



**HAL**  
open science

# Réponse au mercure et production de méthylmercure par une bactérie sulfato réductrice : Identification de déterminismes génétiques.

Sophie Barrouilhet

## ► To cite this version:

Sophie Barrouilhet. Réponse au mercure et production de méthylmercure par une bactérie sulfato réductrice : Identification de déterminismes génétiques.. Biologie cellulaire. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2022. Français. NNT : 2022PAUU3025 . tel-04363225

**HAL Id: tel-04363225**

**<https://theses.hal.science/tel-04363225>**

Submitted on 24 Dec 2023

**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

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

École doctorale des Sciences exactes et de leurs applications

Présentée et soutenue le 23 Mars 2022

par **Sophie BARROUILHET**

pour obtenir le grade de docteur

**Spécialité : Physiologie et biologie des organismes-populations-interactions**

Réponse au mercure et production de méthylmercure  
par une bactérie sulfato réductrice :  
Identification de déterminismes génétiques

## MEMBRES DU JURY

### RAPPORTEURS

- **Alexandre POULAIN** Professeur à l'Université d'Ottawa, Canada
- **Alain DOLLA** Directeur de recherche CNRS à l'Université Aix-Marseille, France

### EXAMINATEURS

- **Virginie CHAPON** Chercheuse au CEA, Cadarache, France
- **Mathilde MONPERRUS** Maître de conférences à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, France

### DIRECTEURS

- **Marisol GOÑI URRIZA** Maître de conférences à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, France
- **Marie-Pierre ISAURE** Maître de conférences à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, France



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs, Alexandre Poulain, professeur à l'Université d'Ottawa et Alain Dolla, directeur de recherche à l'Université Aix Marseille pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également Virginie Chapon, chercheuse au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives Cadarache qui a bien voulu faire partie de ce jury en qualité d'examinatrice.

Je tiens sincèrement à remercier toutes les personnes du projet GOBEAM à commencer par mes directrices de thèse Marisol Goñi Urriza et Marie Pierre Isaure pour leur confiance, leur disponibilité et pour l'ensemble des connaissances qu'elles m'ont enseigné au cours de ces trois années. Votre gentillesse et vos qualités de scientifiques ont été l'alliance parfaite pour cette thèse. Je remercie ensuite, mais pas moins sincèrement, Mathilde Monperrus pour m'avoir formée à la chimie analytique mais aussi pour sa bienveillance et son implication à toute épreuve. Merci à Maureen Le Bars, post doctorante dans le projet pour m'avoir appris la rigueur scientifique et pour m'avoir épaulée du début à la fin de cette thèse ainsi qu'à Ikram Bakour, doctorante sur le projet. La dynamique et l'ambiance au sein de ce groupe a été un réel atout pour mener à bien ce travail.

Je souhaite également remercier toute l'équipe ANAMINT et en particulier, Rémy Guyoneaud pour m'avoir formée à la culture bactérienne en anaérobiose et pour avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions, Bahia Khalfaoui Hassani pour son aide à la rédaction et dans la réflexion scientifique, Claire Gassie pour son efficacité exceptionnelle sans laquelle le projet n'aurait pas pris la même dimension et Diva Scuvée pour son appui expérimental et sa bonne humeur quotidienne.

Merci à l'IPREM de m'avoir accueillie et aux membres du pôle CME. Je veux remercier plus spécifiquement Emmanuel Tessier pour m'avoir fait pleinement confiance au cours des expériences de chimie analytique et pour son engagement dans ce projet. Merci à toutes les personnes travaillant au bâtiment IBEAS et surtout à Florence Hakil, Marion Guignard et Alice Baldy pour leur aide au quotidien et la gestion des ressources du laboratoire.

Finalement, je souhaite remercier l'ensemble de mes proches et amis pour leur soutien sans faille.





# Sommaire

Liste des abréviations .....	1
Liste des figures et des tables .....	3
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE I - Synthèse bibliographique .....</b>	<b>19</b>
1. Le cycle biogéochimique du mercure.....	21
1.1. Sources du mercure dans l'environnement .....	21
1.2. Devenir du mercure dans les compartiments environnementaux : transformations du mercure .....	23
1.2.1. Oxydation du mercure élémentaire .....	23
1.2.2. Réduction du Hg(II).....	24
1.2.3. Méthylation du Hg(II) et diméthylation du méthylmercure .....	27
1.2.4. Déméthylation du méthylmercure et du diméthylmercure.....	27
2. La méthylation du mercure : contexte environnemental .....	29
2.1. Les microorganismes impliqués dans la méthylation du mercure.....	29
2.2. Disponibilité du mercure pour les microorganismes dans les environnements anoxiques . .....	30
2.2.1. Effet des sulfures sur la disponibilité du mercure.....	31
2.2.2. Effet des thiols sur la complexation du Hg.....	33
2.2.3. L'assimilation du Hg(II) par les cellules méthylantes : active ou passive ? .....	35
3. La méthylation du mercure à l'échelle moléculaire.....	37
3.1. La réaction de méthylation du mercure : rôle des protéines HgcAB .....	37
3.1.1. Présentation de la réaction de méthylation du mercure .....	37
3.1.2. Structure des protéines HgcA et HgcB .....	39
3.2. Mécanismes de régulation en réponse aux métaux .....	42
3.2.1. La méthylation du mercure : un mécanisme régulé ?.....	42
3.2.2. La régulation transcriptionnelle : focus sur la famille ArsR-SmtB .....	43
3.2.2.1. Présentation de la famille ArsR-SmtB .....	43
3.2.2.2. Motifs de liaison aux métaux.....	46
3.2.2.3. Exemple de la protéine ArsR et l'opéron <i>ars</i> .....	48
3.2.3. Le mercure et la famille ArsR-SmtB.....	50
3.3. Systèmes de détection et de résistance en réponse aux métaux.....	52
3.3.1. Des systèmes de détection et de résistance au mercure chez les microorganismes méthylants ?.....	52

3.3.2.	Système de transduction du signal à deux composantes .....	53
3.3.2.1.	Rôle des systèmes de transduction du signal à deux composantes .....	53
3.3.2.2.	Mécanisme et domaines conservés des systèmes de transduction du signal à deux composantes .....	54
3.3.2.3.	Exemple de la famille Cpx : le système Zra .....	55
3.3.3.	Systèmes d'efflux.....	57
3.3.3.1.	Rôle et classification des systèmes d'efflux .....	57
3.3.3.2.	Mécanisme et domaines conservés des pompes à efflux de la famille RND.....	58
3.3.4.	Couplage systèmes de transduction du signal à deux composantes et systèmes d'efflux : exemple du système <i>cus</i> .....	61
4.	Objectifs de la thèse .....	63
<b>CHAPITRE II - Procédures expérimentales .....</b>		<b>65</b>
1.	Souches bactériennes et conditions de culture .....	67
1.1.	Souches bactériennes.....	67
1.1.1.	La bactérie méthylante <i>Pseudodesulfovibrio hydrargyri</i> souche BerOc1 .....	67
1.1.2.	La bactérie non méthylante <i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20.....	67
1.1.3.	<i>Escherichia coli</i> .....	67
1.2.	Conditions de culture .....	68
1.2.1.	Milieux de culture.....	68
1.2.2.	Condition d'inoculation des souches.....	72
1.2.3.	Cultures en présence de mercure .....	72
2.	Caractérisation physiologique des souches .....	76
2.1.	Production de biomasse .....	76
2.2.	Quantification du nombre de cellules par cytométrie en flux .....	76
3.	Génération de souches modifiées.....	78
3.1.	Vecteurs utilisés .....	78
3.2.	Génération de mutants de délétion chez la bactérie méthylante <i>Pseudodesulfovibrio hydrargyri</i> souche BerOc1 .....	79
3.2.1.	Principe de génération de mutant de délétion .....	79
3.2.2.	Construction du vecteur.....	80
3.2.3.	Transformation de la souche BerOc1 .....	84
3.2.4.	Vérification de l'échange d'allèle .....	86
3.3.	Expression hétérologue chez la bactérie non méthylante <i>Desulfovibrio alaskensis</i> souche G20 .....	89
3.3.1.	Principe de génération d'un hôte hétérologue .....	89
3.3.2.	Construction du plasmide .....	89
3.3.3.	Transformation de la souche G20 .....	90

4.	Expression génique.....	91
4.1.	Extraction et quantification des ARN .....	91
4.2.	Rétrotranscription des ARN.....	91
4.3.	Quantification de l'expression des gènes.....	94
4.3.1.	Principe et méthode d'analyse.....	94
4.3.2.	Standard externe et efficacité d'amplification d'un gène.....	94
4.3.3.	Amplification en temps réel .....	95
4.4.	Co transcription des gènes .....	95
5.	Analyses bio-informatiques.....	96
5.1.	Caractéristiques générales, domaines conservés et structure des protéines .....	96
5.2.	Comparaison de séquences : alignement multiple et relation évolutive.....	97
6.	Quantification des espèces du mercure et des sulfures .....	97
6.1.	Quantification des espèces mercurielles.....	97
6.1.1.	Echantillonnage et stockage pour quantification du mercure.....	97
6.1.2.	Principe de la dilution isotopique et caractérisation des standards de mercure .....	98
6.1.3.	Principe de la GC-ICPMS et préparation des échantillons.....	99
6.1.4.	Analyses des données .....	100
6.2.	Dosage des sulfures.....	100
6.2.1.	Principe du dosage des sulfures .....	100
6.2.2.	Echantillonnage et stockage pour dosage des sulfures .....	101
6.2.3.	Gamme d'étalonnage .....	101
6.2.4.	Quantification des sulfures.....	101
7.	Imagerie du mercure par nano-fluorescence X sur rayonnement synchrotron .....	101
8.	Tests statistiques .....	102

**CHAPITRE III -Etude physiologique de la bactérie *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1 pour mise au point d'un protocole de génération de souches mutantes de délétion.....** 103

1.	Introduction.....	105
2.	Résultats .....	106
2.1.	Etude physiologique de la souche BerOc1 en milieu liquide .....	106
2.1.1.	Impact du métabolisme sur la croissance de la souche BerOc1 .....	106
2.1.2.	Effet des sources de soufre sur la croissance de la souche BerOc1 .....	107
2.1.3.	Augmentation de la capacité de production de biomasse en respiration fumarate associée au sulfate. ....	108
2.2.	Mise au point du protocole de sélection et de criblage sur la souche BerOc1 .....	110
2.2.1.	Croissance de la souche BerOc1 sur milieu solide .....	110

2.2.2.	Résistance de la souche BerOc1 aux antibiotiques .....	111
2.3.	Mise au point du protocole de sélection et de criblage sur les souches transformées : génération de la souche $\Delta hgcB$ .....	112
2.3.1.	Etapes et paramètres clés dans le protocole de la sélection et du criblage .....	112
2.3.1.1.	Effet de la concentration en plasmide sur l'obtention de doubles recombinants ... .....	113
2.3.1.2.	Effet de la concentration en antibiotique : milieu liquide .....	113
2.3.1.3.	Effet de la concentration en antibiotique : milieu solide.....	115
2.3.2.	Bilan des conditions de transformations retenues .....	116
2.3.3.	Validation de la qualité du protocole optimisé : génération de nouvelles souches mutantes de délétion .....	117
3.	Conclusion .....	119
<b>CHAPITRE IV -Effet des sulfures exogènes et endogènes sur la production et l'export du méthylmercure chez les bactéries sulfato réductrices .....</b>		<b>121</b>
	Préambule .....	121
	Résumé.....	123
1.	Introduction.....	124
2.	Materials and methods .....	126
2.1.	Culture medium composition and growth conditions .....	126
2.2.	Hg methylation assays and Hg species partitioning .....	127
2.3.	<i>hgcA</i> expression assays and analyses.....	129
3.	Results and discussion.....	131
3.1.	Hg methylation is driven by sulfides .....	131
3.2.	Sulfides influence methylmercury partitioning.....	138
3.3.	The increase of Hg methylation in presence of sulfide is not associated to <i>hgcA</i> overexpression .....	142
4.	Conclusion .....	144
<b>CHAPITRE V -Cluster <i>arsRhgcAhgcB</i> et méthylation du mercure : focus sur la protéine ArsR.....</b>		<b>145</b>
	Préambule .....	145
1.	Introduction.....	147
2.	Résultats .....	148
2.1.	Caractéristiques de la protéine ArsR chez <i>P. hydrargyri</i> souche BerOc1.....	148
2.1.1.	Analyses <i>in silico</i> de la protéine ArsR .....	148
2.1.1.1.	Caractéristiques générales et structure secondaire de ArsR de BerOc1 .....	148
2.1.1.2.	Positionnement de la protéine ArsR de la souche BerOc1 au sein de la famille ArsR- SmtB .....	149

2.1.1.2.1.	Site de fixation du métal : groupe et classe .....	149
2.1.1.2.2.	Structure tertiaire de ArsR de BerOc1 .....	154
2.1.1.3.	Cibles de la protéine ArsR dans le génome de la souche BerOc1.....	155
2.1.1.4.	La protéine ArsR chez les autres souches méthylantes .....	156
2.1.2.	Expression du gène <i>arsR</i> en réponse au mercure chez la souche BerOc1 sauvage	157
2.1.3.	Coexpression du gène <i>arsR</i> au sein du cluster <i>arsRhgcAhgcB</i> .....	159
2.2.	Etude du mutant <i>arsR</i> .....	160
2.2.1.	Expression du gène <i>hgcA</i> chez la souche <i>P. hydrargyri</i> BerOc1 $\Delta$ <i>arsR</i> .....	160
2.2.2.	Physiologie de la souche <i>P. hydrargyri</i> BerOc1 $\Delta$ <i>arsR</i> : comparaison avec BerOc1 sauvage et BerOc1 $\Delta$ <i>hgcB</i> .....	161
2.2.3.	Sensibilité au Hg(II) et au MeHg de la souche BerOc1 $\Delta$ <i>arsR</i> .....	164
2.2.4.	Méthylation du Hg(II) et déméthylation du MeHg chez la souche BerOc1 $\Delta$ <i>arsR</i> ... ..	166
2.3.	Expression hétérologue du cluster <i>arsRhgcAhgcB</i> chez une bactérie non méthylante..	169
2.3.1.	Contrôles physiologiques : croissance et concentration en sulfure.....	169
2.3.2.	Méthylation du mercure par la souche G20+pK7 .....	171
3.	Conclusions et discussions .....	172
3.1.	La protéine ArsR: une réponse spécifique au mercure pour réguler la méthylation du Hg(II) ? .....	172
3.2.	La protéine ArsR : méthylation du Hg(II) ou déméthylation du MeHg ?.....	173

## **CHAPITRE VI -Identification d'un premier système de résistance au mercure chez les bactéries anaérobies : impact sur la localisation et la méthylation du mercure** .....

