (Détaillé en partie 2 chapitre 2.6.3 de l'introduction) (Shivers & Sonenshein 2004; Handke et al. 2008). En considérant les différents rôles complexes et pas toujours totalement élucidés : de la réponse stringente et de CodY, nous pouvons nous demander si la réorientation du métabolisme central induite par un stress aux

ZnO-NPs et au ZnSO₄ n'est pas liée à l'induction de la réponse stringente, *via* une diminution du niveau basale de GTP par exemple.

- La compétence génétique et la sporulation :

Parmi les nombreux gènes réprimés par CodY, certains appartiennent à des mécanismes de réponse au stress comme la compétence génétique et la sporulation (Moses et al. 2012 ; Serron & Sonenshein 1996). L'utilisation d'une souche et d'un mode de culture (solide) proche des conditions environnementales nous a permis d'observer l'induction de ces deux mécanismes après un stress aux NPs.

Cette observation s'est faite suite à une analyse du protéome intracellulaire de *Bacillus subtilis*. Parmi les protéines dont l'expression était modifiée après un stress aux NPs, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux transporteurs (OppABCD et AppDFABC) en raison de leur expression différentielle observée suivant le type de nanoparticules. Nous avons observé, pour l'ensemble des protéines exprimées pour chacun des transporteurs, une augmentation de leur expression en présence de TiO₂-NPs, et une diminution en présence de ZnO-NPs et ZnSO₄.

Trois mécanismes sont connus pour être liés à l'expression de ces transporteurs : l'osmoprotection, la sporulation et la compétence génétique. Leur rôle dans l'osmoprotection est le transport de peptides contenant des prolines qui permettront de réguler l'osmolarité (Zapras et al. 2013). Concernant la sporulation et la compétence, les rôles de ces transporteurs sont d'intégrer des peptides signaux d'induction de la compétence et/ou de la sporulation (Détailé en partie 2 chapitre 2.7 de l'introduction) (Lazazzera et al. 1999; Koide & Hoch 1994). Ces trois pistes ont donc été étudiées.

Nous avons observé dans un premier temps un niveau de proline intracellulaire inchangé après un stress aux ZnO-NPs, ZnSO₄ et TiO₂-NPs, l'augmentation de ces transporteurs ne semble donc pas être une réponse à un stress osmotique. Concernant la sporulation, celle-ci est bien modifiée. Cependant, elle est augmentée dans tous les stress testés. Elle n'est donc pas corrélée aux modifications d'expression des transporteurs Opp et App qui sont augmentées uniquement après un stress au TiO₂-NPs. Cette augmentation de la sporulation en présence des ZnO-NPs et de ZnSO₄, n'est cependant pas surprenante au vu

des résultats observés dans notre précédente étude en milieu liquide. En effet, dans cette étude nous avons vu une induction de la réponse stringente après un stress aux ZnO-NPs et au ZnSO₄, un mécanisme de réponse au stress potentialisateur de la sporulation *via* l'inactivation de CodY. Il serait intéressant de tester l'induction de la sporulation après un stress à d'autres nanoparticules (comme les Ag-NPs par exemple) afin d'identifier si ce type de réponse comme la réponse à un stress oxydant, peut être généralisé pour toutes les nanoparticules métalliques. L'induction de la sporulation de *Bacillus subtilis* peut induire une modification de la sécrétion de molécules essentielles pour la rhizosphère. Comme pour les Ag-NPs, l'étude du sécrétome après un stress aux ZnO-NPs et TiO₂-NPs serait donc importante à évaluer, afin de mieux connaître l'impact et le devenir de ces nanoparticules dans l'environnement.

Enfin, le troisième mécanisme étudié suite à l'observation de ces modifications d'expressions des transporteurs Opp et App est la compétence génétique. En effet, le transporteur App est connu pour permettre l'entrée d'une phéromone d'induction de la compétence : le CSF (Détailé en partie 2 chapitre 2.7 de l'introduction). Notre étude montre une augmentation de la compétence génétique après un stress aux ZnO-NPs et au ZnSO₄, et une diminution de la compétence après un stress aux TiO₂-NPs. Cette observation est surprenante car elle est inversement corrélée à l'expression des transporteurs Opp et App. En effet, lorsque les transporteurs Opp sont diminués, la compétence augmente, alors que lorsque qu'ils sont augmentés elle diminue. Cependant, de nombreux autres mécanismes sont impliqués dans la régulation de la compétence. Nous pouvons citer notamment, le régulateur CodY inhibé dans notre précédente étude en présence de ZnO-NP et ZnSO₄, après induction de la réponse stringente.

Cette induction de la compétence après un stress aux nanoparticules peut avoir d'importantes conséquences écologiques, agricoles et sanitaires. En effet, le transfert horizontal de gènes est connu pour être un problème de santé publique majeur en raison des résistances aux antibiotiques qu'il apporte. Les nanoparticules étant utilisées dans de nombreux produits, les bactéries sont constamment exposées à celles-ci et donc peuvent voir leur capacité de transfert d'ADN augmentée. En plus de l'utilisation massive des antibiotiques en agriculture connue pour augmenter ce transfert d'ADN (Gillings 2017), la pollution de

l'environnement par les nanoparticules peut accroître encore plus le nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques. De plus, d'un point de vue environnemental, cette induction de la compétence peut conduire à une modification de l'équilibre microbiologique des différents écosystèmes, rendant certaines espèces bactériennes plus résistantes au profit d'autres espèces.

Ce mode de culture en milieu solide nous a permis de mettre en évidence l'induction d'une réponse cellulaire de *Bacillus subtilis* différente de celle observée en milieu liquide après un stress aux ZnO-NPs. Nous montrons non seulement la modification de l'expression de protéines impliquées dans de nombreux mécanismes, comme la compétence et la sporulation, mais aussi dans d'autres mécanismes qui sont encore en cours de validation. La littérature recense essentiellement des études de toxicité des nanoparticules sur des bactéries cultivées en milieu liquide, l'utilisation d'un mode de culture en milieu solide, qui permet à *Bacillus subtilis* de former un biofilm, pourrait permettre la mise en évidence de l'induction de nombreux autres mécanismes suite à un stress aux NPs. Nous pourrions appliquer la même stratégie dans le cas des Ag-NPs, qui partagent certaines caractéristiques avec les ZnO-NPs (dissolution, affinité pour le soufre, charge).

Ce mode de culture ne permet cependant pas d'étudier des modifications du sécrétome de *Bacillus subtilis* après un stress aux NPs, comme nous l'avons fait pour les nanoparticules d'argent (résultat non présenté). En effet, une étude du sécrétome de *Bacillus subtilis* par protéomique après un stress aux Ag-NPs que nous avons réalisée (non présentée ici) et qui doit être validée, montre une modification de l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres ramifiés de la paroi des végétaux. Les nanoparticules, en modifiant le sécrétome de *Bacillus subtilis*, peuvent donc avoir une influence sur tout l'écosystème dont la croissance des plantes.

Conclusion Générale et perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse était non seulement d'analyser les effets toxicologiques des nanoparticules sur *Bacillus subtilis*, mais également d'analyser les effets de cette même bactérie sur la biodisponibilité des nanoparticules dans le sol. Tout ceci dans le but de mieux comprendre l'impact environnemental du rejet des nanoparticules dans l'environnement. Les différentes nanoparticules sélectionnées pour cette étude étaient les nanoparticules d'oxyde de zinc, de dioxyde de titane et d'argent. Ce sont toutes les trois des nanoparticules métalliques, qui sont utilisées dans de nombreux domaines d'application. Suite à leurs nombreuses utilisations, ces nanoparticules s'accumulent dans les compartiments environnementaux et en particulier les sols agricoles, où leur impact ainsi que leur devenir sont mal connus. Une fois dans les sols, les nanoparticules seront en interaction avec de nombreux microorganismes comme *Bacillus subtilis*. La résultante de ces interactions est multiple, elle peut conduire à une perturbation métabolique des bactéries ainsi qu'à des modifications de la biodisponibilité des nanoparticules dans le sol.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont révélé des modifications physicochimiques des nanoparticules suite à un contact avec *Bacillus subtilis*. Ces modifications vont de l'agglomération et de la dissolution à de la sulfuration des nanoparticules. Une sulfuration qui semble être entre autres la conséquence d'une interaction entre les protéines à groupement thiol et les nanoparticules d'argent. La sulfuration est connue pour diminuer la toxicité des nanoparticules, cependant de nombreuses questions restent en suspens : quelle est la stabilité des nanoAg₂S dans l'environnement, et leur toxicité ? L'Ag₂S ne constituerait-il pas un pool partiellement biodisponible, exposant ainsi chroniquement les organismes à l'argent ? Pour répondre à ces questions, il serait pertinent de réaliser des études de toxicologie sur les nanoparticules d'argent sulfurées par un microorganisme comme *Bacillus subtilis*, une sulfuration bien différente de la sulfuration que nous avons réalisée dans cette étude par incubation avec du Na₂S, mais bien plus proche de la sulfuration

environnementale. Il serait également intéressant d'utiliser des temps d'exposition plus longs (> 48h) afin de mimer les expositions plus longues du sol.

Un autre phénomène observé dans cette étude, qui peut influencer sur la toxicité des nanoparticules dans le sol reste également à évaluer. C'est la possibilité d'interaction entre les molécules sécrétées par une bactérie du sol et les nanoparticules. En effet, dans notre étude, nous avons observé des interactions entre les nanoparticules et les protéines à groupement thiols mais également avec le poly- γ -glutamate, tous deux sécrétés par *Bacillus subtilis*. Ces différentes interactions peuvent influencer non seulement la biodisponibilité des nanoparticules dans le sol mais également perturber les fonctions essentielles de ces molécules pour la rhizosphère. Pour exemple le γ -PGA qui est connu pour aider les plantes à assimiler leurs nutriments et donc pour améliorer leur biomasse, une interaction entre celui-ci et les NPs pourrait perturber cette fonction. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que le complexe γ -PGA -NP peut conduire à une assimilation augmentée des nanoparticules par la plante, qui serait ensuite un point d'entrée des nanoparticules dans la chaîne alimentaire. Afin de mieux évaluer l'impact de l'interaction γ -PGA -NP, nous pourrions étudier l'assimilation des nutriments par la plante ainsi que la croissance de ses racines (comme dans l'étude de Zhang, Chen, et al. 2017) après une exposition au γ -PGA seul ou au γ -PGA -NP. Il serait également intéressant d'évaluer l'assimilation des nanoparticules par la plante après une exposition aux NPs ou aux γ -PGA -NPs.

Enfin la particularité observée dans cette étude est la formation d'une couche d'Ag₂S après un contact avec les molécules sécrétées par *Bacillus subtilis*. Ce type de nanoparticules cœur-coquille Ag-Ag₂S pourrait être un élément intéressant pour les industriels. Les nanoparticules d'argent sont actuellement utilisées en industrie avec des concentrations très importantes, en raison d'une perte rapide de l'argent après lavage. Notre hypothèse serait que ces nanoparticules cœur-coquille Ag-Ag₂S pourraient être un bon compromis entre la toxicité et la stabilité des nanoparticules d'argent utilisées en industrie. Il serait donc intéressant de tester la dissolution ionique de ces nanoparticules, ainsi que leur activité antibactérienne.

La deuxième partie de ma thèse avait pour but d'analyser l'impact des nanoparticules, plus particulièrement du TiO₂-NPs et ZnO-NPs, sur *Bacillus subtilis*. Dans le but d'aller plus

loin que la majorité des études de toxicologie réalisées jusqu'à présent, qui montrent essentiellement l'induction d'une mort cellulaire par les nanoparticules suite à un stress oxydatif, nous avons choisi d'utiliser une approche de type protéomique.

Notre première analyse du protéome intracellulaire après exposition de *Bacillus subtilis* aux ZnO-NPs en milieu liquide a permis de révéler l'induction de plusieurs mécanismes d'adaptation par *Bacillus subtilis*. Le premier identifié est la réorientation de son métabolisme central. Tout ceci au profit de la production de NADPH et de thiol libre, dans le but de se défendre contre un stress oxydant et/ou contre la chélation des thiols. Le second mécanisme observé comme induit après un stress aux ZnO-NPs et ZnSO₄ est la réponse stringente. L'impact de l'induction de ce type de réponse n'est pas complètement connu, elle semble cependant être liée à l'induction d'autres mécanismes de défense comme la sporulation ou la compétence génétique, qui ont en effet été vu comme induit dans la seconde partie de cette étude. Nous montrons dans cette étude que l'approche protéomique permet d'identifier les mécanismes mis en place par *Bacillus subtilis* pour répondre à un stress aux nanoparticules. Nous pourrions réaliser ce même type d'approche pour étudier la toxicité envers *Bacillus subtilis* d'autres nanoparticules rejetées dans le sol (exp : CeO₂-NPs, Fe et Fe oxydé -NPs).

Notre seconde approche dans cette étude était de s'approcher des conditions environnementales. Pour cela nous avons choisi d'utiliser une souche proche de la souche environnementale (3610) afin de réaliser une exposition aux nanoparticules sur un biofilm de *Bacillus subtilis*. Ce type d'approche a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes de réponses aux stress non observés en milieu liquide avec la souche 168 comme l'induction de la compétence après un stress aux ZnO-NPs et une sporulation après un stress aux ZnO-NPs et TiO₂-NPs. Ces modifications, outre leur influence sur la croissance de *Bacillus subtilis* dans le sol, peuvent avoir de réels impacts écologiques et sanitaires. En effet, l'échange d'ADN permet aux bactéries de faire évoluer leur génome, ce qui peut avoir de multiples conséquences tels que : l'apparition de nouvelles bactéries résistantes aux antibiotiques ou la perturbation de l'équilibre microbiologique du sol suite à l'apparition de certaines espèces bactériennes résistantes à notre pollution en nanoparticules au détriment d'autres espèces.

Ces études montrent l'influence du milieu d'exposition, ainsi que de la souche bactérienne utilisée, sur la réponse bactérienne après un stress aux nanoparticules. Nous pouvons donc penser que notre analyse du protéome intracellulaire de *Bacillus subtilis* après une exposition aux nanoparticules d'argent en milieu liquide, qui a été vu comme inchangé malgré la toxicité connue de l'argent, pourrait donner des résultats différents si elle avait été réalisée en milieu solide.

Cette étude révèle l'importance de bien considérer les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules ainsi que les modes de cultures choisis afin d'être au plus près des conditions environnementales. Pour conclure, nous montrons dans cette étude l'intérêt d'étudier à la fois l'impact des *Bacillus subtilis* sur la biodisponibilité des nanoparticules dans le sol et également l'impact de ces mêmes nanoparticules sur le métabolisme de *Bacillus subtilis*, les deux étant fortement liés.

Références bibliographiques

- Adams LK, Lyon DY & Alvarez PJJ (2006) Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res.* 40, 3527–3532.
- Agnihotri S, Mukherji S & Mukherji S (2014) Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* 4, 3974–3983.
- Allen BL, Kichambare PD, Gou P, Vlasova II, Kapralov AA, Konduru N, Kagan VE & Star A (2008) Biodegradation of Single-Walled Carbon Nanotubes through Enzymatic Catalysis. *Nano Lett.* 8, 3899–3903.
- Anas A, Jiya J, Rameez M j., Anand P b., Anantharaman M r. & Nair S (2013) Sequential interactions of silver–silica nanocomposite (Ag–SiO₂NC) with cell wall, metabolism and genetic stability of *Pseudomonas aeruginosa*, a multiple antibiotic-resistant bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 57–62.
- Anderl JN, Zahller J, Roe F & Stewart PS (2003) Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1251–1256.
- Angel BM, Batley GE, Jarolimek CV & Rogers NJ (2013) The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere* 93, 359–365.
- Anon Dynamic Light Scattering - OpenStax CNX. Available at: <http://cnx.org/contents/3fc98dad-934d-45e6-a19f-c0a1cf440d43@2/Dynamic-Light-Scattering> [Accessed August 24, 2017].
- Antisari LV, Carbone S, Gatti A, Vianello G & Nannipieri P (2015) Uptake and translocation of metals and nutrients in tomato grown in soil polluted with metal oxide (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂, TiO₂) or metallic (Ag, Co, Ni) engineered nanoparticles. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 1841–1853.
- Arroyo-de Dompablo ME, Morales-García A & Taravillo M (2011) DFT+U calculations of crystal lattice, electronic structure, and phase stability under pressure of TiO₂ polymorphs. *J. Chem. Phys.* 135, 054503.
- Ashiuchi M (2011) Analytical approaches to poly-γ-glutamate: quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 879, 3096–3101.
- Ashiuchi M (2013) Microbial production and chemical transformation of poly-γ-glutamate. *Microb. Biotechnol.* 6, 664–674.
- Ashiuchi M, Kamei T, Baek DH, Shin SY, Sung MH, Soda K, Yagi T & Misono H (2001) Isolation of *Bacillus subtilis* (chungkookjang), a poly-gamma-glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 764–769.
- Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS & Memic A (2012) Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int. J. Nanomedicine* 7, 6003–6009.
- Baek Y-W & An Y-J (2011) Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Sci. Total Environ.* 409, 1603–1608.

- Bajaj I & Singhal R (2011) Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresour. Technol.* 102, 5551–5561.
- Bandyopadhyay S, Plascencia-Villa G, Mukherjee A, Rico CM, José-Yacamán M, Peralta-Videa JR & Gardea-Torresdey JL (2015) Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Sci. Total Environ.* 515–516, 60–69.
- Banerjee S, Show B, Kundu A, Ganguly J, Gangopadhyay U, Saha H & Mukherjee N (2016) N-acetylcysteine assisted synthesis of core-shell Ag₂S with enhanced light transmission and diminished reflectance: Surface modifier for c-SiNx solar cells. *J. Ind. Eng. Chem.* 40, 54–61.
- Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ & Henriques AO (2005) Screening for bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 968–978.
- Bates LS, Waldren RP & Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Beaman TC, Hitchins AD, Ochi K, Vasantha N, Endo T & Freese E (1983) Specificity and control of uptake of purines and other compounds in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 156, 1107–1117.
- Becking LGMB, Kaplan IR & Moore D (1960) Limits of the Natural Environment in Terms of pH and Oxidation-Reduction Potentials. *J. Geol.* 68, 243–284.
- Belitsky BR & Sonenshein AL (2013) Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* CodY-binding sites at single-nucleotide resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7026–7031.
- Bennett HE, Peck RL, Burge DK & Bennett JM (1969) Formation and Growth of Tarnish on Evaporated Silver Films. *J. Appl. Phys.* 40, 3351–3360.
- Bhattacharyya D, Hestekin JA, Brushaber P, Cullen L, Bachas LG & Sikdar SK (1998) Novel poly-glutamic acid functionalized microfiltration membranes for sorption of heavy metals at high capacity. *J. Membr. Sci.* 141, 121–135.
- Bielmyer GK, Brix KV & Grosell M (2008) Is Cl⁻ protection against silver toxicity due to chemical speciation? *Aquat. Toxicol.* 87, 81–87.
- Bodnár M, Kjøniksen A-L, Molnár RM, Hartmann JF, Daróczy L, Nyström B & Borbély J (2008) Nanoparticles formed by complexation of poly-gamma-glutamic acid with lead ions. *J. Hazard. Mater.* 153, 1185–1192.
- Bondarenko O, Ivask A, Käkkinen A, Kurvet I & Kahru A (2013) Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *PLOS ONE* 8, e64060.
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D & Oberdorster E (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part. Fibre Toxicol.* 3, 11.
- Bowden SD, Eyres A, Chung JCS, Monson RE, Thompson A, Salmond GPC, Spring DR & Welch M (2013) Virulence in *Pectobacterium atrosepticum* is regulated by a coincidence circuit involving quorum sensing and the stress alarmone, (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* 90, 457–471.