Préambule .....	175
1. Introduction.....	177
2. Materials and methods .....	179
2.1. Bacterial strains and growth conditions.....	179
2.2. Construction of BerOc1 $\Delta$ 470-467 mutant strain.....	179
2.3. Expression of genes, promoter prediction and, protein localization and function prediction of the cluster 472-466 .....	181
2.4. Mercury sensitivity assays.....	182
2.5. Mercury species partitioning and methylation assays.....	182
2.6. Mercury imaging assays .....	183
3. Results .....	184
3.1. Genomic structure in 472-466 cluster and Co-expression analysis .....	184
3.2. Hg(II) and MeHg resistance of BerOc1 wild type and BerOc1 $\Delta$ 470-467 mutant strains	187

3.3. Intracellular accumulation and Hg(II) methylation in BerOc1 WT and BerOc1 $\Delta 470-467$ strains .....	188
3.4. Mercury localization in BerOc1 WT and BerOc1 $\Delta 470-467$ mutant cells.....	191
4. Discussion .....	192
<b>CHAPITRE VII -Conclusions et perspectives .....</b>	<b>195</b>
1. Transformation du mercure et résistance.....	197
2. Une réponse plus globale que la transformation du Hg ?.....	199
3. Une réponse au mercure ubiquiste chez les bactéries méthylantes ? .....	202
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>205</b>

# Liste des abréviations

**aa** : acide aminé

**ADN (DNA)** : Acide DésoxyriboNucléique (*DesoxyriboNucleic Acid*)

**ADNc (cDNA)** : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire (*complementary DesoxyriboNucleic Acid*)

**ARN (RNA)** : Acide RiboNucléique (*RiboNucléique Acid*)

**As** : arsenic

**As(III)** : arsénite

**As(IV)** : arséniate

**ATP** : Adénosine TriPhosphate

**BFR (IRB)** : Bactérie Ferri Réductrice (*Iron reducing Bacteria*)

**Bi** : Bismuth

**bisMeHgS** : sulfure de bisméthylmercure (*bismethylmercury sulfide*)

**BSR (SRB)** : Bactérie Sulfato Réductrice (*Sulfate Reducing Bacteria*)

**CFeSP** : protéine fer-soufre à corronoïde

**CoA** : coenzyme A

**diMeHg** : mercure sous sa forme diméthylée ; diméthylmercure (*dimethylmercury*)

**DO (OD)** : Densité Optique (*Optical Density*)

**DR** : double recombinaison homologue (*double homologous recombination*)

**GC-ICPMS** : Chromatographie en phase Gazeuse - Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (*Gas Chromatography - Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

**Hg** : mercure (*mercury*)

**Hg(0)** : mercure sous sa forme élémentaire (*elemental mercury*)

**Hg(II)** : mercure sous sa forme oxydée; mercure inorganique (*inorganic mercury*)

**HgS** : sulfure de mercure (*mercury sulfide*)

**HK** : Histidine Kinase

**HTH** : domaine Hélice-Coude-Hélice (*Helix-Turn-Helix*)

**LD** : Limite de détection (*limit of detection*)

**LS** : coupleur donneur accepteur d'électron Lactate Sulfate

**MCP** : Protéines de Chimiotaxie acceptant le Méthyl (*Methyl-accepting Chemotaxis Proteins*)

**MeHg** : mercure sous sa forme monométhylée; méthylmercure (*methylmercury*)



**MM** : milieu Multipurpose (*Multipurpose Medium*)

**MMA** : monométhylarsenic

**nano-XRF** : fluorescence X sous rayonnement synchrotron à l'échelle nanométrique (*nano-scaled Synchrotron radiation based X-ray fluorescence*)

**ND (NA)** : Non Déterminée (*not available*)

**NG** : no growth

**pb (bp)** : paire de bases (*base pair*)

**PCR** : Réaction de Polymérisation en Chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)

**PF** : coupleur donneur accepteur d'électron Pyruvate Fumarate

**POE PCR** : Réaction de Polymérisation en Chaîne par extension prolongée du chevauchement (*Prolonged Overlap Extension Polymerase Chain Reaction*)

**PS** : coupleur donneur accepteur d'électron Pyruvate Sulfate

**qPCR** : Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

**RND** : Resistance Nodulation cell Division

**RT** : Rétro Transcription (Reverse Transcription)

**Sb** : antimoine

**SCM (MSC)** : Site de Clonage Multiple (*Multiple Cloning Site*)

**SR** : simple recombinaison homologue (*simple homologous recombination*)

**TA (rt)** : Température ambiante (*room temperature*)

**WT** : sauvage (*Wild Type*)

**YE** : extrait de levure (*Yeast Extract*)

**2CSS** : système de transduction du signal à deux composantes (*two component signal transduction system*)

# Liste des figures et des tables

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

- Figure I-1** : Bilan (en tonnes) mondial du mercure illustrant les compartiments environnementaux et les voies majeures impactant le cycle global du mercure (à partir du rapport sur l'évaluation mondiale du mercure par le Programme des Nations unies pour l'environnement (UNEP) de 2013. Valeurs mises à jour à partir de *Outridge et al. 2018*). ..... 22
- Figure I-2** : Implication des transformations du mercure dans le cycle biogéochimique du mercure. Les réactions sont représentées dans un environnement aquatique mais sont aussi valables pour les environnements terrestres. Espèces du mercure : Hg(0) (mercure élémentaire); Hg(II) (mercure oxydé); MeHg (méthylmercure); diMeHg (diméthylmercure). KatG (*Smith et al. 1998*), MerA (*Stanisich et al. 1977*), MerB (*Osborn et al. 1977*) et HgcAB (*Parks et al. 2013*) sont toutes des enzymes produites par les microorganismes pouvant transformer les espèces du mercure. .... 24
- Figure I-3** : Système de détoxification *mer*. (A) Organisation génomique de l'opéron *mer*. (B) Mécanisme de détoxification du mercure réalisé par les protéines codées par l'opéron *mer*. Espèce du mercure : Hg(II) (mercure oxydé); Hg(0) (mercure élémentaire); MeHg (méthylmercure); Hg-O-CO-CH<sub>3</sub> (phénylmercure acétate). CH<sub>4</sub> (méthane). La couleur des protéines se réfère aux gènes les codant (A). Le mécanisme des protéines codées par *merC*, *merG*, *merD* et *merE* n'est pas représenté. L'opéron *mer* peut faire intervenir la protéine MerH. Adapté de *Christakis et al. 2021*. .... 26
- Figure I-4** : Diversité phylogénique de la protéine HgcA (séquence protéique). Bleue: séquences d'HgcA mises en évidence par l'étude de Lin et ses collaborateurs (2021) en Colombie Britannique (Canada). Noir: séquences d'HgcA disponibles dans les bases de données. Orange: séquences d'HgcA prouvées expérimentalement. Gris: HgcA paralogues retrouvés chez des bactéries incapables de méthyler. Etoiles : séquences d'HgcA choisies arbitrairement dans chacun des groupes mis en évidence par l'étude de Lin et ses collaborateurs (15 au total) pour réaliser une autre approche. La classification taxonomique est indiquée à l'extérieur de l'arbre (*Lin et al. 2021*)..... 30
- Figure I-5** : Représentative schématique de l'impact des sulfures et de la cystéine (thiol) sur la méthylation du mercure. Les réactions majeures sont indiquées. Rouge : réactions conduisant à augmenter la production de méthylmercure (MeHg). Orange: réactions ayant des effets modérés sur la production du MeHg. Vert : réactions défavorisant la production de MeHg. Selon *Thomas et al. 2017* ; *Benoit et al. 1999* ; *Hsu-Kim et al. 2013* ; *Tian et al. 2021* ; *Lin et al. 2015* ; *Schaefer et al. 2009*. ..... 33
- Figure I-6** : Mécanismes de transfert du groupement méthyl. (A) Voie réductive de l'acétyl CoA. CO (monoxyde de carbone); CO<sub>2</sub> (dioxyde de carbone); CFeSP (protéine fer-soufre à corronoïde); CH<sub>3</sub> (groupement méthyl); red (réduit); ox (oxydé). (B) Voie hypothétique de la méthylation du mercure par les protéines HgcAB. Hg (mercure). Adapté de *Date et al. 2019*. .... 38
- Figure I-7** : Représentation de la structure des protéines HgcA et HgcB basées sur leurs séquences. Les cystéines essentielles à l'activité de ces protéines sont annotées. L'atome de Cobalt du cofacteur d'HgcA, la cobalamine, est noté Co tout comme les clusters fer soufre [4Fe-4S] suggérés comme jouant le rôle de cofacteur d'HgcB. TMD: domaines transmembranaires d'HgcA. CBD: domaine de liaison corronoïde (*Date et al. 2019*). .... 39
- Figure I-8** : Tests de sensibilité au Hg(II) réalisés sur des souches méthylantes (A) et des souches non méthylantes (B). Les souches ont été cultivées en fermentation pyruvate (*Gilmour et al. 2011*). ..... 41
- Figure I-9** : Organisation génomique des gènes *arsR*, *hgcA* et *hgcB* chez *P. hydrargyri* souche BerOc1. La direction des ORF est indiquée par les encadrés fléchés (selon *Goñi-Urriza et al. 2020*). .... 42

**Figure I-10** : Structure quaternaire des membres de la famille ArsR-SmtB (ici la protéine SmtB de *Synechococcus elongatus*). Ces régulateurs transcriptionnels s'associent en homodimères: une sous unité est représentée en gris et l'autre en noir. La structure secondaire caractéristique de cette famille ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 5$ ) est annotée et les sites de fixation des métaux  $\alpha 3N$  (liaison inter homodimérique) et  $\alpha 5$  (liaison intrahomodimérique) sont indiqués par des flèches. .... 44

**Figure I-11** : Mode d'action des régulateurs transcriptionnels. Les familles Fur, DtxR et NikR suivent classiquement un mode d'action de co-répression même si certains membres peuvent suivre un mode d'action de co-activation (pas représentées). La famille MerR suit un mode d'action d'activation. Enfin, les familles famille CsoR-RcnR, CopY et ArsR-SmtB suivent un mode d'action de dé-répression. .... 45

**Figure I-12** : Structure classique de l'opéron *ars* (modifié de *Kalia and Joshi 2009*). .... 48

**Figure I-13** : Fonctionnement de l'opéron *ars* chez les procaryotes. As(V) entre dans la cellule via les systèmes d'import du phosphate (PstA, PstB, PstC et PhoS) et est séquentiellement réduit en As(III) par ArsC et exporté de la cellule par les aquaglycéroporines (Aqps/GLpF). Ces dernières peuvent de plus importer le As(III) dans la cellule qui est pris en charge (ArsD) et expulsé de la cellule grâce au système d'efflux ArsB-ArsA qui tire son énergie de l'hydrolyse de l'ATP (ArsA). Le As(III) peut de plus être extrudé via le système d'efflux ArsB-Acr3. ArsR est le régulateur transcritonnel de l'opéron *ars*: quand la concentration en As(III) augmente, la liaison de l'ion métallique avec l'homodimère ArsR entraîne la dé-répression de l'opéron *ars* et donc son expression. Les formes organiques de l'arsenic (MMA (monométhylarsenic)) peuvent également être éliminées de la cellule grâce à ArsP (*Wang et al. 2009*). .... 49

**Figure I-14** : Domaines caractéristiques d'une histidine kinase et d'un régulateur transcriptionnel appartenant à un système de transduction du signal à deux composantes. Domaines conservés : domaine périplasmique senseur (jaune), domaines transmembranaires (bleu), domaine linker (blanc), domaines DHp impliqués dans la dimérisation et l'autophosphorylation (orange) et domaines catalytiques fixant l'ATP (vert). Le régulateur transcriptionnel est représenté en gris. Les acides aminés essentiels à l'activité des protéines sont annotés (H et D) (*Bhate et al. 2015*). .... 54

**Figure I-15** : Système de transduction du signal à deux composantes Zra. (A) Organisation génomique du système Zra d'*E. coli* souche K12. (B) Mécanisme du système Zra en réponse à de faibles (activation) et de fortes concentrations en zinc (inhibition). D'après *Taher et al. 2021*. .... 56

**Figure I-16** : Classification des systèmes d'efflux bactériens. Les systèmes d'efflux sont classés en 5 familles ABC : ATP-Binding Cassette, MFS : Major Facilitator Superfamily, MATE : Multidrug and Toxic compound Extrusion, SMR : Small Multidrug Resistance et, RND : Resistance-Nodulation-cell Division. Les systèmes RND ne sont retrouvés que chez les bactéries à gram négatif ; ainsi ils sont tripartites pour transporter le substrat au travers de la membrane interne, le périplasm et la membrane externe (*Krulwich et al. 2005*). .... 58

**Figure I-17** : Système d'efflux tripartite (RND) d'une bactérie à Gram négatif. RND : Resistance-Nodulation-cell Division ; MFP : Membrane Fusion Protein ; OMF : Outer Membrane Factor (*Pagès et al. 2011*). .... 59

**Figure I-18** : Système *cus*. (A) Organisation génomique de l'opéron *cus* codant à la fois un système de transduction du signal à deux composantes (*cusRS*) et un système d'efflux de la famille RND (*cusCFBA*). (B) Fonctionnement du système *cus* (*Richard et al. 2019*). .... 62

**Tableau I-1** : Exemples de régulateurs appartenant à la famille ArsR-SmtB et métaux reconnus. .... 46

## CHAPITRE II : Procédures expérimentales

<b>Figure II-1</b> : Représentation schématique des procédures utilisées lors des expériences impliquant un ajout de mercure. Ti : consécutivement à l'inoculation de la souche. Tf : fin de phase exponentielle de croissance.....	74
<b>Figure II-2</b> : Représentation schématique des protocoles suivis pour fractionner les cultures. TA : Température ambiante. ....	75
<b>Figure II-3</b> : Représentation schématique de la stratégie de délétion des gènes utilisée pour générer des souches mutantes chez la souche BerOc1. pBR322: origine de répllication. AmpR: cassette de résistance ampicilline. AmpS: ampicilline sensible. SpecR: cassette de résistance spectinomycine/spectinonycine résistant. Modifié à partir de <i>Wall et al. 2014</i> -présentation-.....	79
<b>Figure II-4</b> : Principe de la POE-PCR. La première étape consiste à amplifier par <b>PCR</b> tous les fragments d'ADN (ADN amont du gène cible, ADN aval du gène cible et plasmide) nécessaires à la construction finale grâce à des amorces possédant des extrémités chevauchantes. La seconde étape est une PCR sans amorce avec l'ensemble des fragments d'ADN précédemment amplifiés ( <b>POE-PCR</b> ). Elle permet de réunir tous les fragments d'ADN en un seul et unique fragment (multimers). Il sera circularisé après transformation dans une souche d' <i>E.coli</i> qui permet sa répllication ( <i>You et al. 2012</i> ). ....	82
<b>Figure II-5</b> : Protocole détaillé de génération de souches modifiées chez la bactérie <i>Pseudodesulfovibrio hydrargyri</i> souche BerOc1.....	85
<b>Figure II-6</b> : Représentation schématique des différentes organisations génomiques possibles suite à la transformation de la souche BerOc1. Ces organisations font suite soit à une double recombinaison homologue entre le plasmide et le génome de la souche BerOc1 soit, une absence de recombinaison homologue (BerOc1 sauvage) soit, une simple recombinaison homologue entre la partie amont (rouge) ou la partie aval (bleu) du gène cible. Trois couples d'amorces représentés en violet, vert et orange ont été utilisés pour déterminer l'organisation génomique des clones récupérés après le processus de sélection et correspondent aux couples Vérification 1, 2 et 3 présentés dans le tableau II-7. Les couples floutés ne donnent lieu à aucune amplification.....	87
<b>Figure II-7</b> : Protocole détaillé de génération de souches modifiées chez la bactérie <i>Desulfovibrio alaskensis</i> souche G20.....	90
<b>Tableau II-1</b> : Composition de la base minérale MM <sub>10</sub> (Multipurpose Medium) pour un litre d'eau MilliQ. La base minérale contient une solution d'oligoéléments notée SL12B dont la composition est développée dans le Tableau II-2 et une solution de Sélénite-Tungstate notée ST. Les cultures des bactéries sulfato réductrices <i>Pseudodesulfovibrio hydrargyri</i> souche BerOc1 et <i>Desulfovibrio alaskensis</i> souche G20 ont été réalisées dans cette base minérale à l'exception près que le NaCl n'est pas ajouté pour les cultures de la souche G20. ....	68
<b>Tableau II-2</b> : Composition de la solution de SL12B. Les quantités listées (en mg) sont pour réaliser un litre de solution. (*) Une solution de SL12B modifiée notée SL12B* a été préparée pour limiter la quantité de soufre dans les cultures; pour cela le FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a été remplacé par du FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O en proportion identique.....	69
<b>Tableau II-3</b> : Composition de la solution de vitamines V7. La solution contient 7 vitamines différentes (B1, B3, B5, B5, B8, B10 et B12). Elle est ajoutée aux milieux de culture après autoclave.....	69
<b>Tableau II-4</b> : Compositions des milieux Postgate C et Postgate E. Ces milieux ont été utilisés pour le protocole de transformation de la bactérie <i>Desulfovibrio alaskensis</i> souche G20.....	71
<b>Tableau II-5</b> : Conditions expérimentales réalisées pour l'intégralité des expériences en présence de Hg. Δ : délétion du gène. pK7 : plasmide portant le locus de gènes <i>arsRhgcA</i> <i>hgCB</i> . Les procédures	

expérimentales 1 et 2, ainsi que les procédures de fractionnement 1, 2 et 3 sont détaillées dans les figures II-1 et II-2 respectivement. .... 73

**Tableau II-6 :** Amorces utilisées pour la construction des plasmides utilisés pour la délétion des gènes *hgcB*, *arsR* et du cluster de gènes 470-467 chez la souche BerOc1 et pour l'expression hétérologue chez la souche G20. Chaque construction a nécessité 4 étapes d'amplifications par PCR. Up : fragment amont, dwn : fragment aval, bb : backbone (vecteur), S ou Spec : spectinomycine. Extrémités chevauchantes en rouge. Les sites de restriction sont mis en gras et soulignés. .... 83

**Tableau II-7 :** Amorces utilisées pour la vérification de l'organisation génomique de la souche BerOc1 suite à une transformation. DR : double recombinaison, WT : souche sauvage, SR amont : simple recombinaison amont, SR aval : simple recombinaison aval ..... 88

**Tableau II-8 :** Amorces utilisées pour réaliser le contrôle qualité des ARN et des ADNc, les RT qPCR (taux d'expression génique) et les RT PCR (co transcription des gènes). .... 93

## CHAPITRE III : Etude physiologique de la souche BerOc1

**Figure III-1 :** Production de biomasse par la souche BerOc1 en culture avec différents substrats métaboliques. Les substrats ont été ajoutés à 20 mM final chacun. Les métabolismes de respiration fumarate et de fermentation ont été supplémentés avec 0.1 mM de thiosulfate en tant que source de soufre. Sulf: Sulfate. Fum: Fumarate. Pyr : Pyruvate. Lac: Lactate. Ara: Arabinose. Les barres d'erreur représentent l'écart type d'au minimum trois cultures indépendantes..... 107

**Figure III-2 :** Effet des sources de soufre sur (A) la production de biomasse et (B) la croissance chez la souche BerOc1. Un milieu pyruvate-fumarate (20 mM chacun) a été complété avec différentes sources de soufre, toutes ajoutées à 0.1 mM final. Ce milieu a été inoculé avec une culture de la souche BerOc1 afin de suivre la croissance et mesurer la production de biomasse. Les formules semi développées des molécules ajoutées en tant que source de soufre sont représentées. (A) ThioS : thiosulfate. ThioAc : thioacétamide. DMSO : diméthylsulfoxyde. Met : méthionine. Cys : cystéine. (B) Thiosulfate (ThioS, noir). Sulfate (gris). Sulfures (orange). Cystéine (marron). Les barres d'erreur représentent l'écart type provenant de deux cultures indépendantes au minimum. .... 108

**Figure III-3 :** Effet de (A) la concentration en substrats métaboliques et en sulfate ( $SO_4^{2-}$ ) et (B) la concentration en extrait de levure (YE) sur la croissance de la souche BerOc1. (A) Le couple pyruvate-fumarate (respiration fumarate) a été ajouté à des concentrations finales de 20, 40 ou 60 mM chacun. Le sulfate en tant que source de soufre a été ajouté à 0.1 mM final (gris) et à 0.5 mM final (bleu). (B) Les souches ont été cultivées selon plusieurs métabolismes, la respiration du sulfate (Sulf, rouge) ou du fumarate (Fum, triangles). Les couples donneur-accepteur ont été ajoutés à 40 mM chacun. Le couple pyruvate-fumarate a été complété avec 0.5 mM de sulfate en tant que source de soufre. Donneur d'électrons: Pyr. Pyruvate. Lac. Lactate. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois cultures indépendantes..... 109

**Figure III-4 :** Etapes de sélection et de criblage pour déléter le gène *hgcB* chez la souche BerOc1. Sp: spectinomycine (antibiotique de sélection des cellules transformées)..... 112

**Figure III-5 :** Vérification de l'organisation génomique des cultures transformées dans le but de déléter le gène *hgcB* du génome de BerOc1. Les vérifications 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux PCR permettant d'amplifier les fragments (i) amont *hgcB*- cassette spectinomycine, (ii) amont *hgcB*- aval *hgcB* et, (iii) cassette spectinomycine- aval *hgcB*. Sp: spectinomycine. 0.25, 0.5 et 1 : quantité en  $\mu$ g de plasmide utilisée lors de la transformation de la souche BerOc1. Neg: contrôle négative de PCR (l'eau

remplace l'ADN dans la réaction de PCR). WT: ADN de la souche BerOc1 sauvage. M : Marqueur de taille (2log Ladder, Ozyme®)..... 115

**Figure III-6** : Etapes de sélection et de criblage optimisées afin de déléter des gènes cibles chez la souche BerOc1. Sp: spectinomycine (antibiotique de sélection des cellules transformées)..... 117

**Tableau III-1** : Croissance de la souche BerOc1 sur milieu solide. Le milieu de culture a été le milieu MM<sub>10</sub>PFYE en présence de 0.5 mL/L d'une solution de citrate de titane (III). Des dilutions séquentielles de 10 en 10 ont été réalisées. Tapis cellulaire: croissance sur l'ensemble de la boîte de Petri sans colonies isolées..... 111

**Tableau III-2** : Caractéristiques des colonies de la souche BerOc1 obtenues suite à la transformation pour déléter le gène *hgcB*. DR: double recombinaison homologue (génotype délété). SR: Simple recombinaison homologue. WT : pas de recombinaison observée (génotype sauvage). ..... 116

**Tableau III-3** : Caractéristiques des colonies de la souche BerOc1 obtenues suite au protocole de génération de souche mutante optimisé. Les gènes cibles ont été le gène *arsR* et le locus de gènes 470-467. DR: double recombinaison homologue (génotype délété). SR: Simple recombinaison homologue. WT : pas de recombinaison observée (génotype sauvage)..... 118

## CHAPITRE IV : Effet des sulfures exogènes et endogène sur la production et l'export du MeHg

**Figure IV-1** : Hg methylation potential (%) of *P. hydrargyri* BerOc1. (a) Hg methylation at 0.05, 2 and 5  $\mu\text{M}$  Hg(II) under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with either 0.1 mM cysteine or 0.1 mM sulfide or under sulfidogenic condition (Pyr/Sulfate). Hg methylation at either (b) 0.05  $\mu\text{M}$  or (c) 2  $\mu\text{M}$  of Hg(II) under Pyr/Fum with a range of sulfide concentrations (o added exogenously or measured in the cultures). Inoculation and Hg(II) addition were performed at the same time. Pyruvate (Pyr) was used as carbon source at 40 mM for all the growth conditions and, sulfate and fumarate (Fum) were added at 40 mM as electron acceptor to promote sulfidogenic (Pyr/Sulfate) or non-sulfidogenic (Pyr/Fum) metabolisms, respectively. MeHg potentials (% of total recovered Hg converted to MeHg) were measured at the end of the exponential phase (Tf). Error bars represent the standard deviations of three independent replicates. NG: No growth..... 136

**Figure IV-2** : Partitioning of inorganic mercury (Hg(II)) between extracellular (grey) and cell-associated (black) fractions at the end of the exponential growth phase (Tf). (a) The partitioning of Hg(II) at 0.05, 2 and 5  $\mu\text{M}$  Hg(II) under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with either 0.1 mM cysteine or 0.1 mM sulfide or under sulfidogenic condition (Pyr/Sulfate). The partitioning of Hg(II) at either (b) 0.05  $\mu\text{M}$  or (c) 2  $\mu\text{M}$  of Hg(II) under Pyr/Fum with a range of sulfide concentrations (added as exogenous sulfide or measured in the cultures). The same cultures were used to determine Hg species in the bulk fraction at the end of the exponential growth phase and Hg species partitioning. After sampling for Hg species determination, cultures were centrifuged and the extracellular Hg(II) and MeHg were measured in the supernatant. Error bars represent the standard deviations of three independent replicates, each one measured three times. .... 140

**Figure IV-3** : Partitioning of MeHg between extracellular (grey) and cell-associated (black) fractions at the end of the exponential growth phase (Tf). (a) The partitioning of MeHg at 0.05, 2 and 5  $\mu\text{M}$  Hg(II) under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with either 0.1 mM cysteine or 0.1 mM sulfide or under sulfidogenic condition (Pyr/Sulfate). The partitioning of MeHg at either (b) 0.05  $\mu\text{M}$  or (c) 2  $\mu\text{M}$  of Hg(II) under Pyr/Fum with a range of sulfide concentrations (added as exogenous sulfide or measured in the

cultures). The same cultures were used to determine Hg species in the bulk fraction at the end of the exponential growth phase and Hg species partitioning. After sampling for Hg species determination, cultures were centrifuged and the extracellular Hg(II) and MeHg were measured in the supernatant fraction. Error bars represent the standard deviations of three independent replicates, each one measured three times ..... 141

**Figure IV-4** : Expression level of *hgcA* gene in *P. hydrargyri* strain BerOc1 under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with cysteine (**a**) and sulfide (**b**) at various Hg(II) concentrations. Hg(II) was spiked at the beginning of the exponential growth phase and incubated for 1 hour. A control condition was performed without Hg(II) (0  $\mu$ M). Expression levels of *hgcA* gene were normalized using *gyrB* gene expression levels in the same condition, following double delta Ct method. Error bars represent the standard deviations of three independent replicates, each one measured three times. .... 143

**Table IV-1** : Sulfide concentration, biomass production, growth rate, Hg methylation rate ( $\tau$ ), maximal Hg methylation rate ( $\tau_{max}$ ) and, Hg(II) concentrations to reach half of the maximal methylation rates ( $K_{Mic}$ ) measured/calculated in *P. hydrargyri* strain BerOc1 grown under non-sulfidogenic (Pyr/Fum) conditions (with cysteine or sulfide) or under sulfidogenic (Pyr/Sulfate) condition ..... 135