- Branda SS, González-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R & Kolter R (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11621–11626.
- Buff CE, Bollinger DW, Eilersieck MR, Brommelsiek WA & Veum TL (2005) Comparison of growth performance and zinc absorption, retention, and excretion in weanling pigs fed diets supplemented with zinc-polysaccharide or zinc oxide. *J. Anim. Sci.* 83, 2380–2386.
- Caballero-Guzman A & Nowack B (2016) A critical review of engineered nanomaterial release data: Are current data useful for material flow modeling? *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 213, 502–517.
- Cabiscol E, Tamarit J & Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 3, 3–8.
- Cai W, Zhong H & Zhang L (1998) Optical measurements of oxidation behavior of silver nanometer particle within pores of silica host. *J. Appl. Phys.* 83, 1705–1710.
- Callaghan NI & MacCormack TJ (2017) Ecophysiological perspectives on engineered nanomaterial toxicity in fish and crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 193, 30–41.
- Candela T & Fouet A (2006) Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol. Microbiol.* 60, 1091–1098.
- Cashel M & Gallant J (1969) Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* 221, 838–841.
- Castillo-Michel HA, Larue C, Pradas Del Real AE, Cotte M & Sarret G (2017) Practical review on the use of synchrotron based micro- and nano- X-ray fluorescence mapping and X-ray absorption spectroscopy to investigate the interactions between plants and engineered nanomaterials. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 110, 13–32.
- Cazorla F m., Romero D, Pérez-García A, Lugtenberg B j. j., Vicente A de & Bloemberg G (2007) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1950–1959.
- Ceragioli M, Mols M, Moezelaar R, Ghelardi E, Senesi S & Abee T (2010) Comparative Transcriptomic and Phenotypic Analysis of the Responses of *Bacillus cereus* to Various Disinfectant Treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3352–3360.
- Chen I, Christie PJ & Dubnau D (2005) The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria. *Science* 310, 1456–1460.
- Chen I & Dubnau D (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 241–249.
- Chevallet M, Luche S & Rabilloud T (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* 1, 1852–1858.
- Chi BK, Gronau K, Mäder U, Hessling B, Becher D & Antelmann H (2011) S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10, M111.009506.

- Choi O, Deng KK, Kim N-J, Ross L, Surampalli RY & Hu Z (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 42, 3066–3074.
- Chughtai K & Heeren RMA (2010) Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. *Chem. Rev.* 110, 3237–3277.
- Comella N & Grossman AD (2005) Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 57, 1159–1174.
- Cox A, Venkatachalam P, Sahi S & Sharma N (2017) Reprint of: Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 110, 33–49.
- Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS & Yadav V (2016) Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front. Microbiol.* 7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5110546/> [Accessed April 7, 2017].
- Dastjerdi R & Montazer M (2010) A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 79, 5–18.
- Dean JA (1998) *Lange's Handbook of Chemistry* 15 edition., New York, NY: McGraw-Hill Professional.
- Dimkpa CO (2014) Can nanotechnology deliver the promised benefits without negatively impacting soil microbial life? *J. Basic Microbiol.* 54, 889–904.
- Ding C, Pan J, Jin M, Yang D, Shen Z, Wang J, Zhang B, Liu W, Fu J, Guo X, Wang D, Chen Z, Yin J, Qiu Z & Li J (2016) Enhanced uptake of antibiotic resistance genes in the presence of nanoalumina. *Nanotoxicology* 10, 1051–1060.
- Diz AP, Martínez-Fernández M & Rolán-Alvarez E (2012) Proteomics in evolutionary ecology: linking the genotype with the phenotype. *Mol. Ecol.* 21, 1060–1080.
- Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Zarrintan MH & Adibkia K (2014) Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 44, 278–284.
- Dowds BC (1994) The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 255–263.
- Dror-Ehre A, Mamane H, Belenkova T, Markovich G & Adin A (2009) Silver nanoparticle-E. coli colloidal interaction in water and effect on E. coli survival. *J. Colloid Interface Sci.* 339, 521–526.
- Drysdale M, Heninger S, Hutt J, Chen Y, Lyons CR & Koehler TM (2005) Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *EMBO J.* 24, 221–227.
- Dubnau D & Provvedi R (2000) Internalizing DNA. *Res. Microbiol.* 151, 475–480.

- Durán N, Durán M, Jesus MB de, Seabra AB, Fávaro WJ & Nakazato G (2016a) Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 12, 789–799.
- Durán N, Durán M, Jesus MB de, Seabra AB, Fávaro WJ & Nakazato G (2016b) Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 12, 789–799.
- Dutta S, Shome A, Kar T & Das PK (2011) Counterion-Induced Modulation in the Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Amphiphilic Hydrogelators: Influence of in-Situ-Synthesized Ag–Nanoparticle on the Bactericidal Property. *Langmuir* 27, 5000–5008.
- Earl AM, Losick R & Kolter R (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 16, 269–275.
- Eiamphungporn W & Helmann JD (2008) The *Bacillus subtilis* σ^M Regulon and its Contribution to Cell Envelope Stress Responses. *Mol. Microbiol.* 67, 830–848.
- Eide DJ (2014) Bacillithiol, a new role in buffering intracellular zinc. *Mol. Microbiol.* 94, 743–746.
- El Badawy AM, Scheckel KG, Suidan M & Tolaymat T (2012) The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 429, 325–331.
- El Badawy AM, Silva RG, Morris B, Scheckel KG, Suidan MT & Tolaymat TM (2011) Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 283–287.
- Elzey S & Grassian VH (2010) Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. *J. Nanoparticle Res.* 12, 1945–1958.
- Errington J (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 117–126.
- Esterbauer H, Schaur RJ & Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81–128.
- Eymann C, Homuth G, Scharf C & Hecker M (2002) *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 184, 2500–2520.
- Eymann C, Mittenhuber G & Hecker M (2001) The stringent response, sigmaH-dependent gene expression and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 264, 913–923.
- Eymard-Vernain E, Lelong C, Pradas del Real A-E, Soulas R, Bureau S, Tardillo Suarez V, Gallet B, Proux O, Castillo M & Sarret G Impact of a model soil microorganism and of its secretome on the fate of silver nanoparticles.
- Fabrega J, Fawcett SR, Renshaw JC & Lead JR (2009) Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7285–7290.
- Fabrega J, Renshaw JC & Lead JR (2009) Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9004–9009.

- Fall R, Kinsinger RF & Wheeler KA (2004) A simple method to isolate biofilm-forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 372–379.
- Fan R, Huang YC, Grusak MA, Huang CP & Sherrier DJ (2014) Effects of nano-TiO₂ on the agronomically-relevant *Rhizobium*–legume symbiosis. *Sci. Total Environ.* 466–467, 503–512.
- Fang J, Lyon DY, Wiesner MR, Dong J & Alvarez PJJ (2007) Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2636–2642.
- Fang J, Shan X, Wen B, Lin J & Owens G (2009) Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 157, 1101–1109.
- Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, Gadd GE & Casey PS (2007) Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8484–8490.
- Freyre-González JA, Manjarrez-Casas AM, Merino E, Martínez-Núñez M, Pérez-Rueda E & Gutiérrez-Ríos R-M (2013) Lessons from the modular organization of the transcriptional regulatory network of *Bacillus subtilis*. *BMC Syst. Biol.* 7, 127.
- Fröhlich EE & Fröhlich E (2016) Cytotoxicity of Nanoparticles Contained in Food on Intestinal Cells and the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 509.
- Fuangthong M, Atichartpongkul S, Mongkolsuk S & Helmann JD (2001) OhrR Is a Repressor of ohrA, a Key Organic Hydroperoxide Resistance Determinant in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 4134–4141.
- Fujishima A & Honda K (1972) Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature* 238, 37–38.
- Gaballa A, Newton GL, Antelmann H, Parsonage D, Upton H, Rawat M, Claiborne A, Fahey RC & Helmann JD (2010) Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in *Bacilli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6482–6486.
- Gambino M, Marzano V, Villa F, Vitali A, Vannini C, Landini P & Cappitelli F (2015) Effects of sublethal doses of silver nanoparticles on *Bacillus subtilis* planktonic and sessile cells. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1103–1115.
- Geiger T, Francois P, Liebeke M, Fraunholz M, Goerke C, Krismer B, Schrenzel J, Lalk M & Wolz C (2012) The stringent response of *Staphylococcus aureus* and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. *PLoS Pathog.* 8, e1003016.
- Geiger T & Wolz C (2014) Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 304, 150–155.
- Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS & Mische SM (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601–605.

- Gianazza E, Celentano F, Magenes S, Ettori C & Righetti PG (1989) Formulations for immobilized pH gradients including pH extremes. *Electrophoresis* 10, 806–808.
- Gilbert HF (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63, 69–172.
- Gillings MR (2017) Lateral gene transfer, bacterial genome evolution, and the Anthropocene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1389, 20–36.
- Glish GL & Vachet RW (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 140–150.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R & Weiss W (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037–1053.
- Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW & Nowack B (2009) Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9216–9222.
- Gottschalk F, Sun T & Nowack B (2013) Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 181, 287–300.
- Guirola M, Jiménez-Martí E & Atrian S (2014) On the molecular relationships between high-zinc tolerance and aconitase (Aco1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Met. Integr. Biometal Sci.* 6, 634–645.
- Gunawan C, Teoh WY, Marquis CP, Lafia J & Amal R (2009) Reversible Antimicrobial Photoswitching in Nanosilver. *Small* 5, 341–344.
- Hachicho N, Hoffmann P, Ahlert K & Heipieper HJ (2014) Effect of silver nanoparticles and silver ions on growth and adaptive response mechanisms of *Pseudomonas putida* mt-2. *FEMS Microbiol. Lett.* 355, 71–77.
- Hahn J, Bylund J, Haines M, Higgins M & Dubnau D (1995) Inactivation of *mecA* prevents recovery from the competent state and interferes with cell division and the partitioning of nucleoids in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 18, 755–767.
- Hahne H, Mäder U, Otto A, Bonn F, Steil L, Bremer E, Hecker M & Becher D (2010) A Comprehensive Proteomics and Transcriptomics Analysis of *Bacillus subtilis* Salt Stress Adaptation. *J. Bacteriol.* 192, 870–882.
- Hakumai Y, Oike S, Shibata Y & Ashiuchi M (2016) Cooperative adsorption of critical metal ions using archaeal poly-γ-glutamate. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 29, 527–534.
- Hamoen LW, Eshuis H, Jongbloed J, Venema G & van Sinderen D (1995) A small gene, designated *comS*, located within the coding region of the fourth amino acid-activation domain of *srfA*, is required for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 15, 55–63.
- Hamoen LW, Kausche D, Marahiel MA, van Sinderen D, Venema G & Serrão P (2003) The *Bacillus subtilis* transition state regulator *AbrB* binds to the –35 promoter region of *comK*. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 299–304.

- Hamoen LW, Van Werkhoven AF, Venema G & Dubnau D (2000) The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9246–9251.
- Hamoen LW, Venema G & Kuipers OP (2003) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* 149, 9–17.
- Handke LD, Shivers RP & Sonenshein AL (2008) Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *J. Bacteriol.* 190, 798–806.
- Hecker M, Reder A, Fuchs S, Pagels M & Engelmann S (2009) Physiological proteomics and stress/starvation responses in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Res. Microbiol.* 160, 245–258.
- Helmann JD (2011) Bacillithiol, a new player in bacterial redox homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 123–133.
- Herbig AF & Helmann JD (2001) Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.* 41, 849–859.
- Hoa TT, Tortosa P, Albano M & Dubnau D (2002) Rok (YkuW) regulates genetic competence in *Bacillus subtilis* by directly repressing comK. *Mol. Microbiol.* 43, 15–26.
- Hochgräfe F, Mostertz J, Pöther D-C, Becher D, Helmann JD & Hecker M (2007) S-cysteinylation is a general mechanism for thiol protection of *Bacillus subtilis* proteins after oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 282, 25981–25985.
- Hoffmann MR, Martin ST, Choi W & Bahnemann DW (1995) Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis. *Chem. Rev.* 95, 69–96.
- Holden PA, Gardea-Torresdey JL, Klaessig F, Turco RF, Mortimer M, Hund-Rinke K, Cohen Hubal EA, Avery D, Barceló D, Behra R, Cohen Y, Deydier-Stephan L, Ferguson PL, Fernandes TF, Herr Harthorn B, Henderson WM, Hoke RA, Hristozov D, Johnston JM, Kane AB, Kapustka L, Keller AA, Lenihan HS, Lovell W, Murphy CJ, Nisbet RM, Petersen EJ, Salinas ER, Scheringer M, Sharma M, Speed DE, Sultan Y, Westerhoff P, White JC, Wiesner MR, Wong EM, Xing B, Steele Horan M, Godwin HA & Nel AE (2016) Considerations of Environmentally Relevant Test Conditions for Improved Evaluation of Ecological Hazards of Engineered Nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 50, 6124–6145.
- Holden PA, Schimel JP & Godwin HA (2014) Five reasons to use bacteria when assessing manufactured nanomaterial environmental hazards and fates. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 73–78.
- Hollanda LM, Cury GC, Pereira RF, Ferreira GA, Sousa A, Sousa EM & Lancellotti M (2011) Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation. *J. Nanobiotechnology* 9, 28.
- Holt KB & Bard AJ (2005) Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 13214–13223.

- de Hoon MJL, Eichenberger P & Vitkup D (2010) Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr. Biol. CB* 20, R735-745.
- Hsieh C-Y, Tsai S-P, Wang D-M, Chang Y-N & Hsieh H-J (2005) Preparation of γ -PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials* 26, 5617–5623.
- Hsueh Y-H, Ke W-J, Hsieh C-T, Lin K-S, Tzou D-Y & Chiang C-L (2015) ZnO Nanoparticles Affect *Bacillus subtilis* Cell Growth and Biofilm Formation. *PLOS ONE* 10, e0128457.
- Hsueh Y-H, Lin K-S, Ke W-J, Hsieh C-T, Chiang C-L, Tzou D-Y & Liu S-T (2015) The Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles in *Bacillus subtilis* Are Mediated by Released Ag⁺ Ions. *PloS One* 10, e0144306.
- Inamine GS & Dubnau D (1995) ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J. Bacteriol.* 177, 3045–3051.
- Inaoka T & Ochi K (2002) RelA Protein Is Involved in Induction of Genetic Competence in Certain *Bacillus subtilis* Strains by Moderating the Level of Intracellular GTP. *J. Bacteriol.* 184, 3923–3930.
- Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K & Okabe S (2009) Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4093–4100.
- Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, Vija H, Kärkinen A, Titma T, Heinlaan M, Visnapuu M, Koller D, Kisand V & Kahru A (2014) Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro. *PLoS ONE* 9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4105572/> [Accessed January 19, 2017].
- Jakobs M & Meinhardt F (2015) What renders Bacilli genetically competent? A gaze beyond the model organism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1557–1570.
- James P (1997) Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q. Rev. Biophys.* 30, 279–331.
- James P, Quadroni M, Carafoli E & Gonnet G (1993) Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 58–64.
- Jiang J, Oberdörster G & Biswas P (2009) Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.* 11, 77–89.
- Johnston HL, Cuta F & Garrett AB (1933) The Solubility of Silver Oxide in Water, in Alkali and in Alkaline Salt Solutions. The Amphoteric Character of Silver Hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 55, 2311–2325.
- Joyce J, Cook J, Chabot D, Hepler R, Shoop W, Xu Q, Stambaugh T, Aste-Amezaga M, Wang S, Indrawati L, Bruner M, Friedlander A, Keller P & Caulfield M (2006) Immunogenicity and Protective Efficacy of *Bacillus anthracis* Poly- γ -D-glutamic Acid Capsule Covalently Coupled to a Protein Carrier Using a Novel Triazine-based Conjugation Strategy. *J. Biol. Chem.* 281, 4831–4843.

- Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH & Park YH (2008) Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2171–2178.
- Kaegi R, Ulrich A, Sinnet B, Vonbank R, Wichser A, Zuleeg S, Simmler H, Brunner S, Vonmont H, Burkhardt M & Boller M (2008) Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 156, 233–239.
- Kaegi R, Voegelin A, Ort C, Sinnet B, Thalmann B, Krismer J, Hagendorfer H, Elumelu M & Mueller E (2013) Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water Res.* 47, 3866–3877.
- Kaegi R, Voegelin A, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Burkhardt M & Siegrist H (2011) Behavior of Metallic Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3902–3908.
- Karp NA, McCormick PS, Russell MR & Lilley KS (2007) Experimental and statistical considerations to avoid false conclusions in proteomics studies using differential in-gel electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 6, 1354–1364.
- Kasahara M & Anraku Y (1974) Succinate- and NADH oxidase systems of *Escherichia coli* membrane vesicles. Mechanism of selective inhibition of the systems by zinc ions. *J. Biochem. (Tokyo)* 76, 967–976.
- Kearns DB & Losick R (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49, 581–590.
- Kelessidis A & Stasinakis AS (2012) Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Manag.* 32, 1186–1195.
- Keller AA, McFerran S, Lazareva A & Suh S (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 15, 1692.
- Kempf B & Bremer E (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 270, 16701–16713.
- Khalil IR, Burns ATH, Radecka I, Kowalczyk M, Khalaf T, Adamus G, Johnston B & Khechara MP (2017) Bacterial-Derived Polymer Poly- γ -Glutamic Acid (γ -PGA)-Based Micro/Nanoparticles as a Delivery System for Antimicrobials and Other Biomedical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Khan SS, Mukherjee A & Chandrasekaran N (2011) Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 87, 129–138.
- Khan SS, Srivatsan P, Vaishnavi N, Mukherjee A & Chandrasekaran N (2011) Interaction of silver nanoparticles (SNPs) with bacterial extracellular proteins (ECPs) and its adsorption isotherms and kinetics. *J. Hazard. Mater.* 192, 299–306.
- Kim B, Park C-S, Murayama M & Hochella MF (2010) Discovery and Characterization of Silver Sulfide Nanoparticles in Final Sewage Sludge Products. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7509–7514.

- Kim SH, Lee HS, Ryu DS, Choi SJ & Lee DS (2011) Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=KR2012001109> [Accessed August 12, 2017].
- Kim SW & An Y-J (2012) Effect of ZnO and TiO₂ nanoparticles preilluminated with UVA and UVB light on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 243–253.
- Kim SW, Baek Y-W & An Y-J (2011) Assay-dependent effect of silver nanoparticles to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 1045–1052.
- Kimura K, Tran L-SP & Itoh Y (2004) Roles and regulation of the glutamate racemase isogenes, *racE* and *yrcC*, in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 150, 2911–2920.
- Kocianova S, Vuong C, Yao Y, Voyich JM, Fischer ER, DeLeo FR & Otto M (2005) Key role of poly- γ -dl-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest.* 115, 688–694.
- Koide A & Hoch JA (1994) Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation. *Mol. Microbiol.* 13, 417–426.
- Koide A, Perego M & Hoch JA (1999) *ScoC* regulates peptide transport and sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 4114–4117.
- Konkol MA, Blair KM & Kearns DB (2013) Plasmid-encoded *ComI* inhibits competence in the ancestral 3610 strain of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 195, 4085–4093.
- Kora AJ & Sashidhar RB Biogenic silver nanoparticles synthesized with rhamnogalacturonan gum: Antibacterial activity, cytotoxicity and its mode of action. *Arab. J. Chem.* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214002482> [Accessed April 7, 2017].
- Krásný L & Gourse RL (2004) An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J.* 23, 4473–4483.
- Krásný L, Tišerová H, Jonák J, Rejman D & Šanderová H (2008) The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 69, 42–54.
- Kriel A, Bittner AN, Kim SH, Liu K, Tehranchi AK, Zou WY, Rendon S, Chen R, Tu BP & Wang JD (2012) Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)ppGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance. *Mol. Cell* 48, 231–241.
- Kriel A, Brinsmade SR, Tse JL, Tehranchi AK, Bittner AN, Sonenshein AL & Wang JD (2014) GTP dysregulation in *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp results in phenotypic amino acid auxotrophy and failure to adapt to nutrient downshift and regulate biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 196, 189–201.
- Kvítek L, Panáček A, Soukupová J, Kolář M, Večeřová R, Pruček R, Holecová M & Zbořil R (2008) Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* 112, 5825–5834.

- Lara HH, Garza-Treviño EN, Ixtapan-Turrent L & Singh DK (2011) Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J. Nanobiotechnology* 9, 30.
- Larue C, Castillo-Michel H, Sobanska S, Cécillon L, Bureau S, Barthès V, Ouerdane L, Carrière M & Sarret G (2014) Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J. Hazard. Mater.* 264, 98–106.
- Larue C, Castillo-Michel H, Sobanska S, Trcera N, Sorieul S, Cécillon L, Ouerdane L, Legros S & Sarret G (2014) Fate of pristine TiO₂ nanoparticles and aged paint-containing TiO₂ nanoparticles in lettuce crop after foliar exposure. *J. Hazard. Mater.* 273, 17–26.
- Lazazzera BA, Kurtser IG, McQuade RS & Grossman AD (1999) An Autoregulatory Circuit Affecting Peptide Signaling in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 5193–5200.
- Lazazzera BA, Solomon JM & Grossman AD (1997) An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell* 89, 917–925.
- LeDeaux JR, Solomon JM & Grossman AD (1997) Analysis of non-polar deletion mutations in the genes of the *spo0K* (*opp*) operon of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 63–69.
- Lee J-W, Soonsanga S & Helmann JD (2007) A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor *OhrR*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8743–8748.
- Lei P, Xu Z, Ding Y, Tang B, Zhang Y, Li H, Feng X & Xu H (2015) Effect of Poly(γ -glutamic acid) on the Physiological Responses and Calcium Signaling of Rape Seedlings (*Brassica napus* L.) under Cold Stress. *J. Agric. Food Chem.* 63, 10399–10406.
- Leichert LIO, Scharf C & Hecker M (2003) Global Characterization of Disulfide Stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185, 1967–1975.
- Lemire J, Mailloux R & Appanna VD (2008) Zinc toxicity alters mitochondrial metabolism and leads to decreased ATP production in hepatocytes. *J. Appl. Toxicol. JAT* 28, 175–182.
- Lemos JA, Nascimento MM, Lin VK, Abranches J & Burne RA (2008) Global regulation by (p)ppGpp and CodY in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 190, 5291–5299.
- Leonov AP, Zheng J, Clogston JD, Stern ST, Patri AK & Wei A (2008) Detoxification of Gold Nanorods by Treatment with Polystyrenesulfonate. *ACS Nano* 2, 2481–2488.
- Lerondel G, Doan T, Zamboni N, Sauer U & Aymerich S (2006) YtsJ has the major physiological role of the four paralogous malic enzyme isoforms in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 4727–4736.
- Levard C, Hotze EM, Colman BP, Dale AL, Truong L, Yang XY, Bone AJ, Brown GE, Tanguay RL, Di Giulio RT, Bernhardt ES, Meyer JN, Wiesner MR & Lowry GV (2013) Sulfidation of Silver Nanoparticles: Natural Antidote to Their Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13440–13448.
- Levard C, Hotze EM, Lowry GV & Brown GE (2012) Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6900–6914.
- Levard C, Reinsch BC, Michel FM, Oumahi C, Lowry GV & Brown GE (2011) Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution: Impact on Dissolution Rate. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5260–5266.

- Levdikov VM, Blagova EV, Brannigan JA, Wright L, Vagin AA & Wilkinson AJ (2005) The structure of the oligopeptide-binding protein, AppA, from *Bacillus subtilis* in complex with a nonapeptide. *J. Mol. Biol.* 345, 879–892.
- Li C, Yu DF, Newman RA, Cabral F, Stephens LC, Hunter N, Milas L & Wallace S (1998) Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. *Cancer Res.* 58, 2404–2409.
- Li M, Pokhrel S, Jin X, Mädler L, Damoiseaux R & Hoek EMV (2011) Stability, bioavailability, and bacterial toxicity of ZnO and iron-doped ZnO nanoparticles in aquatic media. *Environ. Sci. Technol.* 45, 755–761.
- Li M, Zhu L & Lin D (2011) Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1977–1983.
- Li X, Lenhart JJ & Walker HW (2010) Dissolution-Accompanied Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles. *Langmuir* 26, 16690–16698.
- Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A & Lubart R (2011) Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology* 22, 105101.
- Liu J & Hurt RH (2010) Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2169–2175.
- Liu J, Pennell KG & Hurt RH (2011) Kinetics and Mechanisms of Nanosilver Oxysulfidation. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7345–7353.
- Liu M, Huang G, Cong Y, Tong G, Lin Z, Yin Y & Zhang C (2015) The preparation and characterization of micelles from poly(γ -glutamic acid)-graft-poly(L-lactide) and the cellular uptake thereof. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26, 187.
- Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, Tam PK-H, Chiu J-F & Che C-M (2006) Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *J. Proteome Res.* 5, 916–924.
- Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, Tam PK-H, Chiu J-F & Che C-M (2007) Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 527–534.
- Lombi E, Donner E, Tavakkoli E, Turney TW, Naidu R, Miller BW & Scheckel KG (2012) Fate of Zinc Oxide Nanoparticles during Anaerobic Digestion of Wastewater and Post-Treatment Processing of Sewage Sludge. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9089–9096.
- Lopez D, Vlamakis H & Kolter R (2009) Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 152–163.
- Lopez JM, Dromerick A & Freese E (1981) Response of Guanosine 5'-Triphosphate Concentration to Nutritional Changes and Its Significance for *Bacillus subtilis* Sporulation. *J. Bacteriol.* 146, 605–613.

- Lorenz C, Windler L, von Goetz N, Lehmann RP, Schuppler M, Hungerbühler K, Heuberger M & Nowack B (2012) Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. *Chemosphere* 89, 817–824.
- Lowry GV, Gregory KB, Apte SC & Lead JR (2012) Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6893–6899.
- Lu J & Holmgren A (2014) The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 75–87.
- Luche S, Diemer H, Tastet C, Chevallet M, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E & Rabilloud T (2004) About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 4, 551–561.
- Luche S, Eymard-Vernain E, Diemer H, Van Dorsselaer A, Rabilloud T & Lelong C (2016) Zinc oxide induces the stringent response and major reorientations in the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *J. Proteomics* 135, 170–180.
- Luo YY, Xiong XY, Tian Y, Li ZL, Gong YC & Li YP (2016) A review of biodegradable polymeric systems for oral insulin delivery. *Drug Deliv.* 23, 1882–1891.
- Lv J, Zhang S, Luo L, Han W, Zhang J, Yang K & Christie P (2012) Dissolution and Microstructural Transformation of ZnO Nanoparticles under the Influence of Phosphate. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7215–7221.
- Lyon DY & Alvarez PJJ (2008) Fullerene water suspension (nC60) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8127–8132.
- Lyon DY, Brunet L, Hinkal GW, Wiesner MR & Alvarez PJJ (2008) Antibacterial activity of fullerene water suspensions (nC60) is not due to ROS-mediated damage. *Nano Lett.* 8, 1539–1543.
- Ma H, Williams PL & Diamond SA (2013) Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – A review. *Environ. Pollut.* 172, 76–85.
- Ma R, Levard C, Judy JD, Unrine JM, Durenkamp M, Martin B, Jefferson B & Lowry GV (2014) Fate of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant and in Processed Biosolids. *Environ. Sci. Technol.* 48, 104–112.
- Ma R, Levard C, Michel FM, Brown GE & Lowry GV (2013) Sulfidation Mechanism for Zinc Oxide Nanoparticles and the Effect of Sulfidation on Their Solubility. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2527–2534.
- Ma Z, Chandrangsu P, Helmann TC, Romsang A, Gaballa A & Helmann JD (2014) Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*
- Maamar H & Dubnau D (2005) Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol. Microbiol.* 56, 615–624.
- Magnuson R, Solomon J & Grossman AD (1994) Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* 77, 207–216.

- Maier B, Chen I, Dubnau D & Sheetz MP (2004) DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3832999/> [Accessed March 31, 2017].
- Maillard J-Y & Hartemann P (2013) Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 373–383.
- Mamberti S, Prati P, Cremaschi P, Seppi C, Morelli CF, Galizzi A, Fabbi M & Calvio C (2015) γ -PGA Hydrolases of Phage Origin in *Bacillus subtilis* and Other Microbial Genomes. *PLoS One* 10, e0130810.
- Marambio-Jones C & Hoek EMV (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.* 12, 1531–1551.
- Maret W (2013) Inhibitory zinc sites in enzymes. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 26, 197–204.
- Maret W & Li Y (2009) Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem. Rev.* 109, 4682–4707.
- Marvasi M, Visscher PT & Casillas Martinez L (2010) Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 313, 1–9.
- Mattos IB, Alves DA, Hollanda LM, Ceragiogli HJ, Baranauskas V & Lancellotti M (2011) Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under *Neisseria meningitidis* transformation process. *J. Nanobiotechnology* 9, 53.
- Maurer-Jones MA, Gunsolus IL, Murphy CJ & Haynes CL (2013) Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Anal. Chem.* 85, 3036–3049.
- McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, Dockery P, Prendergast M, Rowan N & Morris D (2017) Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* 575, 231–246.
- McShan D, Ray PC & Yu H (2014) Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver. *J. Food Drug Anal.* 22, 116–127.
- Meulenkamp EA (1998) Size Dependence of the Dissolution of ZnO Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 102, 7764–7769.
- Meyer FM & Stülke J (2013) Malate metabolism in *Bacillus subtilis*: distinct roles for three classes of malate-oxidizing enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* 339, 17–22.
- Mijnendonckx K, Leys N, Mahillon J, Silver S & Houdt RV (2013) Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *BioMetals* 26, 609–621.
- Mirouze N, Prepiak P & Dubnau D (2011) Fluctuations in *spo0A* transcription control rare developmental transitions in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 7, e1002048.
- Mitrano DM, Rimmele E, Wichser A, Erni R, Height M & Nowack B (2014) Presence of Nanoparticles in Wash Water from Conventional Silver and Nano-silver Textiles. *ACS Nano* 8, 7208–7219.

- Moreau JW, Weber PK, Martin MC, Gilbert B, Hutcheon ID & Banfield JF (2007) Extracellular Proteins Limit the Dispersal of Biogenic Nanoparticles. *Science* 316, 1600–1603.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT & Yacaman MJ (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346.
- Moses S, Sinner T, Zapras A, Stöveken N, Hoffmann T, Belitsky BR, Sonenshein AL & Bremer E (2012) Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *J. Bacteriol.* 194, 745–758.
- Mu D, Yu X, Xu Z, Du Z & Chen G (2016) Physiological and transcriptomic analyses reveal mechanistic insight into the adaption of marine *Bacillus subtilis* C01 to alumina nanoparticles. *Sci. Rep.* 6, 29953.
- Nakano S, Küster-Schöck E, Grossman AD & Zuber P (2003) Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13603–13608.
- Nanamiya H, Kasai K, Nozawa A, Yun C-S, Narisawa T, Murakami K, Natori Y, Kawamura F & Tozawa Y (2008) Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 67, 291–304.
- Natori Y, Tagami K, Murakami K, Yoshida S, Tanigawa O, Moh Y, Masuda K, Wada T, Suzuki S, Nanamiya H, Tozawa Y & Kawamura F (2009) Transcription Activity of Individual *rrn* Operons in *Bacillus subtilis* Mutants Deficient in (p)ppGpp Synthetase Genes, *relA*, *yjbM*, and *ywaC*. *J. Bacteriol.* 191, 4555–4561.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A-J, Quigg A, Santschi PH & Sigg L (2008) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372–386.
- Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V & Thompson M (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8, 543–557.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D & Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255–262.
- Niazi JH & Gu MB (2009) Toxicity of Metallic Nanoparticles in Microorganisms- a Review. In P. D. Y. J. Kim, P. D. U. Platt, D. M. B. Gu, & D. H. Iwahashi, eds. *Atmospheric and Biological Environmental Monitoring*. Springer Netherlands, pp.193–206. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-9674-7_12 [Accessed February 27, 2017].
- Nidya M, Umadevi M, Sankar P & Rajkumar BJM (2015) L-Glutamic acid functionalized silver nanoparticles and its nonlinear optical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 26, 4124–4131.
- Nijland R, Burgess JG, Errington J & Veening J-W (2010) Transformation of environmental *Bacillus subtilis* isolates by transiently inducing genetic competence. *PLoS One* 5, e9724.

- Notter DA, Mitrano DM & Nowack B (2014) Are nanosized or dissolved metals more toxic in the environment? A meta-analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2733–2739.
- Nowicki D, Maciąg-Dorszyńska M, Kobiela W, Herman-Antosiewicz A, Węgrzyn A, Szalewska-Pałasz A & Węgrzyn G (2014) Phenethyl isothiocyanate inhibits shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by stringent response induction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2304–2315.
- Ochi K, Kandala J & Freese E (1982) Evidence that *Bacillus subtilis* sporulation induced by the stringent response is caused by the decrease in GTP or GDP. *J. Bacteriol.* 151, 1062–1065.
- Ogunleye A, Bhat A, Irerere VU, Hill D, Williams C & Radecka I (2015) Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiol. Read. Engl.* 161, 1–17.
- Ogura M, Liu L, LaCelle M, Nakano MM & Zuber P (1999) Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 32, 799–812.
- Oh YT, Park Y, Yoon MY, Bari W, Go J, Min KB, Raskin DM, Lee K-M & Yoon SS (2014) Cholera toxin production during anaerobic trimethylamine N-oxide respiration is mediated by stringent response in *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 289, 13232–13242.
- Otani Y, Tabata Y & Ikada Y (1999) Sealing effect of rapidly curable gelatin-poly (L-glutamic acid) hydrogel glue on lung air leak. *Ann. Thorac. Surg.* 67, 922–926.
- Overkamp W, Ercan O, Herber M, van Maris AJA, Kleerebezem M & Kuipers OP (2015) Physiological and cell morphology adaptation of *Bacillus subtilis* at near-zero specific growth rates: a transcriptome analysis. *Environ. Microbiol.* 17, 346–363.
- Pal S, Tak YK & Song JM (2007) Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1712–1720.
- Pandey A & Palni LMS (1997) *Bacillus* species: The dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. *Microbiol. Res.* 152, 359–365.
- Parashar V, Konkol MA, Kearns DB & Neiditch MB (2013) A plasmid-encoded phosphatase regulates *Bacillus subtilis* biofilm architecture, sporulation, and genetic competence. *J. Bacteriol.* 195, 2437–2448.
- Park H-J, Kim JY, Kim J, Lee J-H, Hahn J-S, Gu MB & Yoon J (2009) Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res.* 43, 1027–1032.
- Pereira CL, Antunes JC, Gonçalves RM, Ferreira-da-Silva F & Barbosa MA (2012) Biosynthesis of highly pure poly- γ -glutamic acid for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 1583–1591.
- Persuh M, Turgay K, Mandic-Mulec I & Dubnau D (1999) The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. *Mol. Microbiol.* 33, 886–894.

- Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, Völker U & Hecker M (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 5617–5631.
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S & Nowack B (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1109.
- Poirier I, Kuhn L, Demortière A, Mirvaux B, Hammann P, Chicher J, Caplat C, Pallud M & Bertrand M (2016) Ability of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to counteract the toxicity of CdSe nanoparticles. *J. Proteomics* 148, 213–227.
- Pomposiello PJ, Bennik MH & Demple B (2001) Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J. Bacteriol.* 183, 3890–3902.
- Posada AC, Kolar SL, Dusi RG, Francois P, Roberts AA, Hamilton CJ, Liu GY & Cheung A (2014) Importance of Bacillithiol in the Oxidative Stress Response of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 82, 316–332.
- Pradas del Real AE, Castillo-Michel H, Kaegi R, Sinnet B, Magnin V, Findling N, Villanova J, Carrière M, Santaella C, Fernández-Martínez A, Levard C & Sarret G (2016) Fate of Ag-NPs in Sewage Sludge after Application on Agricultural Soils. *Environ. Sci. Technol.* 50, 1759–1768.
- Pradas del Real AE, Vidal V, Carrière M, Castillo-Michel H, Levard C, Chaurand P & Sarret G (2017) Silver Nanoparticles and Wheat Roots: A Complex Interplay. *Environ. Sci. Technol.* 51, 5774–5782.
- Provvedi R, Chen I & Dubnau D (2001) NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 40, 634–644.
- Provvedi R & Dubnau D (1999) ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 31, 271–280.
- Pulit-Prociak J, Stokłosa K & Banach M (2014) Nanosilver products and toxicity. *Environ. Chem. Lett.* 13, 59–68.
- Qiu Z, Yu Y, Chen Z, Jin M, Yang D, Zhao Z, Wang J, Shen Z, Wang X, Qian D, Huang A, Zhang B & Li J-W (2012) Nanoalumina promotes the horizontal transfer of multiresistance genes mediated by plasmids across genera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 4944–4949.
- Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A & Lunardi J (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 307–316.
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S & Lelong C (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J. Proteomics* 73, 2064–2077.
- Rabilloud T & Lelong C (2011) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J. Proteomics* 74, 1829–1841.
- Rabilloud T, Valette C & Lawrence JJ (1994) Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 15, 1552–1558.

- Radzig MA, Nadtochenko VA, Koksharova OA, Kiwi J, Lipasova VA & Khmel IA (2013) Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 102, 300–306.
- Rahban M, Divsalar A, Saboury AA & Golestani A (2010) Nanotoxicity and Spectroscopy Studies of Silver Nanoparticle: Calf Thymus DNA and K562 as Targets. *J. Phys. Chem. C* 114, 5798–5803.
- Rai M, Yadav A & Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 27, 76–83.
- Raliya R, Tarafdar JC, Mahawar H, Kumar R, Gupta P, Mathur T, Kaul RK, Praveen-Kumar null, Kalia A, Gautam R, Singh SK & Gehlot HS (2014) ZnO nanoparticles induced exopolysaccharide production by *B. subtilis* strain JCT1 for arid soil applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 65, 362–368.
- Ran C, Carrias A, Williams MA, Capps N, Dan BCT, Newton JC, Kloepper JW, Ooi EL, Browdy CL, Terhune JS & Liles MR (2012) Identification of *Bacillus* Strains for Biological Control of Catfish Pathogens. *PLOS ONE* 7, e45793.
- Ravel B & Newville M (2005) ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.* 12, 537–541.
- Reidy B, Haase A, Luch A, Dawson KA & Lynch I (2013) Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials* 6, 2295–2350.
- Reitzer LJ, Wice BM & Kennell D (1980) The pentose cycle. Control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 255, 5616–5626.
- Richert S, Luche S, Chevallet M, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E & Rabilloud T (2004) About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* 4, 909–916.
- Roggiani M & Dubnau D (1993) ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J. Bacteriol.* 175, 3182–3187.
- Rojas-Chapana J, Troszczyńska J, Firkowska I, Morscheck C & Giersig M (2005) Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells. *Lab. Chip* 5, 536–539.
- Romero D (2013) Bacterial determinants of the social behavior of *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* 164, 788–798.
- Rorth M & Jensen PK (1967) Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim. Biophys. Acta* 139, 171–173.
- Sambandan DR & Ratner D (2011) Sunscreens: an overview and update. *J. Am. Acad. Dermatol.* 64, 748–758.
- Santimano MC & Kowshik M (2013) Altered growth and enzyme expression profile of ZnO nanoparticles exposed non-target environmentally beneficial bacteria. *Environ. Monit. Assess.* 185, 7205–7214.

- Schneider KB, Palmer TM & Grossman AD (2002) Characterization of comQ and comX, Two Genes Required for Production of ComX Pheromone in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 410–419.
- Schoenfelder SMK, Marincola G, Geiger T, Goerke C, Wolz C & Ziebuhr W (2013) Methionine biosynthesis in *Staphylococcus aureus* is tightly controlled by a hierarchical network involving an initiator tRNA-specific T-box riboswitch. *PLoS Pathog.* 9, e1003606.
- Scoffone V, Dondi D, Biino G, Borghese G, Pasini D, Galizzi A & Calvio C (2013) Knockout of pgdS and ggt genes improves γ -PGA yield in *B. subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2006–2012.
- Serpone N, Dondi D & Albini A (2007) Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chim. Acta* 360, 794–802.
- Serror P & Sonenshein AL (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J. Bacteriol.* 178, 5910–5915.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D & D'Ari R (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749.
- Shank EA & Kolter R (2011) Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 741–747.
- Sheng Z & Liu Y (2017) Potential impacts of silver nanoparticles on bacteria in the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* 191, 290–296.
- Sheng Z, Van Nostrand JD, Zhou J & Liu Y (2015) The effects of silver nanoparticles on intact wastewater biofilms. *Front. Microbiol.* 6, 680.
- Shih IL & Van YT (2001) The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* 79, 207–225.
- Shih IL, Van YT, Yeh LC, Lin HG & Chang YN (2001) Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresour. Technol.* 78, 267–272.
- Shivers RP & Sonenshein AL (2004) Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Mol. Microbiol.* 53, 599–611.
- Sierra MI, Valdés A, Fernández AF, Torrecillas R & Fraga MF (2016) The effect of exposure to nanoparticles and nanomaterials on the mammalian epigenome. *Int. J. Nanomedicine* 11, 6297–6306.
- Sigdel TK, Cilliers R, Gursahaney PR, Thompson P, Easton JA & Crowder MW (2006) Probing the adaptive response of *Escherichia coli* to extracellular Zn(II). *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 19, 461–471.
- Singer JW (2005) Paclitaxel poliglumex (XYOTAX, CT-2103): a macromolecular taxane. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 109, 120–126.
- Slack FJ, Serror P, Joyce E & Sonenshein AL (1995) A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *Mol. Microbiol.* 15, 689–702.

- Smetana AB, Klabunde KJ, Marchin GR & Sorensen CM (2008) Biocidal Activity of Nanocrystalline Silver Powders and Particles. *Langmuir* 24, 7457–7464.
- Smith ML, Vorce SP, Holler JM, Shimomura E, Magluilo J, Jacobs AJ & Huestis MA (2007) Modern instrumental methods in forensic toxicology. *J. Anal. Toxicol.* 31, 237–253, 8A–9A.
- Smulders S, Larue C, Sarret G, Castillo-Michel H, Vanoirbeek J & Hoet PHM (2015) Lung distribution, quantification, co-localization and speciation of silver nanoparticles after lung exposure in mice. *Toxicol. Lett.* 238, 1–6.
- Solomon J, Su L, Shyn S & Grossman AD (2003) Isolation and characterization of mutants of the *Bacillus subtilis* oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport. *J. Bacteriol.* 185, 6425–6433.
- Solomon JM, Lazazzera BA & Grossman AD (1996) Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 10, 2014–2024.
- Spira B, Hu X & Ferenci T (2008) Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 154, 2887–2895.
- Stanley NR & Lazazzera BA (2005) Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- γ -DL-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 57, 1143–1158.
- Storey JD & Tibshirani R (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9440–9445.
- Sun TY, Gottschalk F, Hungerbühler K & Nowack B (2014) Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 185, 69–76.
- Suresh AK, Doktycz MJ, Wang W, Moon J-W, Gu B, Meyer III HM, Hensley DK, Allison DP, Phelps TJ & Pelletier DA (2011) Monodispersed biocompatible silver sulfide nanoparticles: Facile extracellular biosynthesis using the γ -proteobacterium, *Shewanella oneidensis*. *Acta Biomater.* 7, 4253–4258.
- Swasey SM, Leal LE, Lopez-Acevedo O, Pavlovich J & Gwinn EG (2015) Silver (I) as DNA glue: Ag⁺-mediated guanine pairing revealed by removing Watson-Crick constraints. *Sci. Rep.* 5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431418/>.
- Tabone M, Liroy VS, Ayora S, Machón C & Alonso JC (2014) Role of toxin ζ and starvation responses in the sensitivity to antimicrobials. *PLoS One* 9, e86615.
- Tagami K, Nanamiya H, Kazo Y, Maehashi M, Suzuki S, Namba E, Hoshiya M, Hanai R, Tozawa Y, Morimoto T, Ogasawara N, Kageyama Y, Ara K, Ozaki K, Yoshida M, Kuroiwa H, Kuroiwa T, Ohashi Y & Kawamura F (2012) Expression of a small (p)ppGpp synthetase, YwaC, in the (p)ppGpp(0) mutant of *Bacillus subtilis* triggers YvyD-dependent dimerization of ribosome. *MicrobiologyOpen* 1, 115–134.

- Tam LT, Antelmann H, Eymann C, Albrecht D, Bernhardt J & Hecker M (2006) Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. *Proteomics* 6, 4565–4585.
- Tam NKM, Uyen NQ, Hong HA, Duc LH, Hoa TT, Serra CR, Henriques AO & Cutting SM (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J. Bacteriol.* 188, 2692–2700.
- Tan IS & Ramamurthi KS (2014) Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 212–225.
- Taniguchi M, Kato K, Shimauchi A, Xu P, Fujita K-I, Tanaka T, Tarui Y & Hirasawa E (2005) Physicochemical properties of cross-linked poly- γ -glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 130–135.
- Tanimoto H, Fox T, Eagles J, Satoh H, Nozawa H, Okiyama A, Morinaga Y & Fairweather-Tait SJ (2007) Acute effect of poly- γ -glutamic acid on calcium absorption in post-menopausal women. *J. Am. Coll. Nutr.* 26, 645–649.
- Tareq FS, Kim JH, Lee MA, Lee H-S, Lee J-S, Lee Y-J & Shin HJ (2013) Antimicrobial Gageomacrolactins Characterized from the Fermentation of the Marine-Derived Bacterium *Bacillus subtilis* under Optimum Growth Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3428–3434.
- Tastet C, Lescuyer P, Diemer H, Luche S, van Dorsselaer A & Rabilloud T (2003) A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* 24, 1787–1794.
- Thalmann B, Voegelín A, Sinnet B, Morgenroth E & Kaegi R (2014) Sulfidation Kinetics of Silver Nanoparticles Reacted with Metal Sulfides. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4885–4892.
- Thiruvengadam M, Gurunathan S & Chung I-M (2015) Physiological, metabolic, and transcriptional effects of biologically-synthesized silver nanoparticles in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa* L.). *Protoplasma* 252, 1031–1046.
- Tojo S, Kumamoto K, Hirooka K & Fujita Y (2010) Heavy Involvement of Stringent Transcription Control Depending on the Adenine or Guanine Species of the Transcription Initiation Site in Glucose and Pyruvate Metabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 192, 1573–1585.
- Tojo S, Satomura T, Kumamoto K, Hirooka K & Fujita Y (2008) Molecular Mechanisms Underlying the Positive Stringent Response of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* Operon, Involved in the Biosynthesis of Branched-Chain Amino Acids. *J. Bacteriol.* 190, 6134–6147.
- Tortosa P, Logsdon L, Kraigher B, Itoh Y, Mandic-Mulec I & Dubnau D (2001) Specificity and Genetic Polymorphism of the *Bacillus* Competence Quorum-Sensing System. *J. Bacteriol.* 183, 451–460.
- Triboulet S, Aude-Garcia C, Armand L, Collin-Faure V, Chevallet M, Diemer H, Gerdil A, Proamer F, Strub J-M, Habert A, Herlin N, Van Dorsselaer A, Carrière M & Rabilloud T (2015) Comparative proteomic analysis of the molecular responses of mouse macrophages to titanium dioxide and copper oxide nanoparticles unravels some toxic mechanisms for copper oxide nanoparticles in macrophages. *PLoS One*.

- Triboulet S, Aude-Garcia C, Armand L, Gerdil A, Diemer H, Proamer F, Collin-Faure V, Habert A, Strub J-M, Hanau D, Herlin N, Carrière M, Van Dorsselaer A & Rabilloud T (2014) Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach. *Nanoscale* 6, 6102–6114.
- Triboulet S, Aude-Garcia C, Carrière M, Diemer H, Proamer F, Habert A, Chevallet M, Collin-Faure V, Strub J-M, Hanau D, Van Dorsselaer A, Herlin-Boime N & Rabilloud T (2013) Molecular responses of mouse macrophages to copper and copper oxide nanoparticles inferred from proteomic analyses. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 12, 3108–3122.
- Tripathi DK, Shweta null, Singh S, Singh S, Pandey R, Singh VP, Sharma NC, Prasad SM, Dubey NK & Chauhan DK (2017) An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 110, 2–12.
- Turgay K, Hahn J, Burghoorn J & Dubnau D (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J.* 17, 6730–6738.
- Turgay K, Hamoen LW, Venema G & Dubnau D (1997) Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 11, 119–128.
- van Dijk J & Hecker M (2013) *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb. Cell Factories* 12, 3.
- Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Rejeski D & Hull MS (2015) Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780.
- Varela JN, Amstalden MCK, Pereira RFC, de Hollanda LM, Ceragioli HJ, Baranauskas V & Lancellotti M (2014) Haemophilus influenzae porine ompP2 gene transfer mediated by graphene oxide nanoparticles with effects on transformation process and virulence bacterial capacity. *J. Nanobiotechnology* 12, 14.
- Veronesi G, Aude-Garcia C, Kieffer I, Gallon T, Delangle P, Herlin-Boime N, Rabilloud T & Carrière M (2015) Exposure-dependent Ag⁺ release from silver nanoparticles and its complexation in AgS₂ sites in primary murine macrophages. *Nanoscale* 7, 7323–7330.
- Vishnupriya S, Chaudhari K, Jagannathan R & Pradeep T (2013) Single-Cell Investigations of Silver Nanoparticle–Bacteria Interactions. *Part. Part. Syst. Character.* 30, 1056–1062.
- Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R & Kolter R (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 157–168.
- Völker U & Hecker M (2005) From genomics via proteomics to cellular physiology of the Gram-positive model organism *Bacillus subtilis*. *Cell. Microbiol.* 7, 1077–1085.
- Volpe L & Peterson PJ (1989) The atmospheric sulfidation of silver in a tubular corrosion reactor. *Corros. Sci.* 29, 1179–1196.
- Vullo DL, Coto CE & Siñeriz F (1991) Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2392–2394.

- Wang JD, Sanders GM & Grossman AD (2007) Nutritional Control of Elongation of DNA Replication by (p)ppGpp. *Cell* 128, 865–875.
- Wang L, Hu C & Shao L (2017) The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomedicine* 12, 1227–1249.
- Wang L, Wang N, Mi D, Luo Y & Guo J (2017) Poly- γ -glutamic acid productivity of *Bacillus subtilis* BsE1 has positive function in motility and biocontrol against *Fusarium graminearum*. *J. Microbiol. Seoul Korea* 55, 554–560.
- Wang P, Menzies NW, Lombi E, Sekine R, Blamey FPC, Hernandez-Soriano MC, Cheng M, Kappen P, Peijnenburg WJGM, Tang C & Kopittke PM (2015) Silver sulfide nanoparticles (Ag₂S-NPs) are taken up by plants and are phytotoxic. *Nanotoxicology* 9, 1041–1049.
- Wei C, Lin WY, Zainal Z, Williams NE, Zhu K, Kruzic AP, Smith RL & Rajeshwar K (1994) Bactericidal Activity of TiO₂ Photocatalyst in Aqueous Media: Toward a Solar-Assisted Water Disinfection System. *Environ. Sci. Technol.* 28, 934–938.
- Wigginton NS, Titta A de, Piccapietra F, Dobias J, Nesatyy VJ, Suter MJF & Bernier-Latmani R (2010) Binding of Silver Nanoparticles to Bacterial Proteins Depends on Surface Modifications and Inhibits Enzymatic Activity. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2163–2168.
- Wouters MA, Iismaa S, Fan SW & Haworth NL (2011) Thiol-based redox signalling: rust never sleeps. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1079–1085.
- Wright PC, Noirel J, Ow S-Y & Fazeli A (2012) A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology* 77, 738–765.e52.
- Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, Yeh JJ, Zink JJ & Nel AE (2008) Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano* 2, 2121–2134.
- Xiang J, Cao H, Wu Q, Zhang S, Zhang X & Watt A a. R (2008) L-cysteine-assisted synthesis and optical properties of Ag₂S nanospheres. *J. Phys. Chem. C* 112, 3580–3584.
- Xiu Z-M, Ma J & Alvarez PJJ (2011) Differential Effect of Common Ligands and Molecular Oxygen on Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles versus Silver Ions. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9003–9008.
- Xu H, Qu F, Xu H, Lai W, Wang YA, Aguilar ZP & Wei H (2011) Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *BioMetals* 25, 45–53.
- Yadav T, Carrasco B, Myers AR, George NP, Keck JL & Alonso JC (2012) Genetic recombination in *Bacillus subtilis*: a division of labor between two single-strand DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 40, 5546–5559.
- Yamashiro D, Yoshioka M & Ashiuchi M (2011) *Bacillus subtilis* pgsE (Formerly ywtC) stimulates poly- γ -glutamate production in the presence of zinc. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 226–230.