**Online Resource IV-1** : Graphical illustration of key steps of (**a**) both Hg methylation and partitioning and (**b**) *hgcA* gene expression. (**a**) Cultures were inoculated and spiked with mercury Hg simultaneously. Immediately after inoculation and Hg spike ( $T_i$ ) and at the end of the exponential growth phase ( $T_f$ ), samples were harvested to measure Hg(II) and MeHg concentration. After sampling to measure Hg(II) and MeHg in the bulk fractions, cultures were centrifuged to separate pellet and supernatant fractions. (**b**) For *hgcA* expression assays, Hg was spiked in growing cells, at mid exponential growth phase. Hg incubation were performed for one hour. Cells were harvested in a solution to protect against RNA degradation. RNA was extracted and cDNA synthesized to consecutively perform qRT-PCR.  $T_i$ : Initial sampling time.  $T_f$ : final sampling time. .... 128

**Online Resource IV-2** : Growth ( $OD_{600}$ ) of batch cultures used to determine, (**a**) minimal sulfur concentration to provide optimal growth under non sulfidogenic growth condition, (**b-f**) Hg methylation and partitioning of Hg species and, (**g-h**) *hgcA* gene expression under different growth conditions and Hg(II) concentrations. For all the growths, pyruvate (Pyr) was used as carbon source. Fumarate (Fum) was used as electron acceptor to provide non-sulfidogenic (Pyr/Fum) metabolisms (**a-e, g-h**) and sulfate (**f**) was used as electron acceptor to provide sulfidogenic growth (Pyr/Sulfate). Substrates were used at 40 mM except for panel (**a**) for which pyruvate and fumarate were used at 20 mM. Hg spike was performed at the beginning of the growth, otherwise, an arrow indicates Hg addition. Initial sampling ( $T_i$ ) was carried out just after Hg spike (< 1 min). Final sampling ( $T_f$ ) is indicated as crossing points (end of the exponential growth phase) except for panels (**g**) and (**h**) for which the samples were taken 1 hour after the addition of Hg. .... 134

**Online Resource IV-3** : Abiotic controls (**a**) growth curves ( $OD_{600}$ ), (**b**) Hg methylation potentials (%) and, (**c**) total recovered Hg (%) for each type of medium used with Hg (0.05, 2, 5  $\mu$ M Hg(II)). Methylation potentials were calculated by dividing measured MeHg by total measured Hg. Total recovered Hg were calculated by dividing total measured Hg by total added Hg. < LD: below the limit of detection. NA: Not available..... 136

**Online Resource IV-4** : Partitioning of inorganic mercury (Hg(II)) between extracellular (grey) and cell-associated (black) fractions at the beginning of the growth ( $T_i$ ) (**a**) 0.05, 2 and 5  $\mu$ M Hg(II) under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with either 0.1 mM cysteine or 0.1 mM sulfide or under sulfidogenic condition (Pyr/Sulfate) and, at either (**b**) 0.05  $\mu$ M or (**c**) 2  $\mu$ M of Hg(II) under Pyr/Fum with a range of sulfide concentrations (added as exogenous sulfide or measured in the cultures). The same cultures

were used to determine Hg species at Ti in the bulk fraction and Hg species partitioning. After sampling for Hg species determination, the cultures were centrifuged (less than one minute after Hg spike (Ti)) and extracellular Hg(II) and MeHg were measured in the supernatant fraction. Error bars represent the standard deviations of three independent replicates, each one measured three times. .... 140

**Online Resource Table IV-1** : Raw data of Hg methylation assays. .... 137

## CHAPITRE V : Cluster *arRhgcaHgcB* et méthylation du Hg: Focus sur la protéine ArsR

**Figure V-1** : Organisation génomique des gènes *arsR*, *hgca* et *hgcB* chez *P. hydrargyri* souche BerOc1. La direction des ORF est indiquée par les encadrés fléchés (selon *Goñi-Urriza et al. 2020*). .... 147

**Figure V-2** : Séquence protéique d'ArsR de *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1. Les cystéines (vert) et les histidines (rouge) pouvant participer à la liaison au métal sont mises en évidence. .... 148

**Figure V-3** : Structure secondaire prédite d'ArsR de BerOc1. La structure secondaire est représentée avec les hélices  $\alpha$  en rouge et les feuillets  $\beta$  en vert. La protéine présente la structure caractéristique des membres de la famille ArsR-SmtB avec :  $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-\alpha 4-\beta 1-\beta 2-\alpha 5$ . Les motifs de liaison des métaux sont encadrés (CTC en  $\alpha 3$  et CYC en  $\beta 2$ ) et le domaine de liaison à l'ADN (domaine de type HTH) est souligné. .... 149

**Figure V-4** : Arbre montrant les relations évolutives au sein de la famille ArsR-SmtB. L'arbre a été créé à partir des membres représentatifs de la famille. La classe, le nom de la protéine, le nom de l'organisme et le numéro d'accession pour Uniprot sont indiqués. UK = unknown. L'encadré rouge indique la branche contenant la protéine ArsR de BerOc1. Méthode évolutive : Neighbor-Joining. Analyse de robustesse: Bootstrap (n = 500). .... 150

**Figure V-5** : Alignement multiple des protéines les plus proches d'ArsR dans la famille ArsR-SmtB. Les acides aminés les plus conservés sont représentés en violet, les cystéines sont surlignées en noir et les motifs caractéristiques d'ArsR (CxCx en  $\alpha 3$  et CxC en  $\beta 2$ ) sont encadrés en rouge. La structure secondaire est également présentée avec les hélices  $\alpha$  représentées par un cylindre gris les feuillets  $\beta$  par une flèche verte. .... 151

**Figure V-6** : Arbre montrant les relations évolutives au sein du groupe  $\alpha 3$ . L'arbre a été créé à partir des membres du groupe  $\alpha 3$  recensés dans *Roy et al. 2018*. Le nom de la protéine, le nom de l'organisme et le numéro d'accession pour Uniprot sont indiqués. L'encadré rouge indique la branche contenant la protéine ArsR de BerOc1. Méthode évolutive : Neighbor-Joining. Analyse de robustesse: Bootstrap (n = 500). .... 153

**Figure V-7** : Modélisation de la structure tertiaire d'ArsR (A) et KQS (B). La modélisation a été réalisée avec RaptorX, et la visualisation avec PyMOL. Les hélices  $\alpha$  sont représentées en bleu, les feuillets  $\beta$  en violet et les boucles en rose. Les acides aminés impliqués dans les motifs de liaison (CxCx en  $\alpha 3$  et CxC en  $\beta 2$ ) sont mis en évidence avec le carbone en vert, l'hydrogène en blanc, l'azote en bleu, l'oxygène en rouge et le soufre en jaune. .... 154

**Figure V-8** : Alignement multiple des régions intergéniques en amont du gène *arsR* chez des souches méthylantes. Les ATG sont soulignés en rouge. La boîte -35 est conservée et soulignée en bleu. Les identités sont marquées par un astérisque (\*). Les motifs répétés dans le sens direct sont encadrés en vert et ceux répétés dans le sens inverse sont encadrés en orange. La séquence « core » (10 nucléotides) est soulignée en noir. .... 155



**Figure V-9** : Alignement multiple des séquences protéiques d'ArsR de souches méthylantes. Les motifs de liaison des métaux sont encadrés en rouge. Acides aminés (\*) identiques et (:) similaires retrouvés pour toutes les séquences. (.) Acides aminés similaires pour toutes les séquences à l'exception d'une.

..... 157

**Figure V-10** : Expression du gène *arsR* chez la souche *P. hydrargyri* souche BerOc1 sauvage. Le Hg(II) a été ajouté suivant une gamme de concentration allant de 0.0005 µM à 25 µM dans une culture de BerOc1 en début de phase exponentielle de croissance et incubée à 37°C durant 8 (blanc), 37 (gris intermédiaire) ou 94 minutes (gris foncé). Un contrôle non exposé au Hg(II) (0 µM) a été réalisé. L'expression du gène *arsR* a été reportée à l'expression du gène *gyrB* codant une ADN gyrase par la méthode 'Delta delta Ct'. Les barres d'erreur représentent l'écart type issu de trois cultures indépendantes. Les lignes en pointillé représentent une surexpression à 2 (*Surexpression*) et une répression à 0.5 (*Répression*). ..... 158

**Figure V-11** : Co expression du gène *hgcB* au sein du cluster *arsRhgcAhgcB*. Couple *arsR-hgcB* : taille attendue 1777 pb. Couple *hgcA-hgcB* : taille attendue 933 pb. Les contrôles positifs (Ct+) pour les couples *arsR-hgcB* et *hgcA-hgcB* ont été réalisés sur l'ADN génomique de la souche BerOc1. Le contrôle positif *hgcB* (Ct+ *hgcB*, taille attendue : 104 pb) a été réalisé sur les ADNc exposés à 0.05 µM de Hg(II) durant 1 heure (échantillon). M : Marqueur de taille (2log Ladder, Ozyme®). ..... 159

**Figure V-12** : Expression du gène *hgcA* chez les souches BerOc1 sauvage (noir) et BerOc1  $\Delta$ *arsR* (gris). Le Hg(II) a été ajouté à 0.5 µM final dans une culture de BerOc1 au moment de l'inoculation de la souche (Ti) incubée à 37°C jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance (16 heures environ). Un contrôle non exposé au Hg(II) (0 µM) a été réalisé. L'expression du gène *hgcA* a été reportée à l'expression du gène *gyrB*. L'ensemble des niveaux d'induction ont été calculés par rapport au niveau d'expression du contrôle non exposé obtenu pour la souche BerOc1 sauvage. ..... 161

**Figure V-13** : Croissance en absence et présence de Hg(II) des souches BerOc1 sauvage (gris), BerOc1  $\Delta$ *hgcB* (bleu) et BerOc1  $\Delta$ *arsR* (violet). Les souches ont été cultivées en milieu riche favorisant la respiration fumarate : milieu MM<sub>10</sub> avec 40 mM de Pyruvate et 40 mM de Fumarate en tant que donneur et accepteur d'électrons respectivement, 0.5 mM de sulfate en tant que source de soufre et 1 g/L d'extrait de levure (YE). Les expositions au Hg(II) à 0.05 µM et 0.5 µM ont été faites au moment de l'inoculation (Ti). Les barres d'erreur représentent l'écart type calculé à partir de quatre répliques de cultures indépendantes pour les conditions en présence de 0.05 et 0.5 µM de Hg(II) et sont cachées par la symbolique. Le contrôle non exposé au Hg(II) a été réalisé sur une culture par ajout d'eau au moment de l'inoculation (Ti). ..... 162

**Figure V-14** : Taux de méthylation des souches BerOc1 sauvage (gris), BerOc1  $\Delta$ *hgcB* (bleu) et BerOc1  $\Delta$ *arsR* (violet). Les souches ont été cultivées en respiration fumarate en milieu riche : milieu MM<sub>10</sub> avec 40 mM de Pyruvate et 40 mM de Fumarate en tant que donneur et accepteur d'électrons respectivement, 0.5 mM de sulfate en tant que source de soufre et 1 g/L d'extrait de levure (YE). Chacune des souches a été exposée à 0.05 µM (gris intermédiaire, bleu intermédiaire et violet intermédiaire) et à 0.5 µM (gris foncé, bleu foncé et violet foncé) de Hg(II) consécutivement à l'inoculation de la souche (Ti) puis, incubée à 37°C jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance (Tf, environ 24 heures). Les barres d'erreur représentent l'écart type provenant de trois cultures indépendantes. LD : Limite de détection. ..... 163

**Figure V-15** : Croissance de la souche BerOc1 sauvage (**A et B**) et de la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* (**C et D**) exposées à des concentrations de Hg(II) allant de 0.005 µM à 50 µM (**A et C**) et de MeHg allant de 0.000047 µM à 4.7 µM (**B et D**). L'exposition au mercure a été réalisée consécutivement à l'inoculation de la souche (Ti). Des contrôles sans Hg(II) et sans MeHg ont été menés en remplaçant l'ajout de mercure par de l'eau milliQ dégazée. Production de biomasse par les souches BerOc1 sauvage (**E**) et BerOc1  $\Delta$ *arsR* (**F**). La production de biomasse en absence de mercure a servi de valeur de référence (100%) pour évaluer la sensibilité/résistance de chaque souche. Les barres d'erreur représentent

l'écart type mesuré sur quatre répliques de cultures indépendantes. **E et F** : les inserts en bas à gauche des figures permettent de visualiser la production de biomasse lors des faibles expositions en mercure.

..... 165

**Figure V-16** : Taux de méthylation (**A**) et de déméthylation (**B**) chez la souche BerOc1  $\Delta arsR$  (gris) et la souche BerOc1 sauvage (noir). Les cultures ont été incubées en présence de Hg(II) ou de MeHg dès le moment de l'inoculation de la souche. Les échantillons ont été prélevés à Ti (inoculation) et à la fin de la première phase de croissance (environ 48 heures) afin de mesurer les concentrations en Hg(II) et MeHg par GC-ICP-MS. Les barres d'erreur, calculées à partir de trois cultures indépendantes, sont souvent cachées par les symboles. .... 168

**Figure V-17** : Croissance (**A**) et production de sulfure (**B**) des souches BerOc1 sauvage (noir), G20 sauvage (vert) et G20 + pK7 (bleu) selon la concentration d'exposition au Hg(II) (0  $\mu\text{M}$  ; 0.05  $\mu\text{M}$  ; 0.5  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$ ). Les cultures ont été préparées afin de favoriser un métabolisme de respiration du sulfate (40:40mM Pyruvate-Sulfate). Les barres d'erreur représentent l'écart type calculés à partir de trois répliques indépendants. Sur les courbes de croissance, les barres d'erreur sont représentées mais cachées par les symboles. ND: Valeur non déterminée. .... 170

**Figure V-18** : Taux de méthylation des souches BerOc1 sauvage, G20 sauvage et G20 + pK7. Les souches ont été inoculées en sulfato réduction (40mM:40mM Sulfate:Pyruvate) et consécutivement exposées à 0.05, 0.5 et 2  $\mu\text{M}$  de Hg(II) (Ti). Afin de quantifier les concentrations de méthylmercure, les échantillons ont été prélevés au moment de l'exposition au Hg(II) (Ti) et en fin de phase exponentielle de croissance (environ 24 heures, Tf). Les barres d'erreur représentent l'écart type calculé à partir de trois cultures indépendantes. .... 171

## CHAPITRE VI : Identification d'un premier système de résistance au Hg

**Figure VI-1** : Organisation génomique du cluster de gènes 468 à 471 chez la bactérie sulfato-réductrice *P. hydrargyri* souche BerOc1. Ces gènes codent des systèmes reconnus pour participer à la signalisation, l'homéostasie et la résistance aux métaux et sont surexprimés en présence de Hg(II) et réprimés en présence de MeHg (*Goñi Urriza et al Données non publiées*). .... 175

**Figure VI-2** : Genomic structure of 472-466 genes cluster. **(a)** Schematic representation of genomic region from 472 gene to 466 gene. Open reading frames (ORFs) of genes are illustrated with white numbered arrows. The reading direction is indicated by the arrow direction. Putative forward (blue) and reverse (green) promoters are indicated with boxes. The sequence of the promoter region are detailed encompassing the beginning of ORFs (underlined), start codons (ATG or CAT; bold), ribosomal binding sites (RBS; index), putative DNA binding site of ZraR (15 bp long; small letters) and putative promoters (boxed). **(b)** Results of the Reverse transcription-PCR (RT-PCR) performed on total RNA extracted from BerOc1 grown at different Hg(II) concentrations. RT-PCR were performed with primers F1-R1 (425 bp), F1-R2 (838 bp), F1-R3 (2206 bp) and F2-R3. M: ladder 2 log (Ozyme®). M: ladder 100pb (Ozyme®), Ct+: positive control performed on BerOc1 genomic DNA. Ct-: negative control without DNA template. Lines 1, 2, 3, 4 correspond to the RT-PCR performed using cDNA from BerOc1 cells grown in the presence of 0, 0.005, 0.5 and 2  $\mu\text{M}$  of Hg(II), respectively. Position of the primers used for the RT-PCR are indicated by black arrows on panel **(a)**. .... 185

**Figure VI-3** : Biomass production of the wild type strain (solid line) and its mutant (dotted line) exposed with either **(a)** Hg(II) concentration ranging from 0.005 to 50  $\mu\text{M}$  or **(b)** methylmercury ranging from 0.00047 to 4.7  $\mu\text{M}$ . Mercury was added consecutively to the culture inoculation i.e. Ti of the growth and incubated until the stationary growth phase (Tf, about 140 hours). Inserts: zoom on the lowest concentrations. Error bars corresponds to standard deviation calculated from three or four independent replicates. .... 188

**Figure VI-4** : Quantities of **(a,c)** Hg(II) or **(b,d)** MeHg found in **(a,b)** cell adsorbed and **(c,d)** intracellular fractions. Hg(II) was spiked during the exponential growth phase. Fractions were obtained after centrifugation, washing with strong Hg ligands and filtering procedures. Hg(II) and MeHg concentrations were measured by GC-ICPMS from cultures of BerOc1 wild type and mutant strains stopped after 4 hours of Hg(II) exposition (from 0.0005 to 25  $\mu$ M). Insets correspond to zooms from 0.005 to 2  $\mu$ M Hg(II) expositions. Error bars corresponds to standard deviation calculated from three replicates each measured three times..... 189

**Figure VI-5** : Hg(II) methylation rates of BerOc1 wild type and mutant strains exposed to Hg(II) ranging from 0.0005 to 25  $\mu$ M during 4 hours. Methylation rates were measured from the whole culture (bulk fraction). Error bars corresponds to standard deviation calculated from three replicates each measured three times. .... 190

**Figure VI-6** : Nano-XRF maps of mercury (Hg), sulfur (S) and calcium (Ca) in BerOc1 **(a)** wild type and **(b)** mutant strain exposed to 2  $\mu$ M of Hg(II) during 4 hours in the exponential growth phase. Incident energy = 17 keV, step size = 30 nm, counting time = 100 ms. Outsets correspond to zooms on one or two Hg-accumulating cell(s). .... 191

**Table VI-1** : Primers used (i) for the construction of pNot19 $\Delta$ PCM(Sp470-467) plasmid and, (ii) to perform the experiments of co-expression of the 472-466 genes cluster. .... 180

## CHAPITRE VII : Conclusions et perspectives

**Figure VII-1** : Représentation schématique des conclusions et des hypothèses mises en évidence au cours de ce travail de thèse sur les déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au Hg(II) et dans sa méthylation/déméthylation chez la bactérie sulfato réductrice *P. hydrargyri* souche BerOc1. *hgcA* et *hgcB* : Parks et al. 2013. *arsR*, *MCP* et cluster de gènes 472, 471, 470, 469, 468 et 467 : cette étude. **P** : phosphorylation activatrice. .... 201

## INTRODUCTION GENERALE



Le mercure (Hg) est un métal lourd, largement disséminé dans l'environnement (*Driscoll et al. 2013*), possédant des propriétés neurotoxiques et reprotoxiques avérées (*Atchison and Hare 1994; Farina et al. 2011; Rice et al. 2014*). Conséquence d'évènements tels que la catastrophe de Minamata (Japon) provoquée par le rejet d'eaux usées contaminées en méthylmercure entre les années 1930 et 1960, la prise de conscience sur la toxicité de cet élément est actuellement mondiale et fait l'objet d'une convention rédigée par les Nations Unies : la convention de Minamata. Cette convention, entrée en vigueur en 2017 et actuellement signée par 137 pays, vise à réduire l'utilisation du mercure ainsi que son émission dans l'environnement. Malgré cela, le mercure est encore à ce jour classé par l'Organisation Mondiale de la Santé parmi les 10 substances chimiques les plus préoccupantes pour la santé humaine.

La consommation de produits de la mer concentrés en méthylmercure (MeHg), la forme méthylée du mercure, est la principale cause d'intoxication au mercure chez l'Homme (*Chapman and Chan 2000*). En effet, le mercure rejeté dans l'environnement est transformé au niveau des environnements anoxiques en méthylmercure, une puissante neurotoxine, capable d'être bioaccumulée et bioamplifiée le long de la chaîne trophique (*Boudou and Ribeyre 1997*). A l'origine de cette transformation se trouvent des microorganismes anaérobies (*Jensen and Jernelöv 1969; Gilmour et al. 2013, 2018; Bravo et al. 2018*). Ces microorganismes possèdent tous au sein de leur génome, deux gènes *hgcA* et *hgcB* codant des protéines essentielles à la réaction de méthylation du mercure (*Parks et al. 2013*). La production de méthylmercure en réponse au mercure par ces microorganismes est dépendante de plusieurs facteurs comme la concentration en mercure présente dans l'environnement, les conditions environnementales favorables à la croissance des microorganismes méthylants ou encore, la présence de ligands complexant le mercure (*Hsu-Kim et al. 2013; Regnell and Watras 2019; Ma et al. 2019*). En revanche, aucune étude n'a à ce jour mis en évidence que la réaction de méthylation du mercure était liée à l'induction des gènes *hgcAB*, pourtant nécessaires à cette réaction (*Goñi-Urriza et al. 2015; Qian et al. 2018*). Une meilleure compréhension du mécanisme permettant la production de méthylmercure est donc importante pour la prévention et la mesure des risques liés au mercure dans l'environnement.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le projet de recherche 'Key Scientific Challenges' GOBEAM (Go inside a Bacterial cell methylating Mercury) financé par E2S UPPA. Ce projet transdisciplinaire fait appel à des approches de génétique, de physiologie, de chimie analytique, d'imagerie et de spectroscopie d'absorption des rayons X afin de clarifier le mécanisme de méthylation du mercure à l'échelle de la cellule.

L'objectif global de ma thèse est d'identifier des déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au mercure et dans sa méthylation chez la bactérie sulfato réductrice *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1, une bactérie modèle utilisée pour l'étude du mécanisme de méthylation du mercure (Pedrero et al. 2012; Goñi-Urriza et al. 2015; Ranchou-Peyruse et al. 2018; Isaura et al. 2020). Mon travail a fait appel à des approches couplant physiologie, génétique, chimie analytique et imagerie afin d'étudier le mécanisme de méthylation du mercure sous l'influence de la concentration en mercure, de conditions de croissances bactériennes, de ligands du mercure et principalement, des déterminismes génétiques.

Le chapitre I est une synthèse bibliographique sur le mercure s'attachant à décrire les connaissances actuelles sur le mécanisme de méthylation du mercure et les principales pistes génétiques proposées pour progresser dans la compréhension de ce mécanisme. Ainsi, les objectifs spécifiques de ma thèse sont décrits au regard des connaissances actuelles, en fin de cette synthèse.

Le chapitre II décrit l'ensemble des procédures expérimentales utilisées au cours de mon travail de thèse combinant des procédures moléculaires, physiologiques, de chimie analytique et d'imagerie.

Le chapitre III présente l'étude physiologique de la souche BerOc1. Cette étude décrit la croissance de la souche en fonction de différents substrats métaboliques et sources de soufre, deux facteurs impactant la méthylation du mercure. Elle apporte les bases nécessaires pour la mise au point d'un protocole de génération de souches mutantes de délétion et pour l'étude du mécanisme de méthylation du mercure.

L'impact des substrats métaboliques et des sources de soufre mais aussi de la concentration en mercure sur la méthylation du mercure et l'export du méthylmercure chez la souche BerOc1 sont exposés dans le chapitre IV. De plus, l'expression du gène *hgcA* est également présentée, et montre une absence d'induction de ce gène par le mercure.

Le chapitre V décrit l'étude réalisée sur le régulateur transcriptionnel ArsR, localisé en amont de *hgcA* et cotranscrit avec ce gène (Goñi-Urriza et al. 2020). En effet, bien que *hgcA* soit non inductible au Hg, la présence d'un régulateur transcriptionnel en amont de *hgcA* suggère fortement une réponse transcriptionnelle régulée.

Dans le chapitre VI, les travaux réalisés sur un cluster de gènes surexprimés en présence de Hg sont exposés. Ainsi, dans ce chapitre, la première description d'un mécanisme de résistance au mercure chez les bactéries méthylantes est réalisée. Il décrit son implication dans la localisation du mercure au niveau cellulaire et les conséquences sur la méthylation.

Le chapitre VII conclut mes travaux de thèse et expose les perspectives de ce travail.

L'ensemble des compétences liées au projet de recherche dans lequel ma thèse s'inscrit se retrouve au sein de l'Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM) et plus précisément, l'équipe de recherche du pôle CME (Chimie et Microbiologie de l'Environnement) basé sur les sites de Pau et d'Anglet de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour (France), lieux où j'ai effectué mon travail de thèse. Le projet implique de plus des collaborations avec l'Institut Méditerranéen d'Océanographie (MIO) de l'Université d'Aix-Marseille (France) pour ses compétences moléculaires sur la bactérie non méthylante *Desulfovibrio alaskensis* souche G20, et l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) de Grenoble (France) où ont été réalisées les mesures d'imagerie par nano-fluorescence X.





## CHAPITRE I - Synthèse bibliographique



# 1. Le cycle biogéochimique du mercure

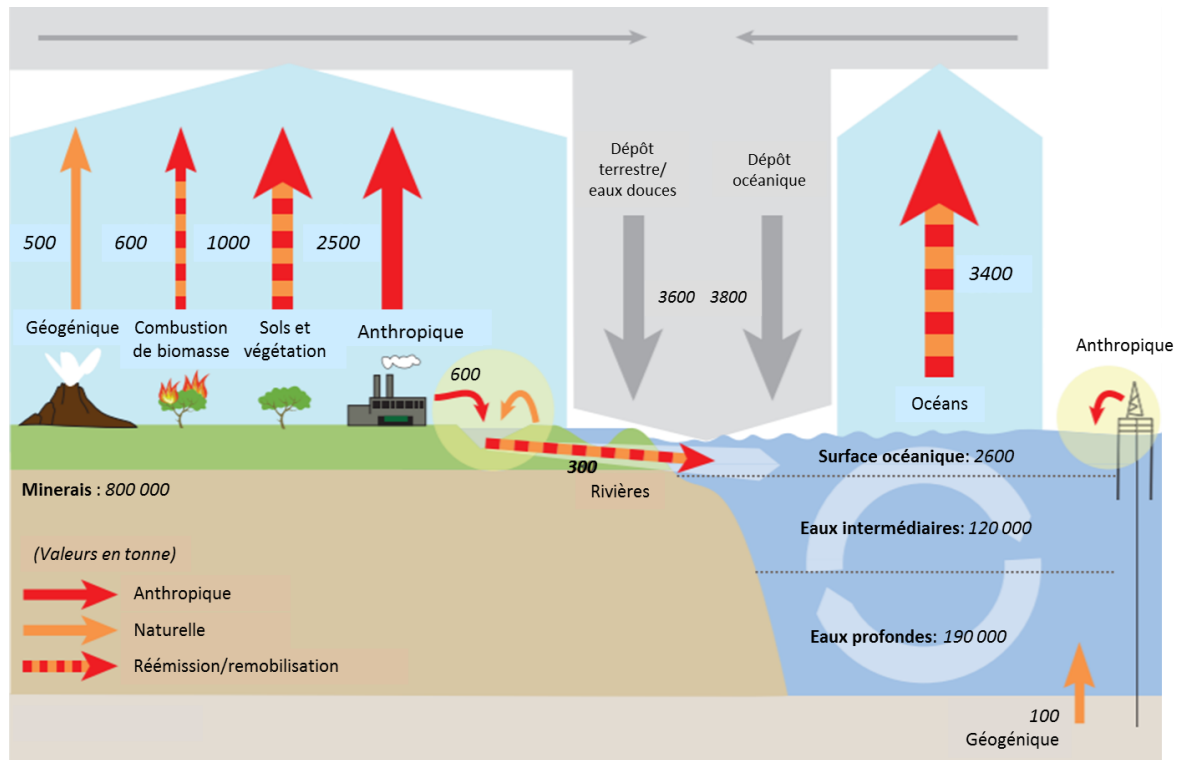
## 1.1. Sources du mercure dans l'environnement

Le mercure est un élément naturellement présent dans l'environnement au niveau de la croûte terrestre. Retrouvé majoritairement sous forme de minerai de sulfure de mercure appelé cinabre ( $\alpha$  HgS), il peut toutefois être libéré dans les environnements atmosphériques, aquatiques (eaux douces ou océans) et terrestres (sols et végétation) par des événements naturels tels que les éruptions volcaniques, le dégazage de geysers sous-marins ou encore, l'érosion des roches sous l'effet des intempéries (**Figure I-1** (Nriagu and Becker 2003; Astakhov et al. 2011)).