- Yang W, Shen C, Ji Q, An H, Wang J, Liu Q & Zhang Z (2009) Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology* 20, 085102.
- Yates JR, McCormack AL, Schieltz D, Carmack E & Link A (1997) Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry. *J. Protein Chem.* 16, 495–497.
- Yousefi M, Dadashpour M, Hejazi M, Hasanzadeh M, Behnam B, de la Guardia M, Shadjou N & Mokhtarzadeh A (2017) Anti-bacterial activity of graphene oxide as a new weapon nanomaterial to combat multidrug-resistance bacteria. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 74, 568–581.
- Yu D-G (2007) Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na⁺-poly(γ -glutamic acid)-silver nitrate complex via chemical reduction process. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 59, 171–178.
- Yu S, Yin Y & Liu J (2012) Silver nanoparticles in the environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 78–92.
- Yu Y, Yan F, Chen Y, Jin C, Guo J-H & Chai Y (2016) Poly- γ -Glutamic Acids Contribute to Biofilm Formation and Plant Root Colonization in Selected Environmental Isolates of *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 7, 1811.
- Yuan Z, Chen Y-C, Li H-W & Chang H-T (2014) Fluorescent silver nanoclusters stabilized by DNA scaffolds. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 50, 9800–9815.
- Zamboni N, Fischer E, Laudert D, Aymerich S, Hohmann H-P & Sauer U (2004) The *Bacillus subtilis* yqjI Gene Encodes the NADP⁺-Dependent 6-P-Gluconate Dehydrogenase in the Pentose Phosphate Pathway. *J. Bacteriol.* 186, 4528–4534.
- Zanuy D & Alemán C (2001) Poly(γ -glutamic acid) in aqueous solution: molecular dynamics simulations of 10- and 20-residue chains at different temperatures. *Biomacromolecules* 2, 651–657.
- Zapras A, Brill J, Thüning M, Wünsche G, Heun M, Barzantny H, Hoffmann T & Bremer E (2013) Osmoprotection of *Bacillus subtilis* through import and proteolysis of proline-containing peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 576–587.
- Zeigler DR, Prágai Z, Rodriguez S, Chevreux B, Muffler A, Albert T, Bai R, Wyss M & Perkins JB (2008) The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains. *J. Bacteriol.* 190, 6983–6995.
- Zeng W, Lin Y, Qi Z, He Y, Wang D, Chen G & Liang Z (2013) An integrated high-throughput strategy for rapid screening of poly(γ -glutamic acid)-producing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2163–2172.
- Zhang L, Yang X, Gao D, Wang L, Li J, Wei Z & Shi Y (2017) Effects of poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) on plant growth and its distribution in a controlled plant-soil system. *Sci. Rep.* 7, 6090.
- Zhang P, Chen Y-P, Peng M-W, Guo J-S, Shen Y, Yan P, Zhou Q-H, Jiang J & Fang F (2017) Extracellular polymeric substances dependence of surface interactions of *Bacillus subtilis* with Cd(2+) and

- Pb(2+): An investigation combined with surface plasmon resonance and infrared spectra. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 154, 357–364.
- Zhang P, Wang Y, Chang Y, Xiong ZH & Huang CZ (2013) Highly selective detection of bacterial alarmone ppGpp with an off-on fluorescent probe of copper-mediated silver nanoclusters. *Biosens. Bioelectron.* 49, 433–437.
- Zhang Y, Peng H, Huang W, Zhou Y & Yan D (2008) Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 325, 371–376.
- Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA & Storz G (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570.
- Zuber P (2009) Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 575–597.

Annexes

1. Annexe 1 : Article 3, format publication

Journal of Proteomics 135 (2016) 170–180

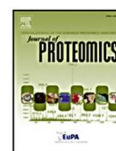


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot



Zinc oxide induces the stringent response and major reorientations in the central metabolism of *Bacillus subtilis*



Sylvie Luche ^a, Elise Eymard-Vernain ^a, Hélène Diemer ^{b,c}, Alain Van Dorsselaer ^{b,c},
Thierry Rabilloud ^d, Cécile Lelong ^{a,*}

^a Pro-MD team, Université Joseph Fourier, CEA Grenoble, IRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UIF, Grenoble, France

^b Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, IPHC, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

^c CNRS, UMR7178, 67087 Strasbourg, France

^d Pro-MD team, UMR CNRS 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2015

Received in revised form 11 July 2015

Accepted 15 July 2015

Available online 26 July 2015

ABSTRACT

Microorganisms, such as bacteria, are one of the first targets of nanoparticles in the environment. In this study, we tested the effect of two nanoparticles, ZnO and TiO₂, with the salt ZnSO₄ as the control, on the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* by 2D gel electrophoresis-based proteomics. Despite a significant effect on viability (ID₅₀), TiO₂ NPs had no detectable effect on the proteomic pattern, while ZnO NPs and ZnSO₄ significantly modified *B. subtilis* metabolism. These results allowed us to conclude that the effects of ZnO observed in this work were mainly attributable to Zn dissolution in the culture media. Proteomic analysis highlighted twelve modulated proteins related to central metabolism: MetE and MetC (cysteine metabolism), OdhA, AspD, IspD, AnsB, PdhB and YtsJ (Krebs cycle) and XylA, YqjI, Drm and Tal (pentose phosphate pathway). Biochemical assays, such as free sulphydryl, CoA-SH and malate dehydrogenase assays corroborated the observed central metabolism reorientation and showed that Zn stress induced oxidative stress, probably as a consequence of thiol chelation stress by Zn ions. The other patterns affected by ZnO and ZnSO₄ were the stringent response and the general stress response. Nine proteins involved in or controlled by the stringent response showed a modified expression profile in the presence of ZnO NPs or ZnSO₄: YwaC, SigH, YtkH, YtzB, TufA, RplJ, RpsB, PdhB and Mbl. An increase in the ppGpp concentration confirmed the involvement of the stringent response during a Zn stress. All these metabolic reorientations in response to Zn stress were probably the result of complex regulatory mechanisms including at least the stringent response via YwaC.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the past decade, nanoparticles (NPs) have been used more and more in research and in industry, which has raised questions about the potential toxicity of such materials. Nanomaterials are used in various fields including drug delivery, electronics, therapeutics, cosmetics, water treatment technology, environmental remediation and paint components. Due to these applications, many varieties of NPs are being industrially produced in massive amounts. These NPs are discharged into the environment during their life cycle or via nanomaterial-containing wastes. This waste or contamination may provide a path of entry into the food chain via microorganisms and/or eventually disturb the ecological balance. NPs are naturally present in the environment, e.g. in volcanic dusts in the atmosphere or as nanometer-scale particles from soil erosion. Ecosystems have evolved with these NPs for million years and organisms are adapted to them. By contrast, manufactured NPs released into the environment are new components that have arrived in significant amounts.

Microorganisms, including bacteria present in the natural ecosystem, are among the primary targets that are exposed to NPs.

NPs are highly reactive and catalytic in nature compared to their ions or bulk counterparts (see [1] for review). They exhibit toxicity to living organisms mainly because of their small size, large surface-to-volume ratio and highly reactive facets. Because of their distinct properties compared to their corresponding ions or bulk material, NPs can lead to unpredictable effects on biological systems. TiO_2 and ZnO NPs are commonly used in sunscreens and other personal care products, paints, electronic devices and solar cells because of their optical, piezoelectric, magnetic and gas sensing properties, which leads to the release of these NPs into environment via industrial and domestic waste. Thus, it is very important to evaluate their environmental impact using one of the first pathways of entry into the ecosystem, bacteria. *Bacillus subtilis*, the Gram-positive bacterium, can be isolated from a wide range of environments, both terrestrial and aquatic, suggesting that this species is ubiquitous and broadly adapted to grow in diverse settings within the biosphere [2–4]. This bacterium is known to have a highly versatile metabolism, which can quickly and easily adapt to numerous environmental modifications. Every modification due to the presence of toxic

* Corresponding author.

E-mail address: cecile.lelong@ujf-grenoble.fr (C. Lelong).

elements such as NPs will impact its physiology [5–7]. This property is one of the reasons explaining why this bacterium has been found in many biotopes in which it has genetically evolved to obtain the best possible fitness. One of the natural biotopes of this bacterium is the upper layer of soil where it can modify the growth of some vegetal species by modulating the carbon and nitrogen cycles surrounding the roots. It has been isolated from the rhizosphere of a variety of plants in greater numbers than most other spore-forming bacteria [8–11]. Considering that *B. subtilis* is found on and around plants and that many animals consume plants, it is no wonder that this bacterium is often found in gut or in feces [12–15]. The passage of *B. subtilis* through the gastrointestinal tract may not be without effect. However, *B. subtilis* is a ubiquitous organism, not solely a consequence of spore persistence in these environments, but also because of its capacity to grow in diverse environments including soils, plant roots and the gastrointestinal tract of animals. The presence of NPs in the environment in an increased concentration will have significant consequences on *B. subtilis* metabolism, which will also impact the physiology of surrounding organisms in the plant and animal kingdoms.

Most of the analyses performed on the effect of NPs on bacteria have only studied the antibacterial properties of NPs [16–19]. Some studies have also shown effects on membrane disorganization [20], the production of reactive oxygen species (ROS) [21–23] or the production of exopolysaccharide [24], as well as altered enzyme expression profiles [25]. We are the first to study the metabolic effects of NPs on *B. subtilis* using a proteomic approach. Despite a significant effect on viability, TiO₂ NPs had no detectable effect on the proteomic pattern, while ZnO NPs and ZnSO₄ salt significantly modified central metabolism and the stringent response of *B. subtilis*.

2. Experimental procedures

2.1. Bacterial strain and culture media

The *B. subtilis* strain used was the 168 strain (*trpC2*, wild type) (personal gift, Maria Laaberki). The medium was LB: 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl supplemented with 12 g/l agar when necessary. Cells were grown in Erlenmeyer flasks with shaking at 200 rpm at 37 °C.

The nanoparticles were from SIGMA: TiO₂ (ref 700347, mixture 80:20 of anatase and rutile, 33–37 wt.% in water, <150 nm volume distribution, DLS, (dynamic light scattering)), and ZnO (ref 721077, 50% in water, <100 nm by DLS) were already purchased as water dispersions. Their principal features have been described elsewhere [26] and [27] in press.

2.2. Nanoparticle stresses

Cells were grown in LB medium (250 ml) in Erlenmeyer flasks. When the OD₆₀₀ reached 0.6, 50 ml of the culture was transferred to a new Erlenmeyer flask, and the cells were incubated without for the control and with 130 µg/ml TiO₂, or 170 µg/ml ZnO or 0.3 mM ZnSO₄ for 1 h under shaking at 37 °C. Then, aliquots (100 µl) of the samples were diluted in H₂O and appropriate dilutions were plated onto LB agar, and incubated overnight at 37 °C. The CFUs were counted and the viability was determined. At the same time, the remaining 50 ml was harvested by centrifugation at 5000 rpm for 15 min at 4 °C. The pellet was washed twice with 50 ml of PBS and then frozen at –20 °C until used. For the metabolic assays, the sample was separated in 2 or 10 ml aliquots before harvest by centrifugation. The pellet was frozen in liquid N₂. All experiments were performed in triplicate and at least two technical replicates from each dilution were plated to determine the number of CFUs.

2.3. DLS measurements

Nanoparticles were diluted in three different solutions just before measurement with the DLS (dynamic light scattering) apparatus (Wyatt technology): H₂O, LB medium or preconditioned LB medium. The preconditioned LB was prepared as follows: *B. subtilis* strain 168 was grown in LB until an OD₆₀₀ of 0.6. Then, 2 ml of culture was harvested by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. The supernatant was filtered through a 0.2 µm filter. The filtered solution constituted preconditioned LB. Each measurement was performed at least in triplicate.

2.4. Sample preparation of the cytosolic crude extract for 2D-gel electrophoresis experiments

The frozen pellets were resuspended and incubated in 225 µl of lysis solution containing 200 µl of TES buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2 M sucrose) + 20 µl of 30 mg/ml lysozyme, and 5 µl of 1/50 benzonase solution for 20 min at 37 °C. The samples were sonicated in a water bath for 5 min. Next, 6 µl of 20% SDS and 80 µl of 1 M DTT were added before incubation at 100 °C for 5 min. The lysis was achieved by sonication in a water bath for 5 min. Finally, 800 µl of rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% carrier ampholytes (Pharmalytes 3–10)) and 100 mM dithiodiethanol [28,29] was added. Each sample was quantified after separation by SDS-PAGE and staining: known quantities (10, 20 and 30 µg) of total protein extracts and two dilutions of cytosolic crude extract extracts were separated on the same gel. Proteins were stained with colloidal Coomassie blue [30] (data not shown).

2.5. 2D-gel electrophoresis

2.5.1. IEF

Homemade 160 mm long 4–8 or 3–10.5 linear pH gradient [31] gels were cast according to published procedures [32]. Four millimeter-wide strips were cut and rehydrated overnight with the sample, diluted in a final volume of 0.6 ml of rehydration solution and 100 mM dithiodiethanol [28,29].

The strips were then placed on a Multiphor plate and IEF was carried out with the following electrical parameters: 100 V for 1 h, then 300 V for 3 h, then 1000 V for 1 h, then 3400 V up to 60–70 kVh. After IEF, the gels were equilibrated for 20 min in 125 mM Tris, 100 mM HCl, 2.5% SDS, 30% glycerol and 6 M urea. Gels were then transferred on top of SDS gels and sealed with 1% agarose dissolved in Tris 125 mM, HCl 100 mM, SDS 0.4% and 0.005% (w/v) bromophenol blue.

2.5.2. SDS electrophoresis and protein detection

10% T gels (160 × 200 × 1.5 mm) were used for protein separation. The Tris taurine buffer system was used at an ionic strength of 0.1 and a pH of 7.9 [33]. The final gel composition was 180 mM Tris, 100 mM HCl, 10% (w/v) acrylamide and 0.27% bisacrylamide. The upper electrode buffer was 50 mM Tris, 200 mM taurine and 0.1% SDS. The lower electrode buffer was 50 mM Tris, 200 mM glycine and 0.1% SDS. The gels were run at 25 V for 1 h, then at 12.5 W per gel until the dye front had reached the bottom of the gel. Detection was carried out by fast silver staining [34].

2.5.3. Image analysis

Image analysis was performed with Delta2D software (v.3.6) (Decodon, Germany). Briefly, three gel images arising from three different cultures and protein preparations were warped for each group onto a master image, one for the culture in LB (control without nanoparticles or salt) and one for each stress condition (TiO₂, ZnO nanoparticles and ZnSO₄ salt). The control master gel image was then warped onto each stress condition master gel image and a union fusion image of all the gel images was then made. Detection was carried out on this fusion image, and the detection results were then propagated to each individual image.

The resulting quantification table was then analyzed using the Student's t-test function in the software, and the spots having both a p-value lesser than 0.05 and an induction/repression ratio of 1.5 or greater were selected for further analysis by mass spectrometry after being manually verified. For the global analysis of the power and reproducibility of the experiments, the Storey and Tibshirani approach was used [35], as described by Karp and Lilley [36] (Supplementary Fig. S2).

The spots of interest were excised from a silver staining gel by a scalpel blade and transferred to a 96-well microtitration plate. Destaining of the spots was carried out by the ferricyanide–thiosulfate method [37] on the same day as silver staining to improve sequence coverage in the mass spectrometry analysis [38].

2.6. Mass spectrometry

Analysis was carried out essentially as described previously [39], except that only the nanoLC–QTOF–MS system was used for nanoLC–MS/MS analysis and the version of the UniProtKB/SwissProt database was 2012_12 (538,585 sequences) for protein identification. The detailed protocol can be found in the Supplementary data (S1).

2.7. Crude extract preparation for enzymatic and biochemical (SH, CoA, ppGpp) assays

Cells pellets were obtained from 10 ml aliquots of *B. subtilis* strain 168 cultures grown with or without stress, as described above. Cells were incubated in a 200 µl final volume of 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 15 µl of 30 mg/ml lysozyme and 4 µl of 1/50 benzonase solution for 20 min at 37 °C. This was then centrifuged at 13,000 rpm at 4 °C for 10 min. Total protein quantification was performed using the Bradford assay.

2.8. Malic enzyme activity assay

NAD(P)H malic enzyme assays were performed as previously described [40]. Briefly, crude extract supernatants were obtained as described above and stored on ice until malic enzyme assays were performed. Total protein quantification was performed using the Bradford assay.

Malic enzyme activities were measured by spectrophotometrically monitoring at 340 nm, i.e. NAD(P)H formation during the reductive decarboxylation of malate (malate + NAD(P) = pyruvate + NAD(P)H). The reaction mixture was composed of 10 µl of an appropriate dilution of crude extract supernatant in 1 ml of buffer (50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 50 mM KCl and 10 mM thioglycerol). The reaction was started by the addition of 5 mM of NAD⁺ or NADP⁺. The specific activity was calculated using the initial rate data normalized by the total protein quantity.

2.9. SH assay

Crude extracts were obtained as described above. Aliquots of the crude extract were used to measure the total protein quantity using the Bradford assay and the total sulfhydryl groups (total SH). To measure the free sulfhydryl groups, proteins of the crude extracts were precipitated with 10% TCA for 1 h on ice, harvested by centrifugation (13,000 g, 5 min). Free SH was measured in the supernatant. SH concentrations were determined spectrophotometrically as follows: 20 µl of the crude extract or 100 µl of the supernatant were mixed in 1 ml of 30 mM Tris HCl pH 8, 3 mM EDTA, 1.5 mM DTNB and 40% ethanol, then incubated 1 h at room temperature before measuring the optical absorbance at 412 nm.

2.10. CoA assay

Coenzyme A concentrations were determined using the Coenzyme A assay kit from Sigma-Aldrich; 40 µl of crude extracts were used for each tested condition. CoA concentrations were normalized by the protein concentrations measured by the Bradford assay.

2.11. Catalase activity assay

A 10 ml volume of bacteria grown until 0.6 OD₆₀₀ was stressed with 130 µg/ml TiO₂, 170 µg/ml ZnO, 0.3 mM ZnSO₄ or 5 mM H₂O₂ for 1 h under shaking at 37 °C. Bacteria were then pelleted by centrifugation at 6000 rpm for 10 min. The pellets were washed with 1 ml of PBS and centrifuged (13,000 rpm, 5 min). The pellets were finally resuspended in 8 ml of PBS. The catalase activities were immediately determined on cells using a Clarke-type electrode (Hansatech, Kings Lynn, UK), as described by Rorth and Jensen [41]. The specific activities were calculated as the number of generated O₂ mol/min/CFU.

2.12. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)

Shimadzu ICP 9000 (with mini plasma torch in axial reading mode) was used to measure the zinc content. Standard solution for AAS (Sigma Aldrich) was used to generate the calibration curve between 10 to 500 µg/L in pure water with 1% of HNO₃ (Fluka). Samples were routinely incubated in HNO₃ 10% ON at RT. Briefly, 500 µl of each cytosolic crude extract was incubated with 90 µl of HNO₃ 65% ON at RT. The sample was centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. Before to be measured pure water was added to the supernatant extemporaneously to obtain a final volume of 7 ml. Ytterbium solution standard for AAS (Sigma-Aldrich) was used as an internal standard to prevent calibration drift and fluidic perturbation. The result was expressed in µg/l [Zn] per mg of protein.

2.13. ppGpp assay

The ppGpp content was measured as previously described [42], using an on-off fluorescent probe. ppGpp extraction was performed on crude extracts of *B. subtilis* obtained as described above (growth in LB medium as the control and LB medium with a stress agent (130 µg/ml TiO₂, 170 µg/ml ZnO, 0.3 mM ZnSO₄ or 1% norvaline)). Aliquots of the crude extract were used to measure the total protein quantity using the Bradford assay. The same quantity of each crude extract was precipitated with 10% formic acid for 1 h on ice and cleared by centrifugation. The pH of the supernatant was adjusted to 7.4 by the addition of N-ethylmorpholine (130 µl for a sample of 200 µl).