Cependant, bien qu'il entraîne une contamination environnementale globale, le mercure d'origine naturel ne représente qu'environ 10% des 8700 tonnes de mercure actuellement émises ou ré émises (feux de forêt) dans l'atmosphère (Outridge et al. 2018). En effet, la majeure partie de la contamination environnementale implique les activités humaines (événements anthropiques). Deux événements historiques majeurs, la ruée vers l'or et les Trente Glorieuses, ont fait exploser la teneur moyenne en mercure dans l'environnement depuis les années 1900 principalement à cause de la combustion du charbon, l'industrie métallurgique et, les activités minières intenses durant cette époque (Streets et al. 2011, 2017). A l'heure actuelle, les émissions de mercure d'origine anthropique dans l'atmosphère représentent 3.1 kilotonnes par an équivalent à 450% des émissions naturelles (Outridge et al. 2018).

Les événements naturels, de réémission ou, liés à l'activité humaine (anthropiques) conduisent à l'émission du mercure dans l'atmosphère sous sa forme volatile, le mercure élémentaire (Hg(0)) et, de manière plus minoritaire, de mercure sous sa forme oxydée (Hg(II)) dans les environnements terrestres et aquatiques. Le temps de résidence du Hg(0) dans l'atmosphère est suffisant pour qu'il soit largement distribué à l'échelle continentale et marine avant de se déposer au niveau des continents, mers, lacs et glaciers (Morel et al. 1998). L'oxydation du mercure élémentaire Hg(0) survient en haute troposphère et conduit à la formation de Hg(II) qui, lors de précipitations, se dépose dans les différents environnements. Le dépôt du mercure depuis l'atmosphère représente la plus importante source de mercure dans les sols et les océans. Au cours du dernier siècle, la concentration de mercure déposé affiche une augmentation de 300% dont une augmentation de 230% et de 25% dans les eaux de surface et les eaux profondes océaniques respectivement (Outridge et al. 2018). De plus, des études ont mesuré une augmentation de la concentration de mercure chez les animaux marins de l'Arctique de 10 à 12 fois au cours du dernier siècle : cela signifie que 92% du mercure chez les prédateurs marins est d'origine anthropique due aux émissions de l'Europe, de l'Amérique du Nord et de la Russie durant cette période (Programme 2013). Cette même augmentation est aujourd'hui

observée chez les oiseaux de mer vivant dans la mer de la Chine du Sud coïncidant avec l'augmentation de l'industrialisation de l'Asie de l'Est et du Sud-Ouest. Dans certaines populations tirant leur subsistance de la pêche comme au Brésil, au Canada, en Chine, en Colombie et au Groenland, il est apparu qu'entre 1,5 et 17 enfants pour 1000 présentaient des troubles cognitifs (léger retard mental) conséquence de l'ingestion de trop grandes quantité de mercure.



**Figure I-1** : Bilan (en tonnes) mondial du mercure illustrant les compartiments environnementaux et les voies majeures impactant le cycle global du mercure (à partir du rapport sur l'évaluation mondiale du mercure par le Programme des Nations unies pour l'environnement (UNEP) de 2013. Valeurs mises à jour à partir de *Outridge et al. 2018*).

Le mercure est donc un polluant « global » : il se retrouve à toutes les latitudes aussi bien au sein des écosystèmes terrestres que marins, dans la végétation, les sols, les zones humides, les neiges ou encore les océans. Ainsi déposé dans l'environnement sous forme Hg(II) ou de Hg(0), le mercure peut subir à la fois des transformations chimiques (abiotiques) mais aussi des transformations impliquant des microorganismes (transformations biotiques).

## 1.2. Devenir du mercure dans les compartiments environnementaux : transformations du mercure

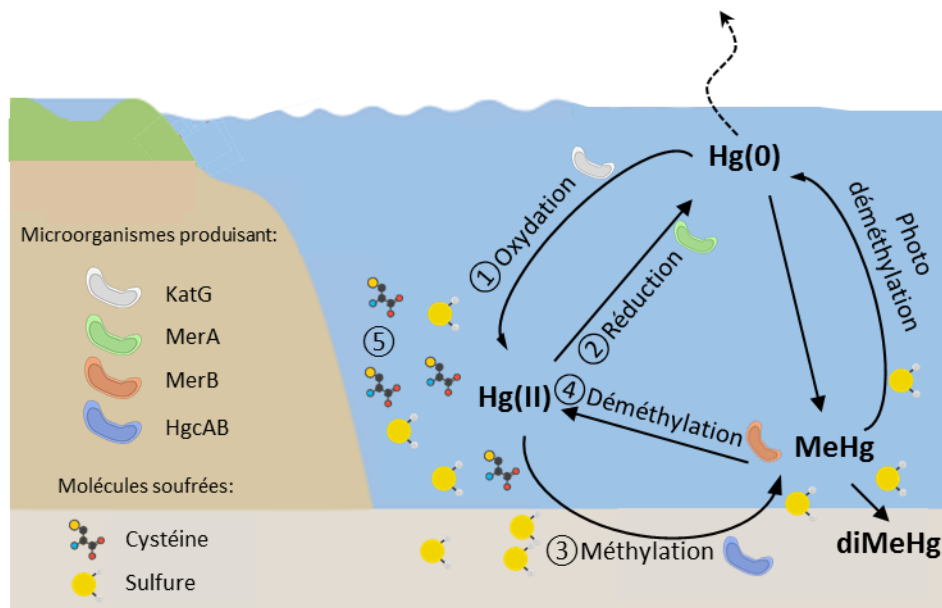
Bien que toutes les formes chimiques du mercure soient toxiques, les problèmes de santé humaine provoqués par le mercure sont majoritairement causés par sa forme méthylée, le méthylmercure (MeHg) (*Chapman and Chan 2000*). En effet, cette forme du mercure (formée par ajout d'un groupement méthyl sur une molécule de Hg(II)) est capable d'être accumulée dans les organismes vivants comparée aux concentrations retrouvées dans les environnements naturels (phénomène de bioaccumulation/ bioconcentration) mais aussi d'être bio amplifiée (biomagnifiée), c'est-à-dire que la concentration en méthylmercure par rapport au mercure total retrouvé dans un organisme augmente à chaque stade du réseau trophique (*Boudou and Ribeyre 1997*). Ainsi, la consommation du poisson représente la source principale d'intoxication des populations humaines par le mercure. L'incident survenu à Minamata dans les années 1950 a été la première intoxication au méthylmercure à l'échelle d'une population (*Harada 1995*). Il a permis de prendre conscience de l'ampleur de la toxicité du méthylmercure pour la santé humaine, de sa dissémination dans les environnements et plus tard, de celle du mercure lui-même (Hg(II) ou Hg(0)) et des transformations les reliant.

De ce fait, l'augmentation de la concentration en MeHg mais aussi l'augmentation de la concentration en Hg(II), substrat pour la formation du MeHg, représentent des transformations dangereuses pour l'environnement et la santé humaine. En revanche, qu'elles soient biotiques ou abiotiques, toutes les transformations menant à la diminution du réservoir de Hg(II) et du réservoir de MeHg lui-même sont dites détoxifiantes.

### 1.2.1. Oxydation du mercure élémentaire

L'oxydation du Hg(0) en Hg(II) est une étape critique dans le cycle biogéochimique du mercure puisqu'elle est responsable de l'introduction du mercure dans les environnements aquatiques et terrestres depuis l'atmosphère (**Figure I-1 –Dépot**). Cette réaction peut aussi survenir directement dans ces environnements à partir du réservoir de Hg(0) présent (**Figure I-2 – Réaction 1**). Elle peut être d'ordre abiotique ou biotique. L'oxydation abiotique fait appel à la photo oxydation en présence d'oxygène (*Lalonde et al. 2001*) mais peut aussi se produire à l'obscurité (*Amyot et al. 2005*). A ce jour une réaction biotique d'oxydation a été mise en évidence chez la bactérie gram négative *Escherichia coli* (*Smith et al. 1998*). Elle implique KatG, une hydroperoxydase bifonctionnelle jouant le rôle de catalase et de peroxydase classiquement impliquée dans la dismutation des peroxydes d'hydrogène les transformant en eau et substrats oxydés ou dioxygène. Dans le cas du mercure, cette réaction conduit à l'oxydation du Hg(0) en Hg(II). Ce mécanisme apparaît comme étant incomplet puisque la délétion du gène *katG* n'abolit pas entièrement la capacité à oxyder le Hg(0) par *E. coli*. Cette capacité

à oxyder le Hg(0) a de plus été mise en évidence chez des bactéries vivant naturellement dans les sols tels que les espèces du genre *Bacillus* et *Streptomyces* qui oxydent 4 à 5 fois plus le Hg(0) qu'*E. coli* (Smith et al. 1998). Puisque cette réaction aboutit à la formation du Hg(II), substrat de la méthylation du mercure, il est pertinent de noter que la réaction d'oxydation du Hg(0) réalisée par KatG est beaucoup plus lente que la réaction inverse, de réduction du Hg(II) réalisée par MerA, l'enzyme majeure impliquée dans la réduction du mercure (33 pmol de Hg(II) produits par minute par mL de cellule via l'oxydation par KatG (Smith et al. 1998) comparés à 1000 pmol de Hg(0) produits par minute par mL de cellule via la réduction par MerA (Summers and Silver 1972)).



**Figure I-2 :** Implication des transformations du mercure dans le cycle biogéochimique du mercure. Les réactions sont représentées dans un environnement aquatique mais sont aussi valables pour les environnements terrestres. Espèces du mercure : Hg(0) (mercure élémentaire); Hg(II) (mercure oxydé); MeHg (méthylmercure); diMeHg (diméthylmercure). KatG (Smith et al. 1998), MerA (Stanisich et al. 1977), MerB (Osborn et al. 1977) et HgcAB (Parks et al. 2013) sont toutes des enzymes produites par les microorganismes pouvant transformer les espèces du mercure.

### 1.2.2. Réduction du Hg(II)

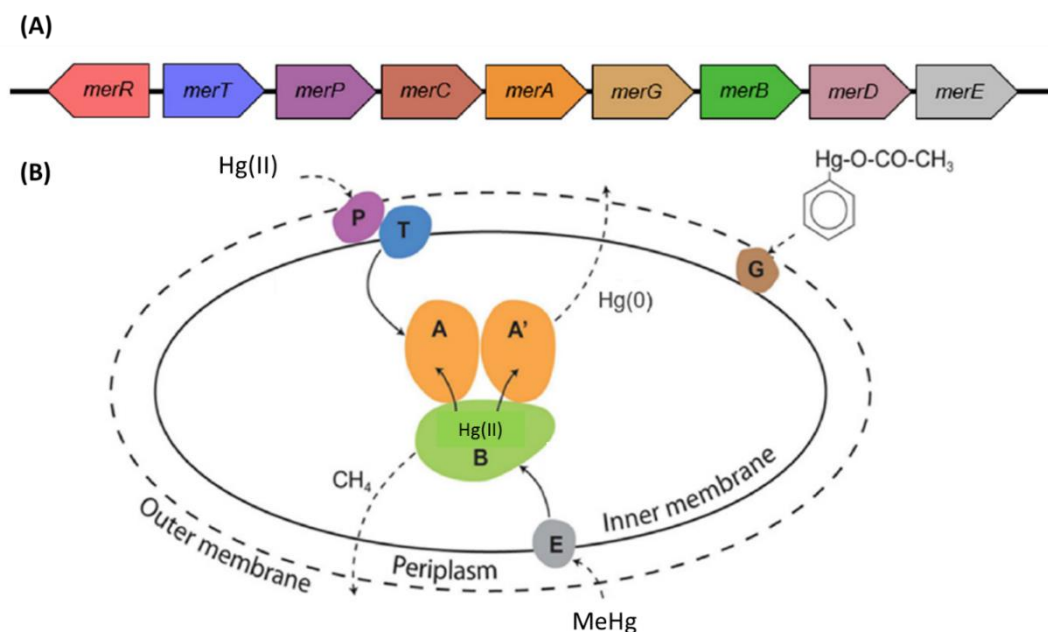
La réduction du Hg(II) est un mécanisme de détoxification du mercure puisqu'il permet de former du mercure volatile Hg(0) réémis dans l'atmosphère conduisant à la fois à l'élimination du mercure de l'environnement proche de la cellule mais aussi à la diminution du réservoir de substrat disponible pour la production de méthylmercure (**Figure I-2 – Réaction 2**). La réduction du Hg(II) peut se faire via des processus abiotiques impliquant la lumière (photoréduction (Costa and Liss 1999)) ou la matière organique naturelle (Gu et al. 2011; Lee et al. 2018). Plusieurs mécanismes biotiques participent de plus à la réduction du mercure. Ils semblent soit, (i) associer un couplage avec d'autres

processus tels que la réduction du Fer(III) chez les bactéries ferri réductrices et les bactéries magnétotactiques (Wiatrowski *et al.* 2006; Liu and Wiatrowski 2018) soit, (ii) conduire au rétablissement de l'homéostasie redox en participant à la photosynthèse et la protection contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez les cyanobactéries (Marteyn *et al.* 2013) ou encore, (iii) contribuer à la prise en charge d'un excès d'électrons en condition de carence phototrophique ou fermentative chez les bactéries mésophiles et thermophiles (Grégoire and Poulain 2016, 2018; Grégoire *et al.* 2018).

Cependant, la réduction biotique du Hg(II) en Hg(0) est majoritairement réalisée par un groupe de microorganismes résistants au mercure. Cette résistance leur est conférée par un opéron de gènes permettant d'assimiler et de détoxifier le mercure : l'opéron *mer* (**Figure I-3A**). Plus de 10 gènes ont été actuellement découverts comme appartenant au système *mer*. Les systèmes *mer* peuvent être plus ou moins complexes selon l'embranchement phylogénétique ; partant des *Crenarchaeota* avec les systèmes les moins complexes (2 gènes) jusqu'aux *Proteobacteria* ayant les systèmes les plus complexes (9 gènes (Barkay *et al.* 2010)). La structure génomique de ces systèmes est à la base composée de 4 gènes : *merT*, *merP* et *merA* exprimés à partir du même promoteur et *merR* porté par le brin complémentaire (Osborn *et al.* 1997). Les gènes *merCGDEFH* et surtout le gène *merB* se sont insérés au cours de l'évolution au niveau de la structure génomique de base *merTPA* conférant un plus large spectre de résistance aux microorganismes possédant ces systèmes. La résistance au mercure par ces microorganismes est connue comme un système double dans la détoxification du mercure (**Figure I-3B**): elle permet (i) la détoxification du Hg(II) en Hg(0), réaction catalysée par l'enzyme clé de l'opéron, MerA, une réductase mercurique (Stanisich *et al.* 1977) mais aussi, (ii) la détoxification du méthylmercure par clivage de la liaison Hg-C sous l'action de l'enzyme MerB, une lyase des composés organomercuriques (Osborn *et al.* 1997). Cette dernière réaction conduit à la production de méthane (CH<sub>4</sub>), volatile, et de Hg(II) immédiatement réduit en Hg(0) par l'enzyme MerA. En plus des transformations du mercure régies par le couple MerA-MerB, des protéines contribuant à la prise en charge du mercure par la cellule sont impliquées en tant que: (i) protéines de séquestration localisées dans le périplasme, MerP et MerG (Steele 1996; Kiyono and Pan-Hou 1999) diminuant respectivement la perméabilité du Hg(II) et du phénylmercure acétate (forme organique du mercure), (ii) protéines de transport, MerTCFH liant le Hg(II) (Hamlett *et al.* 1992; Wilson *et al.* 2000; Schué *et al.* 2009) et MerE liant le MeHg (Sone *et al.* 2010), pour les apporter aux enzymes pouvant les transformer au sien de la cellule et finalement, (iii) protéines régulatrices appelées régulateurs transcriptionnels, MerR (Nucifora *et al.* 1989) et MerD (Mukhopadhyay *et al.* 1991), répondant respectivement au Hg(II)/MeHg et au Hg(0). A l'état stationnaire (absence de mercure) ou à l'état induit (présence du mercure), le dimère de protéines MerR est fixé sur la région promotrice/opératrice de l'opéron *mer* située entre le gène



*merR* et le reste de l'opéron. A l'état stationnaire, la conformation de l'homodimère de MerR non lié au métal présente une conformation bloquant l'expression des gènes régulés. La fixation du mercure (Hg(II) ou MeHg) sur l'homodimère MerR induit un changement allostérique du régulateur entraînant une torsion de la région promotrice/opératrice favorable pour la transcription des gènes régulés, impliqués dans la détoxification du mercure (**voir Partie 3.2.2.**). Cette activation du système conduit à la production de Hg(0). Lorsque la concentration en Hg(0) augmente, sa fixation sur le régulateur transcriptionnel MerD entraîne un changement de conformation de ce dernier lui conférant la capacité à se fixer à la région promotrice du système *mer*. Cette fixation entraîne cette fois une inhibition de la transcription des gènes régulés conduisant à un retour à un état stationnaire.



**Figure I-3 :** Système de détoxification *mer*. (A) Organisation génomique de l'opéron *mer*. (B) Mécanisme de détoxification du mercure réalisé par les protéines codées par l'opéron *mer*. Espèce du mercure : Hg(II) (mercure oxydé); Hg(0) (mercure élémentaire); MeHg (méthylmercure); Hg-O-CO-CH<sub>3</sub> (phénylmercure acétate). CH<sub>4</sub> (méthane). La couleur des protéines se réfère aux gènes les codant (A). Le mécanisme des protéines codées par *merC*, *merG*, *merD* et *merE* n'est pas représenté. L'opéron *mer* peut faire intervenir la protéine MerH. Adapté de *Christakis et al. 2021*.

De 1 à 10% des microorganismes cultivables provenant de différents environnements naturels possèdent l'opéron *mer* (*Barkay 1987*). L'activité du système *mer* n'a à ce jour été mise en évidence que chez des microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs (*Schaefer et al. 2002*). Cependant, des études récentes ont observé que parmi les microorganismes pouvant coder pour un homologue de MerB, 40 à 50%, dont des microorganismes anaérobies stricts, ne possédaient aucun homologue du gène *merA* (*Christakis et al. 2021; Vigneron et al. 2021*). Si une déméthylation du MeHg en Hg(II) peut avoir lieu dans les environnements anoxiques sans possibilité de former du Hg(0), celle-ci pourrait

conduire à un cycle futile puisque ces environnements sont le principal lieu de la méthylation du Hg(II) conduisant donc à la production *de novo* de MeHg à partir du Hg(II). Ces découvertes récentes sur la présence de la protéine MerB sans la protéine MerA chez certains microorganismes suggèrent plutôt qu'un mécanisme de résistance au Hg(II), n'impliquant pas MerA, permet de prendre en charge le Hg(II) dans les environnements anoxiques.

### 1.2.3. Méthylation du Hg(II) et diméthylation du méthylmercure

L'ajout d'un groupe méthyl ( $\text{CH}_3$ ) à une molécule de Hg(II) pour former du méthylmercure (**Figure 2 – Réaction 3**) ou à une molécule de MeHg pour former du diméthylmercure (**Figure I-2 - diMeHg**) augmente de manière graduelle la toxicité du mercure. Le diméthylmercure (diMeHg) est retrouvé sous forme de sulfure de bisméthylmercure dans les environnements anoxiques (*Kanzler et al. 2018*) dont la formation semble influencée par la présence des sulfures. Peu de recherches ont abordé cette réaction du fait de la très grande toxicité de son produit final. Ainsi, la réaction de diméthylation reste très peu connue mais semble n'être liée qu'à des processus abiotiques.

Bien que la réaction de méthylation du Hg(II) puisse aussi se produire de manière abiotique sous certaines conditions de pH, température et concentrations en chlore (*Celo et al. 2006*), elle est principalement réalisée par des transformations biotiques dont les microorganismes sont les principaux acteurs (*Kerin et al. 2006; Bravo et al. 2018; Gilmour et al. 2018; Compeau and Bartha 1985*). Elle représente la première étape de la dissémination et de l'accumulation de la neurotoxine MeHg dans l'environnement. La découverte de deux protéines, HgcA et HgcB, essentielles pour la réaction de méthylation du Hg(II) par les microorganismes (*Parks et al. 2013*) permet d'une part (i) d'identifier les points critiques (hot spot) de production de méthylmercure au niveau environnemental et (ii) de donner un point de départ pour la recherche des processus moléculaires mis en place par les microorganismes capables de méthyler le mercure. Les acteurs biologiques, les mécanismes moléculaires et les questionnements liés à cette étape seront développés dans la partie 3 de ce chapitre.

### 1.2.4. Déméthylation du méthylmercure et du diméthylmercure

Bien que la déméthylation du MeHg peut être réalisée par des réactions abiotiques telles que la photodégradation du MeHg, elle est principalement effectuée *via* l'opéron *mer* et plus précisément, par la protéine MerB, décrite précédemment (**Figure I-2 – Réaction 4**). Ce type de déméthylation est appelé déméthylation réductrice du fait de la production de méthane et s'oppose à la déméthylation oxydative produisant en majorité du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ).

La déméthylation oxydative conduit à la formation de Hg(II) et de  $\text{CO}_2$  à partir de méthylmercure. Les acteurs moléculaires de cette réaction ne sont à ce jour pas connus. En revanche,

les acteurs biologiques pouvant réaliser cette réaction ont été identifiés : ils sont représentés par les bactéries sulfato réductrices (BSR (*Bridou et al. 2011*)), les méthanogènes méthylophiles (*Oremland et al. 1991*) et les bactéries ferri réductrices (BFR (*Lu et al. 2016*)). Ces microorganismes vivent dans les environnements anoxiques, hot spot de la méthylation du mercure. Ainsi, le lieu de la production du MeHg serait aussi celui de sa déméthylation. De plus, il a été montré que ces deux réactions peuvent être effectuées par un seul et même organisme (*Bridou et al. 2011; Lu et al. 2016; Goñi-Urriza et al. 2020*) pouvant ainsi mener à un cycle futile méthylation-déméthylation par ces derniers. Cependant, il a été montré qu'un microorganisme possédant la capacité à réaliser les réactions de méthylation et de déméthylation peut effectuer les réactions simultanément mais selon des taux différents (*Bridou et al. 2011; Goñi-Urriza et al. 2020*). Il serait alors possible que certains de ces microorganismes possèdent des aptitudes moléculaires plus favorables à l'une ou à l'autre de ces réactions conduisant, au niveau environnemental, à faire pencher la balance en faveur d'une situation de détoxification du mercure ou d'une situation préoccupante.

La déméthylation peut aussi avoir pour substrat le diméthylmercure (diMeHg). Cette réaction est de type réductive puisque conduisant à la production de deux molécules de MeHg et de méthane et est favorisée en présence de sulfure ou de complexe de mackinawite ( $\text{FeS}_{(s)}$ ) (*West et al. 2020*).

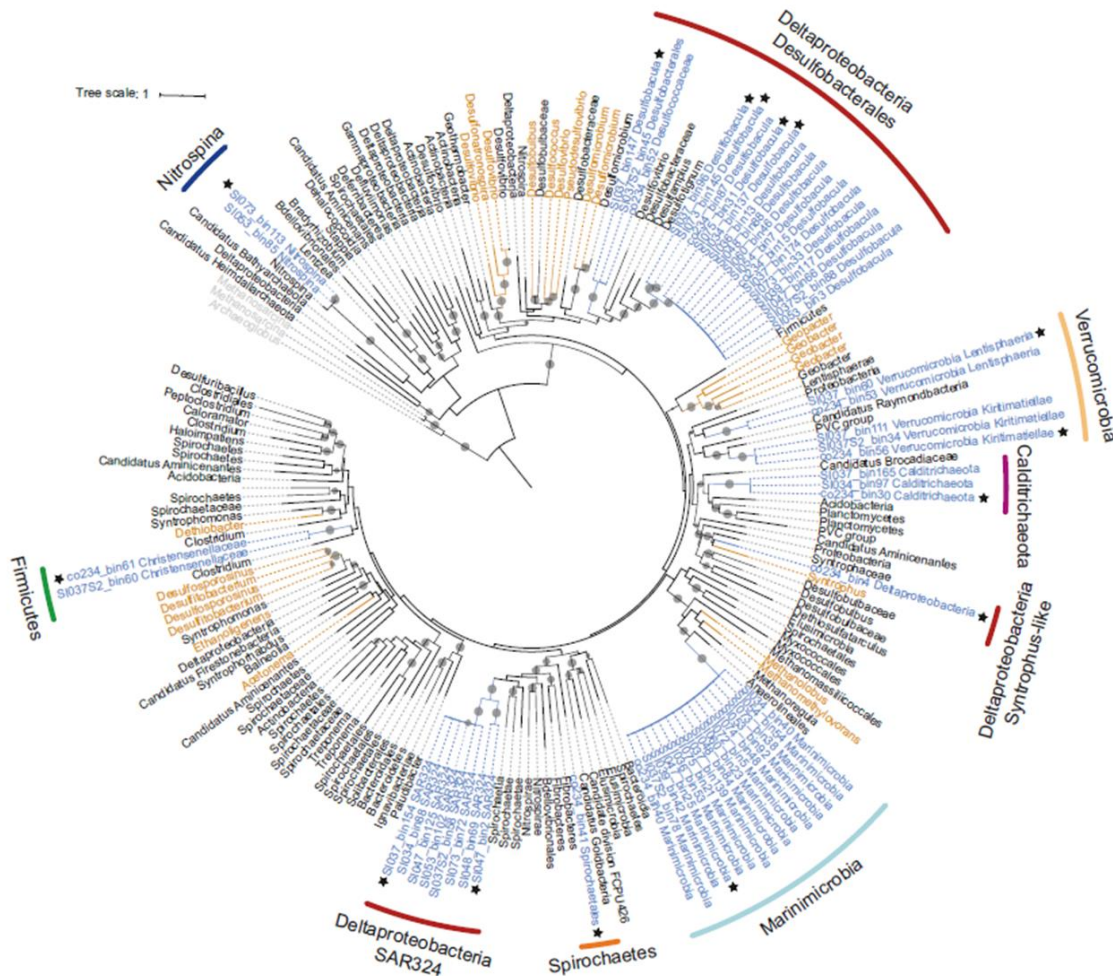
## 2. La méthylation du mercure : contexte environnemental

### 2.1. Les microorganismes impliqués dans la méthylation du mercure

En milieu aquatique, la méthylation du mercure est principalement réalisée par les microorganismes anaérobies (vivant en absence d'oxygène) tels que les bactéries sulfato réductrices (BSR). Historiquement, cette spécificité était due à un biais dans l'isolement des souches capables de méthyler. Cependant, à l'heure actuelle, une étude sur la diversité du gène *hgcA* dans les milieux marins a corroboré ce postulat en démontrant que le métabolisme le plus représenté chez les bactéries capables de méthyler relevait de la sulfato réduction et donc des bactéries sulfato réductrices (Vigneron *et al.* 2021). D'autres microorganismes vivant en anoxie stricte ont été identifiés expérimentalement pour leur capacité à méthyler le mercure parmi lesquels les bactéries ferri réductrices (Kerin *et al.* 2006; Bravo *et al.* 2018), les archées méthanogènes (Hamelin *et al.* 2011; Yu *et al.* 2013; Gilmour *et al.* 2018) mais aussi des syntrophies impliquant des interactions entre une BSR et un méthanogène, une BSR et une espèce du genre *Syntrophobacter* ou encore une espèce du genre *Syntrophobacter* et un méthanogène (Bae *et al.* 2014; Yu *et al.* 2018). Grâce à des études de métagénomique sur le gène *hgcA*, une large diversité de microorganismes anaérobies potentiellement méthylants est actuellement identifiée. Ces microorganismes appartiennent au phylum des *Firmicutes* (*Clostridium*), des *Acetobacteraceae*, des *Chloroflexi*, des *Nitrospina*, des *Spirochaetes* ou encore des Plantobactéries PVC (non exhaustif) mais aussi à toute une diversité n'étant pas identifiée au niveau phylogénétique (Gionfriddo *et al.* 2016; Jones *et al.* 2019; McDaniel *et al.* 2020; Azaroff *et al.* 2020) (**Figure I-4** (Villar *et al.* 2020)). Ces études n'ont cependant pas inclus de dimension expérimentale nécessaire pour évaluer la capacité de méthylation du mercure par ces phylums et valider leur implication dans la production du MeHg.