Fluorescent probe preparation: 3 µM of oligonucleotide DNA (5'-GGC AGG TTG GGG TGA CTA AAA ACC CTT AAT CCC C-3') and 90 µl of freshly prepared 1 mM silver lactate (Fluka BioChemika) were first mixed in 20 mM phosphate buffer (pH 6.6) for 5 min in a final volume of 1 ml, and kept protected from light at room temperature. After 20 min, 90 µl of freshly prepared 1 mM NaBH₄ (Sigma-Aldrich) was quickly injected, thoroughly mixed, and the mixture was kept in the dark without further disturbance at 4 °C overnight.

Fluorescent detection: 20 µl of ppGpp extract was quickly mixed with the fluorescent probe (at a final concentration of 300 nM) in 20 mM phosphate buffer pH 7.4 in a final volume of 200 µl. The mix was incubated 45 min at room temperature and protected from light before the first measurement (F₀). Then, Cu²⁺ was added at a final concentration of 800 nM and the mix was incubated 45 min at room temperature and protected from light before the second measurement (F). Fluorescent spectra were measured with a Tecan Infinite® M1000 instrument at a fluorescent excitation wavelength of 585 nm and fluorescent emission wavelength of 635 nm. The results show the average of a technical duplicate for each biological triplicate and are expressed as follows: [F/F₀] stress condition normalized by [F/F₀] without stress.

3. Results

3.1. NPs sizes in growth medium and cell viability

Nanoparticle suspensions of TiO₂ and ZnO were diluted in H₂O, LB medium or preconditioned LB medium before measurements with a DLS apparatus (Fig. 1a, b). DLS measurements revealed that the different media modified the diameter of both nanoparticles. The TiO₂ NP diameter was increased in LB medium, preconditioned or not, compared to their size in H₂O. Nevertheless, the preconditioned medium decreased the diameter of TiO₂ NPs compared to the LB medium. ZnO NP diameter was decreased in both LB and preconditioned LB compared to the H₂O dilution, which may be explained by partial dissolution of the NPs [43]. DLS measurements of TiO₂ and ZnO suspensions in the different media performed over time (up to 1 h) after mixing showed no significant differences with the initial values (data not shown).

Different dilutions of TiO₂ and ZnO NPs (from 10⁻¹ to 10⁻⁴ mg/ml) and ZnSO₄ (from 0.03 to 0.5 mM) were investigated on *B. subtilis* growth (Fig. S3). 130 µg/ml TiO₂, 170 µg/ml ZnO and 0.3 mM ZnSO₄ were chosen because at these concentrations there is no major alteration of the growth curves. In these conditions, the viability levels were around 50% after 1 h of treatment (Fig. 1c). Such viability allowed for obtaining sufficient number of stressed, but not dead, cells to perform 2DE analysis.

3.2. Differential patterns of protein synthesis in the presence of TiO₂ and ZnO NPs and ZnSO₄

In order to investigate the effects of NPs on the protein pattern, 2D protein gels of equal amounts of protein crude extract, from three independent cultures, were carried out. The gels were silver stained and analyzed with Delta 2D software: protein patterns from the crude extracts obtained after growth in LB medium were compared with the protein patterns of crude extracts obtained after growth in the presence of NPs or ZnSO₄. Despite a mortality of 40% after the addition of 130 µg/

ml of TiO₂ for 1 h, no significant difference was detected between the protein pattern from bacteria grown in LB medium and TiO₂ stressed bacteria (Fig. 2a, b). In contrast, Delta 2D software analyses of the protein patterns of cells grown in the presence of ZnO NPs or ZnSO₄ highlighted 23 spots (Fig. 2a, c, d), which were differentially expressed by a factor equal to or greater than 1.5 with a p-value lower than 0.05 in a two-tailed t-test. With the exception of YqjI, all highlighted spots showed the same profile in the presence of ZnO NPs and ZnSO₄ (Table 1). The proteins were identified by mass spectrometry. Proteins affected by ZnO NPs or ZnSO₄ stress were assigned to two main classes: proteins related to central metabolism and proteins related to the stringent response.

3.3. Metabolic reorientations

Pentose pathway and TCA shift: twelve modulated proteins were related to central metabolism: MetE and MccB are related to cysteine metabolism, OdhA, AspB, IolD, AnsB, PdhB and YtsJ to the Krebs cycle and XylA, YqjI, Dm and Tal to the pentose phosphate pathway (PPP) (Fig. 3). The two main enzymes involved in the oxidative branch and the non-oxidative branch of the PPP, YqjI and Tal, respectively, were increased after the addition of ZnO NPs or ZnSO₄. The non-oxidative branch converts ribose-5-phosphate back to glucose-6-phosphate, the substrate for the oxidative branch. The Tal enzyme, which catalyzes the reversible transfer of a dihydroxyacetone moiety derived from fructose-6-phosphate to D-erythrose-4-phosphate, forming D-sedoheptulose-7-phosphate and releasing D-glyceraldehyde-3-phosphate, is a rate-limiting enzyme in the non-oxidative branch of the pathway in eukaryotic cells [44]. Via the oxidative branch, the pentose phosphate pathway is responsible for the generation of NADPH, which contributes to cellular defenses against oxidative stress. YqjI, which is the principal 6-P-gluconate dehydrogenase [45], was the only spot showing different profiles with ZnO NPs and ZnSO₄; its intensity increased in the presence of ZnO and was not significantly modified by ZnSO₄. The second main metabolic effect of ZnO NPs and ZnSO₄ was a reorientation of the Krebs cycle; the

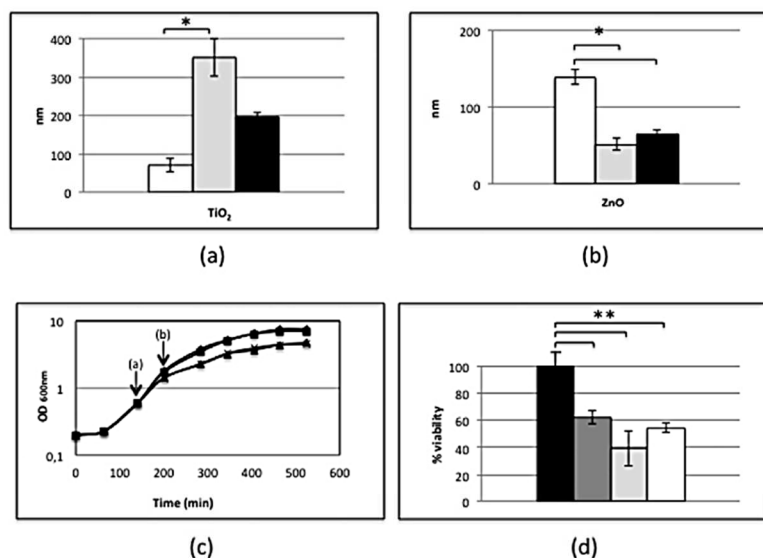


Fig. 1. DLS and viability measurements. DLS measurements using a Wyatt Dynapro Nanostar instrument of (a) TiO₂ and (b) ZnO nanoparticles in different freshly prepared solutions: white for H₂O, gray for LB medium, black for conditioned LB medium (see Experimental procedures, section 2.3). (c) Viability measurements: all the assays were performed in triplicate with at least two technical replicates. The viability frequencies were normalized by the value obtained with the control. Normalized viability frequency of the control (LB) and the bacteria stressed with TiO₂, ZnO or ZnSO₄ are respectively represented in black, dark gray, soft gray and white histograms. Error bars $\pm$ 1SD ($n \geq 3$). Asterisks * and ** indicate significant differences $p < 0.05$ and $p < 0.006$, respectively.

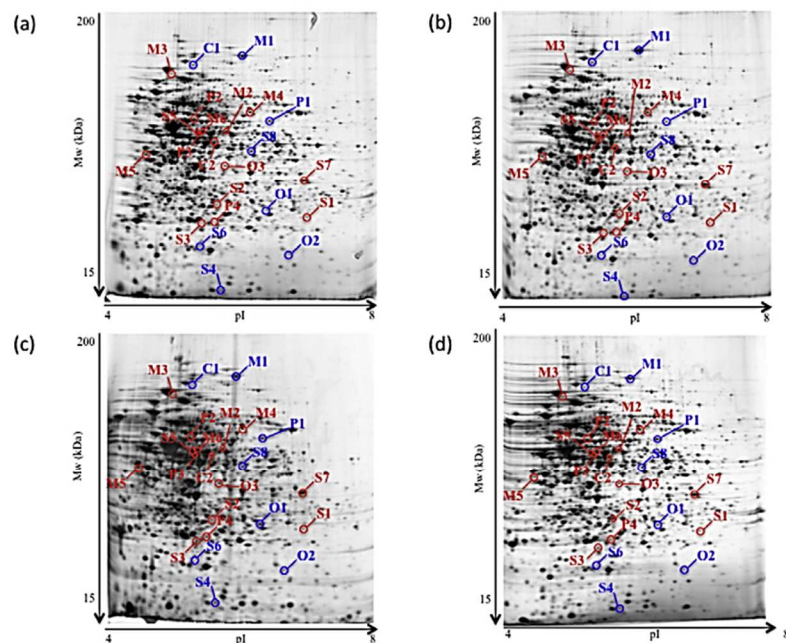


Fig. 2. 2D DE gels of 168 *Bacillus subtilis* strain after ZnO or ZnSO₄ stresses. Total protein extracts of *B. subtilis* 168 were separated by two-dimensional gel electrophoresis. The first dimensions covered a pH range of 4–8 and the second dimension was in the range of 15–200 kDa. Total cellular proteins (120 µg) were loaded on the first dimension gel, and the spots were detected by silver staining. (a) Gel obtained from the bacteria grown on LB medium, (b) gel obtained from bacteria stressed with 130 µg/ml TiO₂ for 1 h, (c) gel obtained from bacteria stressed with 170 µg/ml ZnO or 0.3 mM ZnSO₄ for 1 h and (d) gel obtained from bacteria stressed with 0.3 mM ZnSO₄ for 1 h. The arrows point to spots that showed reproducible and statistically significant changes between the control conditions (LB) and the stress conditions (ZnO or ZnSO₄).

enzymes YtsJ, AspB and AsnB were significantly increased while OdhB was decreased. The activity of YtsJ, a malate dehydrogenase, described to function with both cofactors NAD or NADP [40,46], measured in the different crude extracts, was increased in all stressed conditions (Fig. 4a, b). These modifications in expression lead to a partial shunt of the Krebs cycle in the part from α -ketoglutarate to malate, in a way to increase the production of NAD(P)H and to release free CoA-SH in response to stress induced by ZnO NPs or ZnSO₄ (Figs. 3 and 4a, b).

Thiol metabolism: MetE and YrhB enzymes are involved in cysteine metabolism in opposite ways: MetE catabolizes the synthesis of methionine and YrhB catabolizes the synthesis of cysteine (Fig. 5). Their expressions were also modified in opposite ways in the presence of ZnO NPs or ZnSO₄ salt: YrhB was increased and MetE was decreased (Fig. 5, Table 1). The modifications in MetE and YrhB expression and the reorientation of central metabolism let us infer an increase in cysteine and CoA-SH concentrations in the cell under stress conditions (ZnO NPs and ZnSO₄ salt). The CoA-SH concentration on one hand and the ratio of free sulfhydryl groups/protein-bound sulfhydryl groups on the other were therefore measured in the presence or absence of NPs or Zn salt stress (Fig. 4c, d). The proportion of free sulfhydryl was significantly increased in the presence of ZnO NPs and ZnSO₄, whereas the CoA-SH concentration was increased in all stress conditions, ZnO and TiO₂ NPs and ZnSO₄. *B. subtilis* possesses three main low molecular weight (LMW) thiols, CoA-SH, cysteine and bacillithiol. Ma and colleagues [47] showed that bacillithiol is the major buffer of labile zinc in *B. subtilis*, so most of the increase in free thiol in the presence of ZnO NPs and ZnSO₄ was probably the result of an increase in bacillithiol. The increasing of free intra cellular thiols following a stress with ZnO or Zn salt, was probably the consequence of an increasing of intracellular [Zn], in a concentration exceeding the physiological concentration. The intra cellular [Zn] was measured in all conditions. Fig. 6b shows that in

the presence of Zn, nanoparticles or salt, the intracellular [Zn] was increased by four to six-fold, respectively.

The LMW thiols, in particular bacillithiol, are often described to play roles in the protection of cells against a variety of stresses, including oxidative stress [48–52]. To test the hypothesis of oxidative stress induction by ZnO NPs or ZnSO₄, catalase activity was measured in all conditions. Fig. 6a shows that catalase activity was unchanged in the presence of TiO₂ NP, but increased by two-fold in the presence of ZnO, by four-fold in the presence ZnSO₄ and by three-fold in the presence of H₂O₂ compared to the levels in control bacteria grown in LB medium. Taken together, the protective role of LMW thiols, the probable increase in NAD(P)H and the increased activity of catalase suggest that ZnO NPs and ZnSO₄ induce oxidative stress and/or thiol chelation stress in *B. subtilis*.

3.4. Stringent response

The other main pattern affected by ZnO and ZnSO₄ was the stringent response. Nine proteins involved or controlled by the stringent response had their expression profile modified in the presence of ZnO NPs or ZnSO₄: YwaC, SigH, YtxH, YtzB, TufA, RplJ, RpsB and Mbl (Fig. 2, Table 1). SigH is a sigma factor that controls the transcription of many genes involved in the transition from exponential growth to the stationary phase, including the initiation of spore formation and entry into the genetic competence state. Tam Le and collaborators [53], Eymann and colleagues [54] have shown that sigmaH activity and the stringent response are linked.

YwaC is a GTP pyrophosphokinase that catalyzes the synthesis of ppGpp, the alarmone produced during the stringent response in response to number of nutritional or environmental stresses [55–58]. *B. subtilis* possesses three ppGpp synthases: RelA, YjbM and YwaC. RelA is a bifunctional enzyme that synthesizes and hydrolyses ppGpp, while YjbM and YwaC

Table 1

Differentially-expressed proteins identified in the proteomic screen. Comparison between 168 cytosolic crude extracts from 168 *Bacillus subtilis* strains grown in LB medium with or without stress (ZnO nanoparticles or ZnSO₄ salt stress) (Fig. 2) (1) Spot number pointed out in Fig. 2, (2) accession number from UniProtKB, (3) protein function described by UniProtKB, (4) molecular weight, (5) pI, (6) number of peptides identified by mass spectrometry (7) percentage of coverage, (8) and (10) average quantification of the spot using Delta2D software from three independent 2-DE gels in the control, (9) and (11) standard deviation of the considering spot growth condition and (9) ratio of the average quantification determined by the Delta 2D analysis: stressed/not stressed.

Protein				Known regulon		Mass spectrometry data		Delta 2D data				
No.	Symbol	UniProt accession number	Function	PM (Da)	pI		nb peptides	Percentage sequence coverage	Ratio mean % volume ZnO/mean % volume LB	t-Test mean % volume ZnO/mean % volume LB	Ratio mean % volume ZnSO ₄ /mean % volume LB	t-Test mean % volume ZnSO ₄ /mean % volume LB
Stringent response												
S1	YwaC	P39583	GTP pyrophosphokinase	24,600	6.2	SigM, SigW	2	14%	7.2	96.5	5.8	99.7
S2	SigH	P17869	RNA polymerase sigma-H factor	25,448	5.1	AbrB	7	47%	0.6	98	0.6	99.8
S3	YtdH	P40780	Uncharacterized protein	16,555	5.1	SigB, SigH, stringent response	4	32%	1.7	98.1	1.3	51.6
S4	YtrB	O32065	Uncharacterized protein	11,666	8.1	stringent response	3	52%	0.6	97.4	0.7	90.5
S5	TufA	P33166	Elongation factor Tu	43,593	4.7	stringent response	10	44%	2.3	97.3	2.4	94.1
S6	RplJ	P42923	50S ribosomal protein L10	18,078	5.5	stringent response	2	17%	0.6	98.3	0.6	98.4
S7	RpsB	P21464	30S ribosomal protein S2	27,968	6.2	stringent response	10	51%	3.2	93.8	2.5	97.4
S8	Mbl	P39751	MreB-like protein	35,861	5.7	stringent response, sigE	12	46%	0.5	95.9	0.5	97.8
Metabolism												
Cysteine metabolism												
C1	MetE	P80877	5-Methyltetrahydropteroyltyrosylglutamate-homocysteine methyltransferase	86,808	4.8	S-box	17	31%	0.4	99.8	0.6	87.6
C2	MecB	O05394	Cystathionine gamma-lyase	40,886	5.2	CymR, Spx	10	44%	1.5	97.6	2.1	98.0
Central metabolism												
M1	OdhA	P23129	2-Oxoglutarate dehydrogenase E1 component	106,280	5.9	CcpA	31	43%	0.6	92.9	0.5	98.0
M2	AspB	P53001	Aspartate aminotransferase	43,089	5.3	constitutive expression	8	36%	1.6	99.9	1.6	92.3
M3	IolD	P42415	3D-(3,5,4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione hydrolase	70,381	5.1	CcpA, IolR	17	42%	0.6	99.4	0.6	97.3
M4	AnsB	P26899	Aspartate ammonia-lyase	52,505	5.6	AnsR	7	29%	2.0	97	1.3	79.2
M5	PdhB	P21882	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	35,474	4.5	stringent response	11	53%	1.8	99.4	1.8	99.7
M6	YtsJ	O34952	Probable NAD-dependent malic enzyme 4	43,667	5.1	unknown	16	66%	1.4	94.9	2.0	98.8
Pentose pathway												
P1	XylA	P0C180	Xylose isomerase	50,283	5.6	CcpA, XylR	11	36%	0.5	97.6	0.4	98.7
P2	YqiI	P80859	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	51,776	5.1	Unknown	20	67%	2.5	99.8	0.9	60.2
P3	Drn	P46353	Phosphopentomutase	44,020	4.9	CcpA	14	52%	2.3	97.3	2.4	94.1
P4	Tal	P19609	Transaldolase	22,972	5.9	Unknown	3	20%	2.9	98.3	2.5	95.5
Other												
O1	FabI	P71079	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADPH]	27,178	5.9	SigG, SpoVT, YthP	6	35%	0.6	96.3	0.6	98.4
O2	QcrA	P46911	Menaquinal-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	18,736	6.1	AbrB, CcpA, ResD	5	43%	0.6	99	0.6	95.8
O3	Nfo	P54476	Probable endonuclease 4	33,069	5.4	SigG	6	34%	1.6	99.8	1.2	80.3

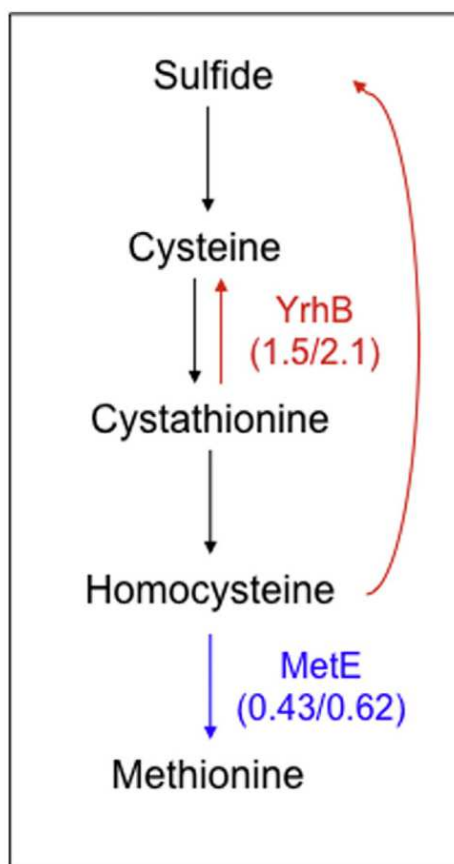


Fig. 5. Cysteine-methionine metabolism. Values associated with YrhB and MetE refer to their expression modulations after a ZnO or ZnSO₄ stress compared to the (LB) control (Table 1).

4. Discussion

The proteomic analysis of *B. subtilis* in the presence of nanoparticles or of the corresponding metallic ions showed that, despite 40% mortality, TiO₂ NPs led to no significant modification in the protein pattern, while ZnO NPs and ZnSO₄ led to important modifications in cell physiology. TiO₂ had no detectable effect on the *B. subtilis* proteome, but although the free SH ratio was unchanged, Fig. 4c and d show a significant increase in CoA-SH and sporulation after TiO₂ incubation, respectively. These observations led us to suppose that TiO₂ nanoparticles induce a stress which is not an oxidative stress leading to an increased expression of catalase, but to which cells probably respond via the activation of sporulation and of some parts of the oxidative stress pathway response, through not in a way detectable via 2D gels analysis.

Oppositely ZnO nanoparticles and ZnSO₄ salt induce marked responses in bacteria: the opposite response to that caused by TiO₂ considering obvious stress with metabolic reorientation and activation of the stringent response. The presence of Zn in the form of NPs or salt induced reorientation of central metabolism in a way to protect the cell by the production of NAD(P)H and free thiols. The diversion of methionine sulfur to cysteine is hypothesized to increase the concentration of low-molecular weight biothiols, in particular bacillithiol, which serves to maintain the reduced environment of the cytoplasm and/or to generate

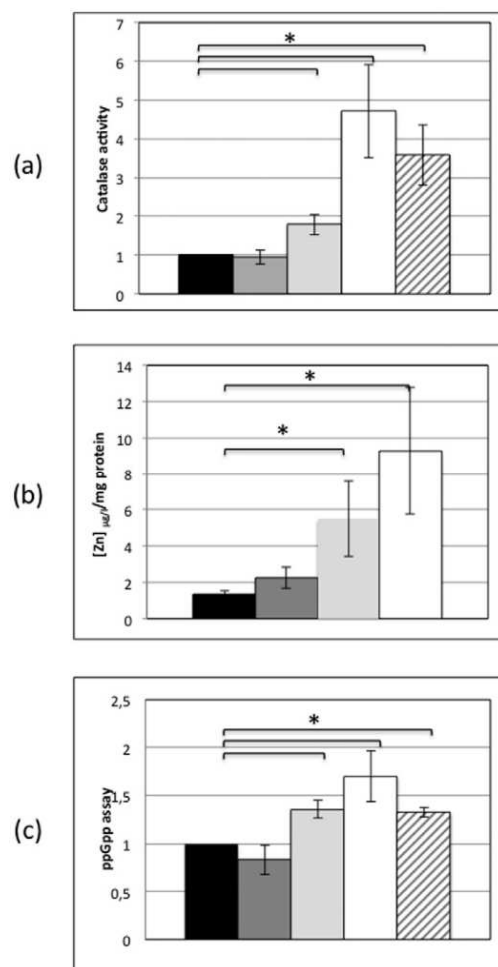
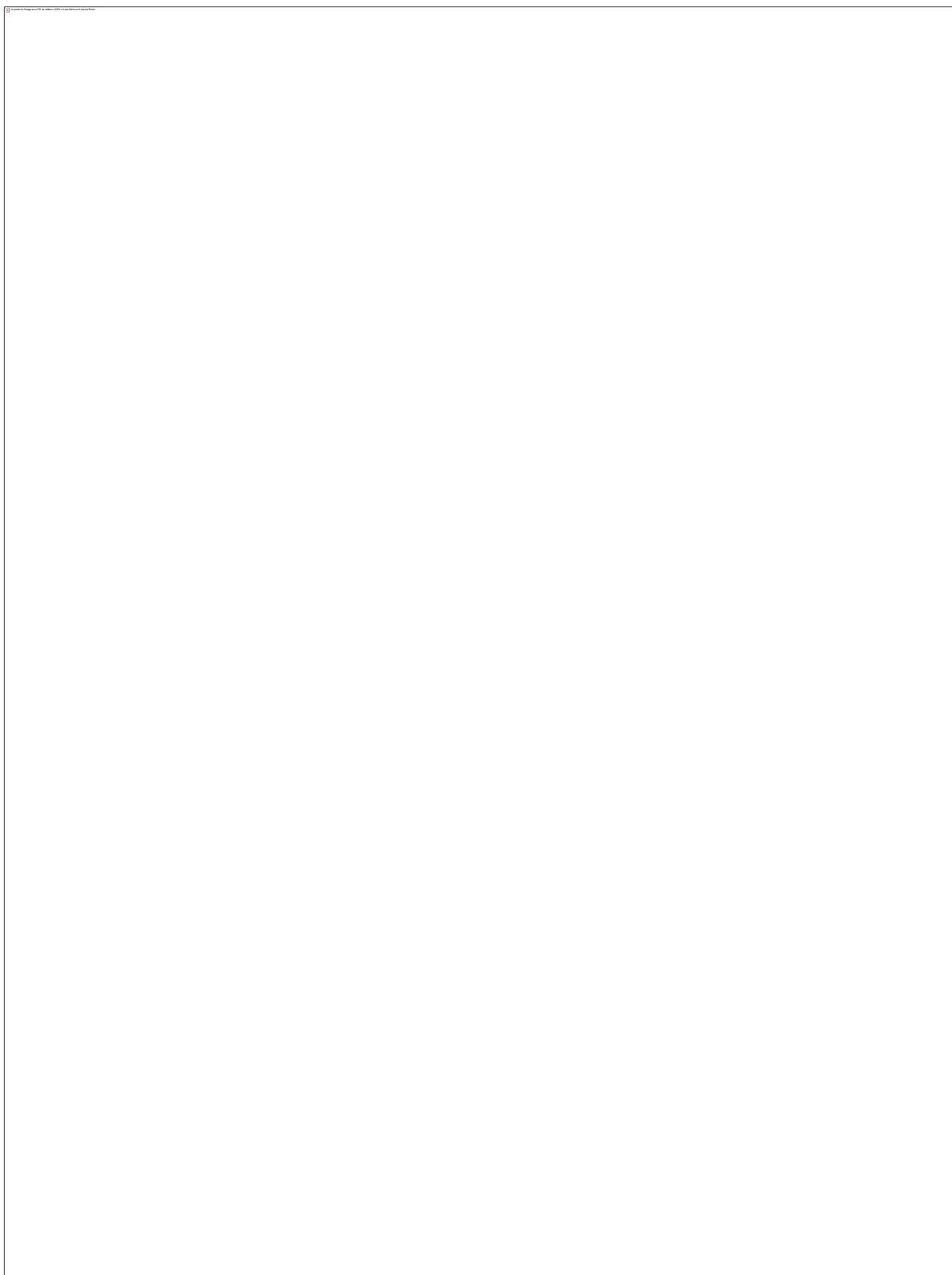
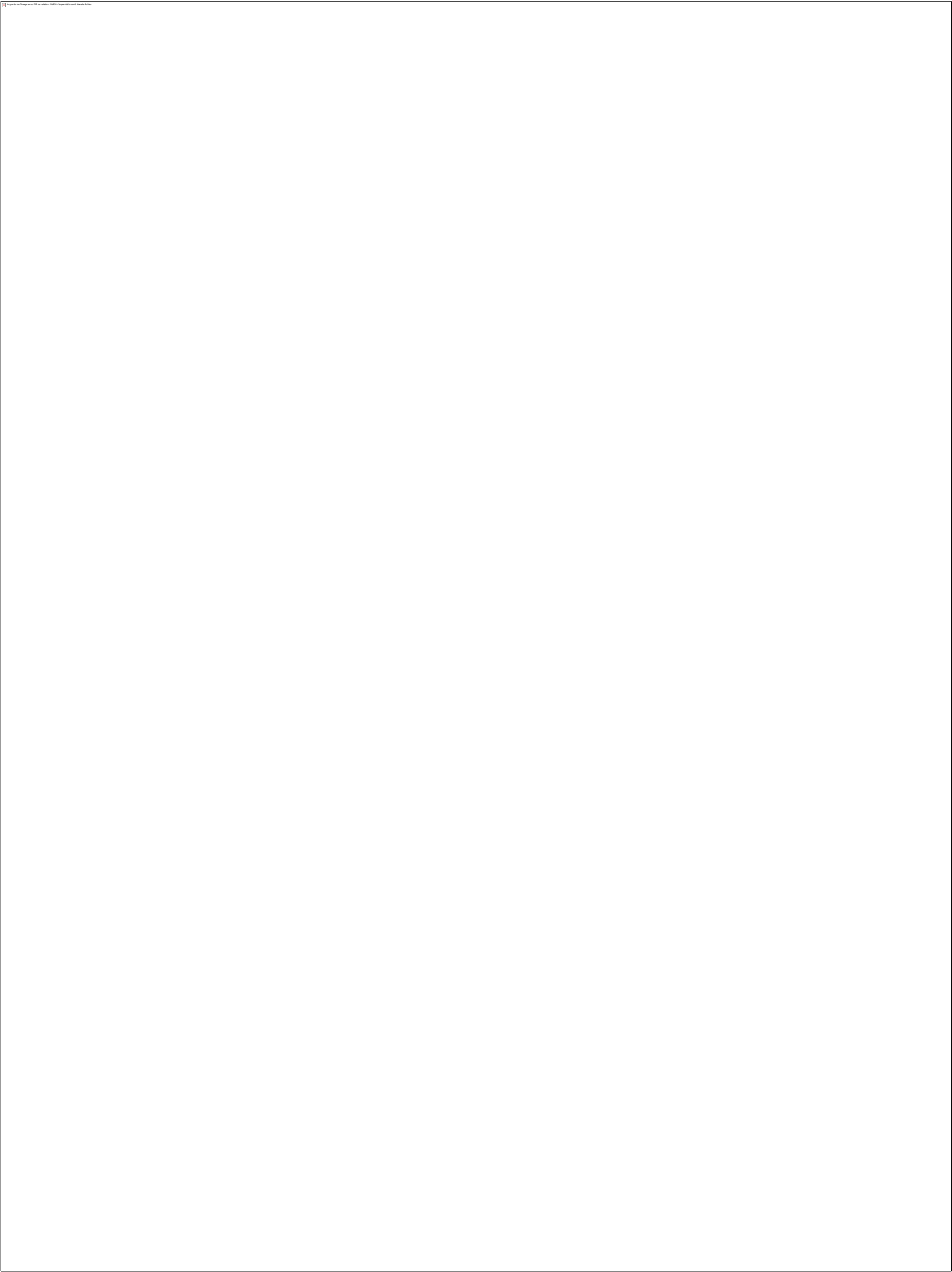
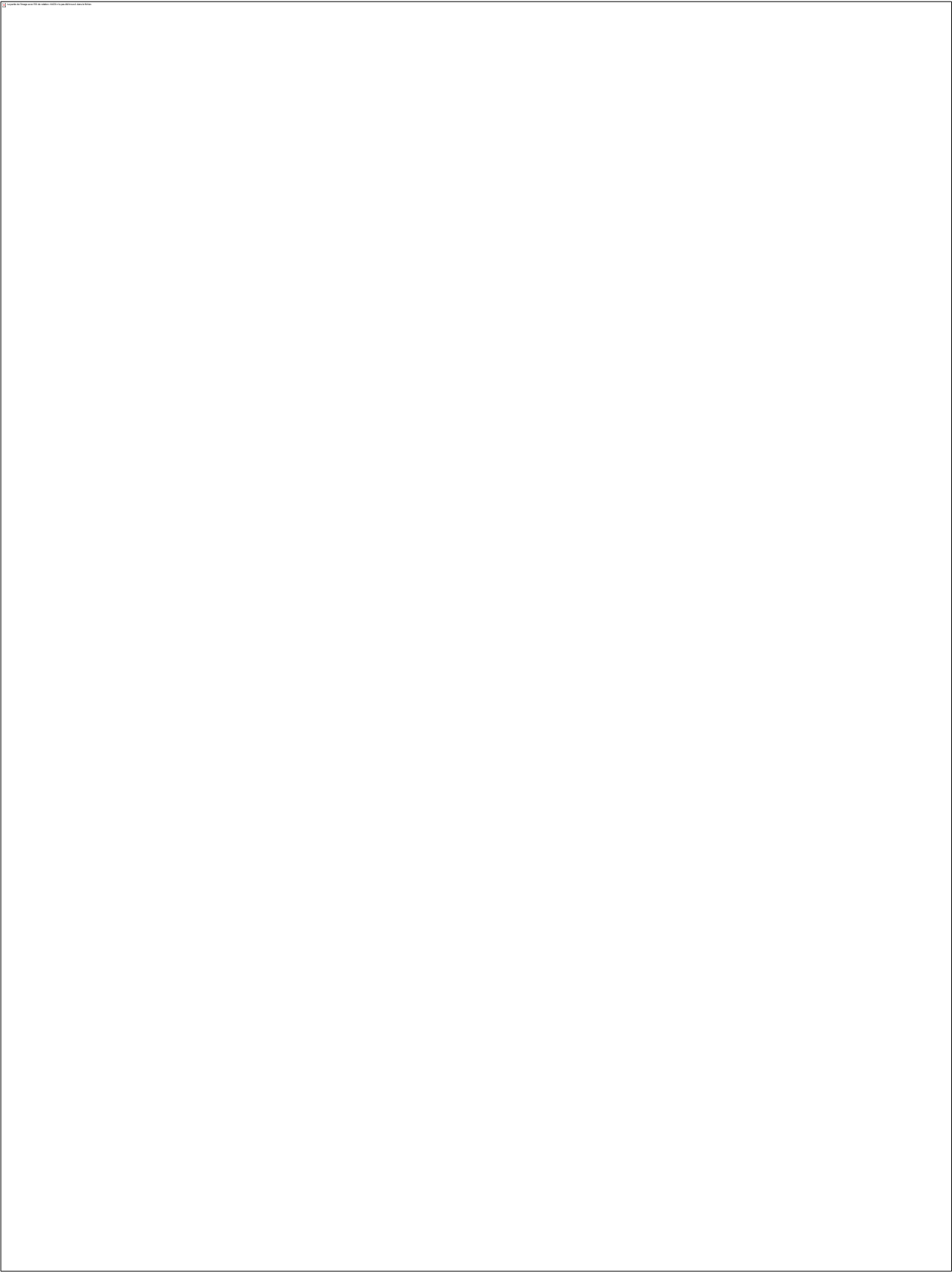


Fig. 6. Histograms in (a), (b) and (c) show catalase activity, intracellular Zn concentration/mg protein and ppGpp assays, respectively. All the assays were performed in triplicate and at least two technical replicates. The results were normalized by the value obtained with the control (cells grown in LB medium at the same time as the stressed cells). Assays with the control bacteria (LB medium) and the bacteria stressed with TiO₂, ZnO, ZnSO₄ and (a) 5 mM H₂O₂ or (c) 1% norvaline are respectively represented in black, dark gray, light gray, white and dashed gray histograms. Error bars $\pm$ 1 SD ($n \geq 3$). Asterisk indicates significant differences $p < 0.05$.

mixed disulfides in order to protect protein thiols from irreversible oxidation [59]. Moreover, cysteine is a substrate for the synthesis of CoA and very likely a substrate for the production of bacillithiol [50]. ICP assays have shown that [Zn] intracellular was significantly increased after a stress with the ZnO nanoparticles or Zn salt. The effects observed with Zn led us to suppose that ZnO nanoparticles are dissolved, the Zn salt enter into the cell and thus disturb cell homeostasis. Zn is redox-inert but has a high affinity for the side chains of Cys, Asp, Glu and His. Naturally, Zn binds proteins at structural sites or at the catalytic site of enzymes. When metal ions exceed their physiological concentration, they bind to enzymes, leading most of the time to their inhibition [60, 61]. In most of the studied enzymes, Zn bound to cysteine thiols, are involved in the structural or catalytic site. This binding to cysteine has two consequences on cell metabolism: first, it modifies the balance between free cysteines and disulfide bridges involved in combating oxidative







2. Annexe 2 : Principe de l'ICP-AES

Un spectromètre ICP-AES peut se décomposer en quatre parties :

Un système d'introduction de l'échantillon : Dans un premier temps, avant le passage dans la source d'excitation (plasma) l'échantillon est transformé en aérosol. Pour cela, il va passer dans un nébuliseur qui permet de transformer notre échantillon liquide en aérosol, grâce à l'interaction avec un gaz. Les gouttelettes de l'aérosol formé sont sélectionnées par sédimentation dans une chambre de nébulisation (Figure 47), afin que seules les gouttelettes les plus fines passent dans le plasma. En raison de la forme de cette chambre, les fines gouttelettes sont dirigées vers le haut en direction du plasma, tandis que les grosses gouttelettes sont dirigées vers le bas de la chambre où elles seront évacuées.



Figure 49: La chambre de nébulisation cyclonique.

- **Une source d'excitation** : Dans un second temps l'échantillon est excité dans un plasma. Le plasma est le quatrième état de la matière après le solide, le liquide et le gaz (Figure 38). Il est obtenu après application d'une très haute température ou d'un champ électromagnétique intense, ce qui provoque une séparation des constituants des atomes. Ainsi, le noyau et les électrons se déplacent alors indépendamment et forment un mélange neutre : le plasma. Un plasma peut donc être considéré comme un mélange d'ions chargés positivement et d'électrons chargés négativement. Le plasma le plus utilisé en ICP est le plasma d'argon, car l'argon ne se recombine pas avec les espèces chimiques de façon

stable et possède un potentiel d'ionisation très élevé (15,6 eV), qui permet l'excitation de la majorité des ions.

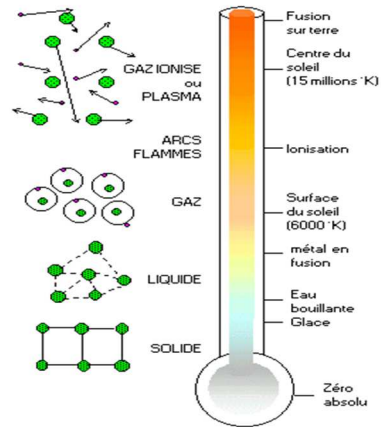


Figure 50: Les différents états de la matière.

- Un système de détection :

Le système de détection détecte l'émission des photons émis lors du retour à l'état fondamental des atomes excités. L'énergie des photons libérés étant spécifique d'un élément, la quantification devient possible. La lumière émise de l'élément recherché est alors détectée et mesurée, son intensité est comparée à celle émise par le même élément contenu dans un échantillon de concentration connu (étalon), lui-même analysé dans les mêmes conditions.

L'ICP-AES permet donc après minéralisation de quantifier un matériau dans un échantillon, tel qu'une culture bactérienne.

3. Annexe 3 : Communications scientifiques

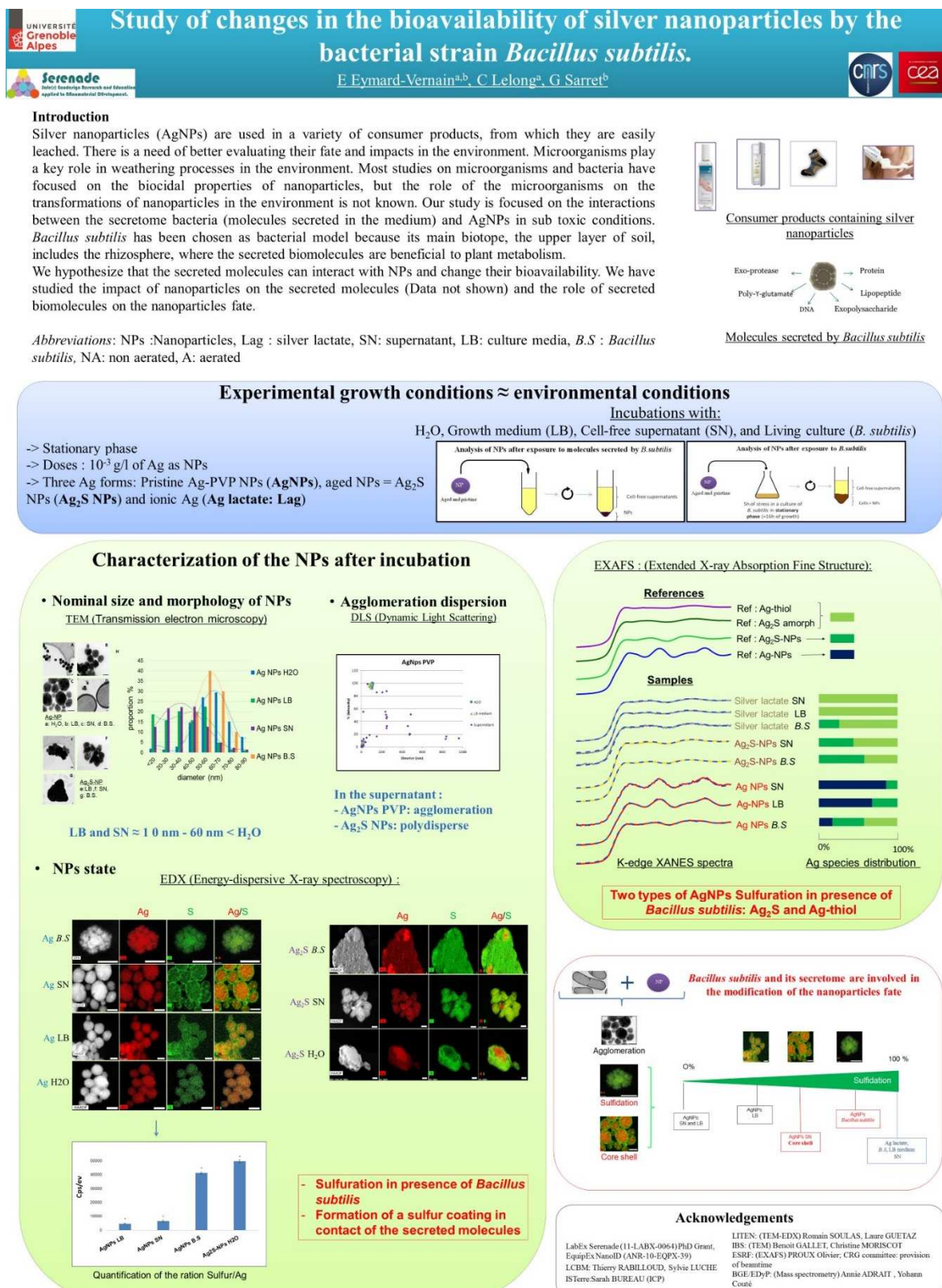
Présentation orale :

- Labex SERENADE (Carry-le Rouet, France) -2015
- Séminaire jeune chercheurs (CEA Grenoble, France) -2016
- Labex SERENADE (Aix en Provence, France) -2016

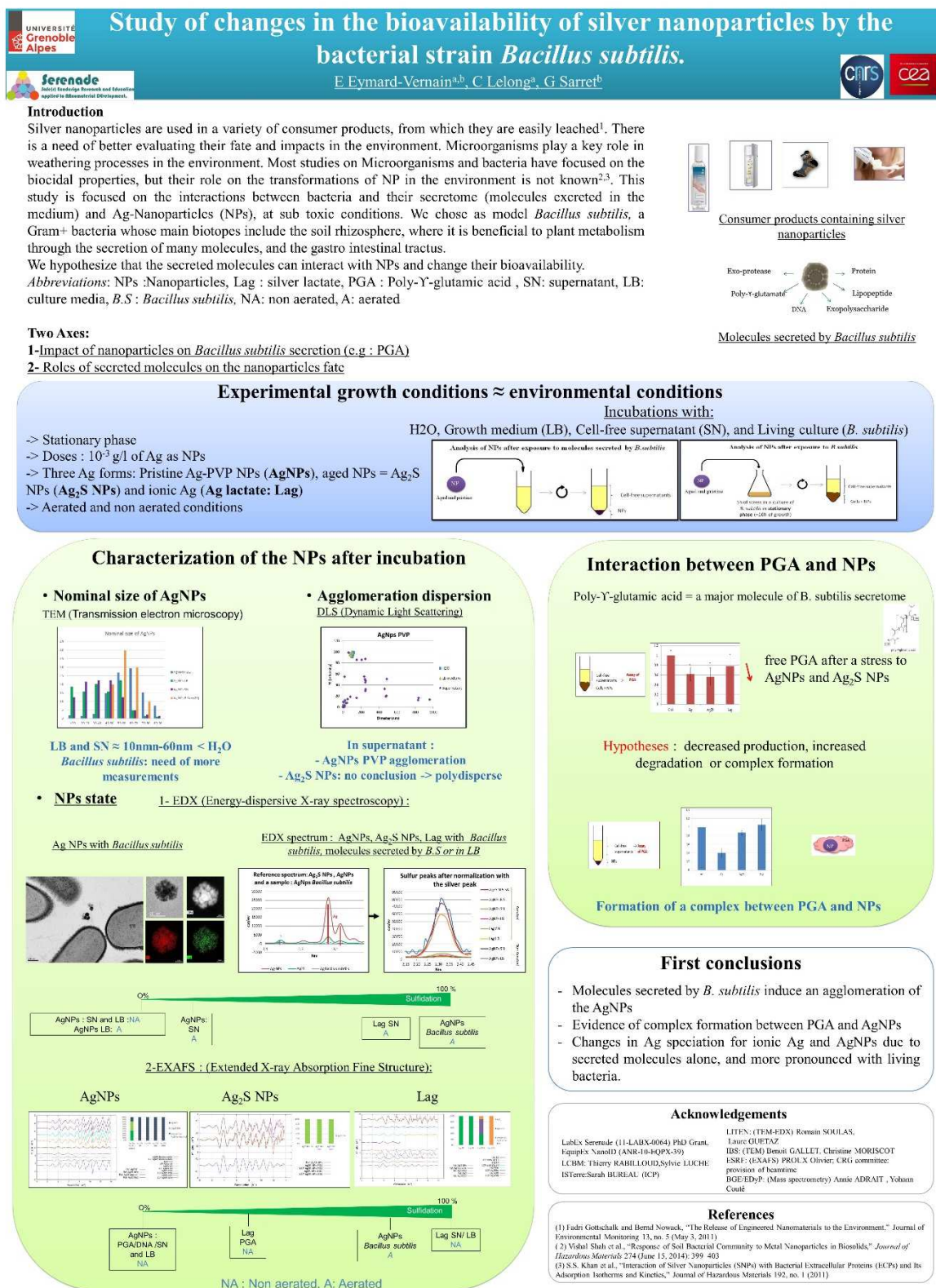
Poster :

- Conférence internationale Bacilli et Gram ⁺ (Berlin, Allemagne) -2017
→ Annexe 4
- Séminaire national pour la fondation Rovaltain (Valence, France) -2016
- Conférence internationale Nanosafe (Grenoble, France) -2016
→ Annexe 5
- École doctorale EDCSV (Grenoble, France) -2016
- Journée de l'institut BIG (Grenoble, France) -2016
- Conférence internationale Bacilli et Gram ⁺ (Montecatini, Italie) -2015
→ Annexe 6
- Nouveau doctorant CEA (Porquerolles, France) -2015

4. Annexe 4 : Poster de la conférence *Bacilli* Gram+ 2017



5. Annexe 5 : Poster de la conférence Nanosafe 2016



(a) Pro-MD team, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR 5249, CNRS, CEA, Univ. Grenoble Alpes, iRTSV, Grenoble, France
(b) Geochemistry Group, ISTERre, UMR 5275, CNRS, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble, France

elise.eymardve@hotmail.fr
elise.eymard-vernain@cea.fr

6. Annexe 6 : Poster de la conférence *Bacilli* Gram+ 2015

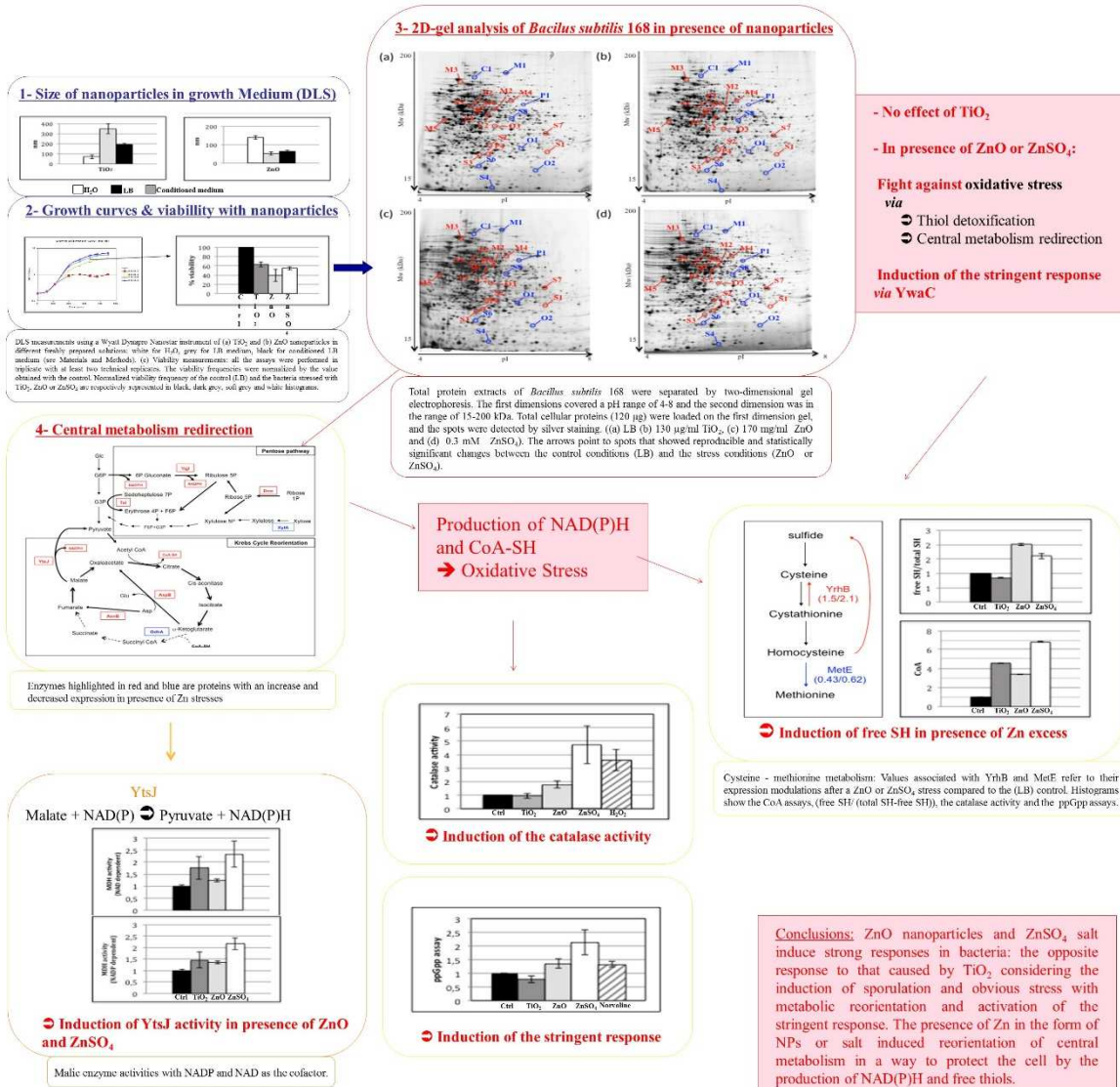


ZnO induces the stringent response and the reorientation of the central metabolism in *Bacillus subtilis*

S Luche¹, E Eymard-Vernain¹, H Diemer^{2,3}, A Van Dorsselaer^{2,3}, T Rabilloud⁴, and C Lelong¹



Microorganisms, such as bacteria, are one of the first targets of nanoparticles in the environment. In this study, we tested the effect of two nanoparticles, ZnO and TiO₂, with the salt ZnSO₄ as the control, on the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* by 2D gel electrophoresis-based proteomics. Despite a significant effect on viability (LD₅₀), TiO₂ NPs had no detectable effect on the proteomic pattern, while ZnO NPs and ZnSO₄ significantly modified *Bacillus subtilis* metabolism. These results allowed us to conclude that the effects of ZnO observed in this work were mainly attributable to Zn dissolution in the culture media. Proteomic analysis highlighted twelve modulated proteins related to central metabolism: MetE and MccB (cysteine metabolism), OdhA, AspB, IolD, AnsB, PdhB and YtsJ (Krebs cycle) and XylA, YqjI, Drm and Tal (pentose phosphate pathway). Biochemical assays, such as free sulphydryl, CoA-SH and malate dehydrogenase assays corroborated the observed central metabolism reorientation and showed that Zn stress induced oxidative stress, probably as a consequence of thiol chelation stress by Zn ions. The other patterns affected by ZnO and ZnSO₄ were the stringent response and sporulation. Eight proteins involved in or controlled by the stringent response and/or sporulation showed a modified expression profile in the presence of ZnO NPs or ZnSO₄: YwaC, SigH, YtxH, YtzB, TufA, RplJ, RpsB and Mbl. An increase in the ppGpp concentration and a decrease in the sporulation level confirmed the involvement of the stringent response and its link with sporulation during Zn stress. All these metabolic reorientations in response to Zn stress were probably the result of complex regulatory mechanisms including at least the stringent response *via* YwaC.



(1) Pro-MD team, Université Joseph Fourier, CEA Grenoble, IRISV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UF, Grenoble
 (2) Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, IPIC, Université de Strasbourg, 25 rue Bequerel 67087 Strasbourg, France
 (3) CNRS, UMR7178, 67087 Strasbourg, France
 (4) Pro-MD team, UMR CNRS 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UF, Grenoble

Résumé

Les nanoparticules métalliques sont utilisées dans une large gamme de produits, ce qui a pour conséquence un rejet croissant de ces nanoparticules et de leurs produits secondaires dans l'environnement. Il est donc nécessaire d'évaluer leur devenir et leurs impacts dans l'environnement. Les bactéries constituent l'une des premières cibles des nanoparticules. La plupart des études se limitent à des analyses de mortalité et ne prennent pas en compte les transformations des nanoparticules dans l'environnement. Cette étude se concentre sur un modèle bactérien, *Bacillus subtilis*, dont les biotopes principaux incluent la rhizosphère du sol et le tractus gastro intestinal, et sur trois nanoparticules : Ag-NPs, ZnO-NPs et TiO₂-NPs. Nous évaluons d'une part l'impact des nanoparticules sur le métabolisme de *Bacillus subtilis*, et d'autre part celui de l'activité bactérienne et en particulier des molécules sécrétées par *Bacillus subtilis* sur les nanoparticules, les deux étant interdépendants.

Abstract

Metallic nanoparticles are used in variety of consumer products (solar screen, paint or medicine), which results in an increasing release of nanoparticles in the environment. There is a need of better evaluating their fate and impacts in the environment. Microorganisms are one of the first targets of nanoparticles in the environment. Most studies on microorganisms and bacteria have focused on cellular mortality, and did not take into account possible transformations of NPs in the environment, which modify their toxicity. This study is focused on model bacteria, *Bacillus subtilis* and three nanoparticles: Ag-NPs, ZnO-NPs and TiO₂-NPs. We evaluate on one hand the impact of nanoparticles on the metabolism on the metabolism of *Bacillus subtilis*, and on the other hand the impact of *Bacillus subtilis* and of its secretome on the nanoparticles, both being mutually dependent.