Actuellement, les études de métatranscriptomiques et de métagénomiques menées dans les environnements aquatiques naturels suggèrent fortement que la capacité à méthyler le mercure pourrait ne pas être limitée qu'aux microorganismes capables de vivre en anoxie. Ces études, toutes publiées en 2021, réussissent à associer une partie de la diversité du gène *hgcA* avec des métabolismes ou des conditions de prélèvement liés aux milieux oxiques et suboxiques et plus spécifiquement, aux populations du genre *Desulfobulbaceae* (Vigneron *et al.* 2021), *Desulfobacterota* et *Desulfobacterales* (incluant l'espèce *Desulfobacula*) (Capo *et al.* 2022) ou encore *Calditrichaeota* et *Marinimicrobia* (Lin *et al.* 2021). Ces dernières études, tout comme les études réalisées sur la diversité du gène *merA*, remettent en question les limites précédemment fixées cantonnant la méthylation du mercure aux environnements anoxiques et la réduction du mercure aux environnements oxiques et poussent vers

une réévaluation rapide de la disponibilité de toutes les espèces du mercure dans les différents compartiments aquatiques pour une meilleure compréhension du cycle biogéochimique.



**Figure I-4 :** Diversité phylogénique de la protéine HgcA (séquence protéique). Bleu: séquences d’HgcA mises en évidence par l’étude de Lin et ses collaborateurs (2021) en Colombie Britannique (Canada). Noir: séquences d’HgcA disponibles dans les bases de données. Orange: séquences d’HgcA prouvées expérimentalement. Gris: HgcA paralogs retrouvés chez des bactéries incapables de méthyler. Etoiles : séquences d’HgcA choisies arbitrairement dans chacun des groupes mis en évidence par l’étude de Lin et ses collaborateurs (15 au total) pour réaliser une autre approche. La classification taxonomique est indiquée à l’extérieur de l’arbre (Lin et al. 2021).

## 2.2. Disponibilité du mercure pour les microorganismes dans les environnements anoxiques

Dans les environnements aquatiques, le mercure peut être retrouvé sous forme dissoute, colloïdale et particulaire (Choe et al. 2003) mais aussi complexé à différentes molécules. Cet état est dépendant des paramètres physicochimiques (pH, chlore (Morel et al. 1998)) des milieux dans lesquels le mercure se trouve mais aussi, des molécules pouvant s’y lier et de leur concentration dans les

milieux. Ma thèse s'est attachée à décrire la réaction de méthylation du mercure par une bactérie sulfato réductrice. Cette réaction se déroulant dans les sédiments, la partie 2.2. se concentrera sur l'état du mercure dans les milieux anoxiques.

### 2.2.1. Effet des sulfures sur la disponibilité du mercure

Le passage d'un milieu oxygène à anoxique coïncide avec l'augmentation de la concentration en sulfures (Jørgensen *et al.* 2019). Ces sulfures sont le fruit du métabolisme de sulfato réduction effectué par les bactéries sulfato réductrices vivant dans ces conditions. Ils donnent alors lieu à la présence de l'ensemble des intermédiaires du cycle du soufre (les polysulfures (chaîne de soufre), les sulfates et les sulfites (par oxydation)) en forte concentrations dans ces milieux (Findlay 2016; Findlay and Kamysny 2017). Le mercure possède une affinité particulièrement élevée pour les formes réduites du soufre, propriété lui conférant par ailleurs sa toxicité vis-à-vis des cellules vivantes par liaison avec les protéines cellulaires. Ainsi, les sulfures de mercure (HgS) sont l'espèce prédominante du mercure dans les environnements anoxiques et peuvent évoluer entre forme soluble (complexes HgS) ou particulaire (HgS cristallisés) influençant la disponibilité du Hg.

La capacité des bactéries à produire des sulfures est un atout certain pour faire face à la toxicité des métaux (Aiking *et al.* 1985; Fortin *et al.* 1994; Ma *et al.* 2021). Des études ont montré que cette capacité augmentait la tolérance des bactéries aux métaux de 2 à 30 fois que ce soit pour les métaux essentiels ou non essentiels (Pan-Hou and Imura 1981). L'augmentation de la tolérance aux métaux grâce à la production de sulfures a spécifiquement été mise en évidence pour le mercure chez *Clostridium cochlearium*. En effet, la souche ayant une délétion du gène conférant la capacité à produire des sulfures est 40 fois plus sensible au mercure que la souche sauvage (Pan-Hou and Imura 1981). De plus, il a été observé que la liaison du mercure avec les sulfures conduisait à la formation de mercure sous forme particulaire alors identifiées, par diffraction des rayons X, comme étant des particules de  $\beta$ HgS. (Glendinning *et al.* 2005). Ces particules restent ainsi extracellulaires (observations en TEM-EDX) permettant une meilleure tolérance au mercure par les bactéries (Essa *et al.* 2002, 2005; Glendinning *et al.* 2005) mais peuvent également se former en intracellulaire (Lefebvre *et al.* 2007), la conséquence étant, dans tous les cas, une précipitation du mercure le rendant indisponible.

Les sulfures sont de plus à l'origine de la formation de précipités de sulfure de bisméthylmercure (bisMeHgS) dans les environnements anoxiques (Kanzler *et al.* 2018). Cette formation rejoint celle de la formation de précipités de HgS puisque ces deux réactions aboutissent à limiter la disponibilité du mercure et donc sa toxicité vis-à-vis des cellules (Abiko *et al.* 2021). Au niveau environnemental, ces réactions participent à la détoxification du Hg en conduisant soit à l'immobilisation du MeHg qui n'est plus disponible pour s'accumuler dans la chaîne trophique



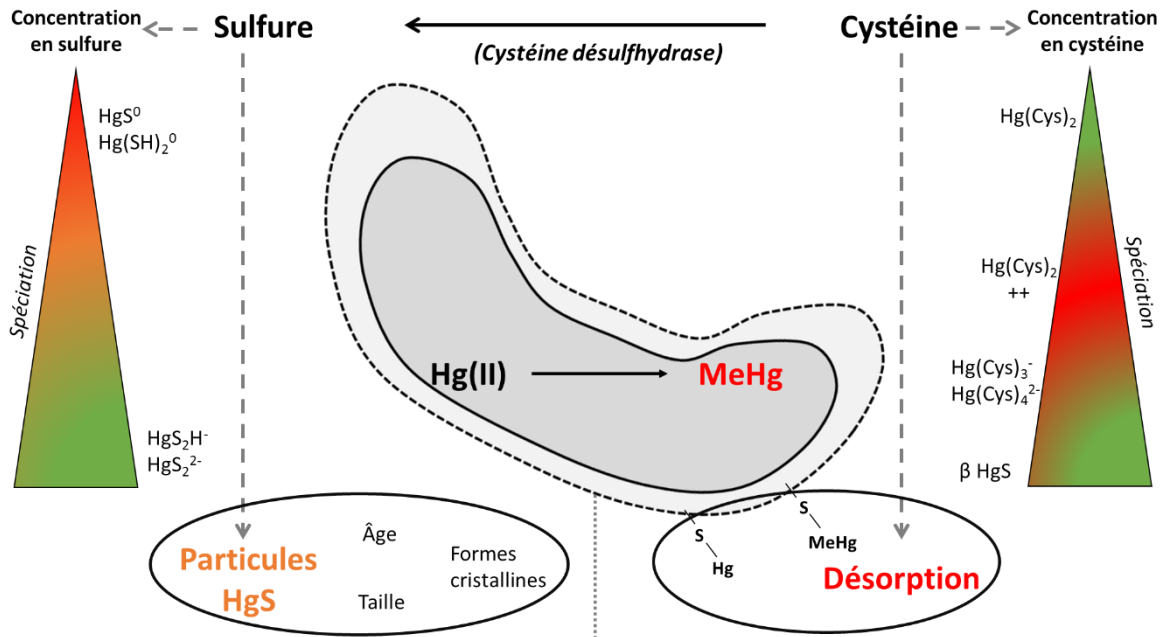
(formation de bisMeHgS) soit à celle du Hg(II) qui n'est plus disponible pour la méthylation (formation HgS).

Dans l'environnement, le passage oxiq-anoxiq coïncide aussi avec l'augmentation du mercure sous forme particulaire (Muresan et al. 2007). En effet, il a été prouvé que le mercure sous forme soluble avait tendance à s'agréger sous forme particulaire en présence de sulfures et de matière organique dissoute présents en concentrations élevées dans ces environnements (Deonarine and Hsu-Kim 2009; Slowey 2010; Gerbig et al. 2011). L'agrégation du mercure sous forme dissoute donne ainsi lieu à des particules de tailles variables allant des nanoparticules aux microparticules. Les conséquences de la formation et l'agrégation des particules HgS sur sa disponibilité pour la méthylation du mercure ont été approfondies chez des souches pures de bactéries méthylantes. Ces études ont démontré que la taille des particules est inversement proportionnelle à leur réactivité pour la réaction de méthylation (Zhang et al. 2012; Hsu-Kim et al. 2013). En accord avec ces études, il a été démontré que la présence de matière organique dissoute diminue la formation des particules HgS et consécutivement augmente la méthylation (Graham et al. 2012a). D'autre part, des études ont montré que les nano particules d'HgS devenaient moins réactives pour la réaction de méthylation au cours du temps (Zhang et al. 2012; Pham et al. 2014). Globalement, la disponibilité des particules d'HgS pour la méthylation du mercure est sous influence de divers paramètres : leur taille, leur âge, mais aussi plus récemment leur forme cristalline (Tian et al. 2021) (**Figure I-5**).

Par ailleurs, les conséquences de la spéciation des complexes HgS sur leur disponibilité et donc leur assimilation par les bactéries méthylantes ont été étudiées. Dans ces études, des bactéries méthylantes ont été exposées à une gamme de concentrations en sulfures pour évaluer la méthylation du mercure en résultant. Il est apparu que la production de méthylmercure est inversement proportionnelle à la concentration en sulfure (Benoit et al. 1999a, b, 2001a, b; Drott et al. 2007). Cependant, la formation de particules HgS ne survient qu'en présence de fortes concentrations de sulfures, cette diminution ne peut qu'en partie être expliquée par la formation de ces particules HgS. Ces études ont ainsi prédit que la concentration en sulfure est de plus inversement proportionnelle à la présence de complexes HgS neutres ( $\text{HgS}^0$  et  $\text{Hg}(\text{SH})_2^0$ ) (Benoit et al. 1999a; Drott et al. 2007) qui seraient capables de traverser la membrane cellulaire et d'être assimilés plus facilement que leurs homologues chargés (**Figure I-5**). Les mêmes observations ont été faites sur l'assimilation des intermédiaires du cycle du soufre (ici les polysulfures) par les bactéries méthylantes (Jay et al. 2000, 2002). En revanche, des études sur l'effet de la concentration en sulfate chez les BSR (et par conséquent la concentration en sulfure (Gilmour and Henry 1991; Gilmour et al. 1992; Kucharzyk et al. 2015)) et sur l'effet de la concentration en sulfures chez les méthanogènes (Gilmour et al. 2018), viennent modérer l'effet négatif précédemment établi de la concentration en sulfures sur la

méthylation en démontrant que l'augmentation de la concentration en sulfures à faibles concentrations ( $< 100 \mu\text{M}$ ) favorise la production de méthylmercure. Cet effet positif de la concentration en sulfure sur la méthylation a de plus été observé par mobilisation du Hg contenu dans les particules HgS lors de l'ajout de sulfate dans les sols des rizières (Li et al. 2019).

Ainsi, un consensus sur l'effet des sulfures sur la méthylation du mercure apparaît encore à ce jour crucial à élucider pour évaluer la dissémination du méthylmercure dans l'environnement.



**Figure I-5 :** Représentative schématique de l'impact des sulfures et de la cystéine (thiol) sur la méthylation du mercure. Les réactions majeures sont indiquées. Rouge : réactions conduisant à augmenter la production de méthylmercure (MeHg). Orange: réactions ayant des effets modérés sur la production du MeHg. Vert : réactions défavorisant la production de MeHg. Selon Thomas et al. 2017 ; Benoit et al. 1999 ; Hsu-Kim et al. 2013 ; Tian et al. 2021 ; Lin et al. 2015 ; Schaefer et al. 2009.

### 2.2.2. Effet des thiols sur la complexation du Hg

Les thiols, avec les sulfures et les intermédiaires du cycle du soufre, font partie des molécules soufrées pouvant former des complexes avec le mercure. Bien que leurs concentrations dans les milieux anoxiques soient largement inférieures à celles des sulfures ou des polysulfures (Findlay 2016; Bouchet et al. 2018), des études sur des souches pures ont proposé que les thiols influenceraient l'assimilation du mercure et sa méthylation par les bactéries (Schaefer and Morel 2009). La source de ces thiols est en partie due aux microorganismes eux même. En effet, les microorganismes, et notamment les bactéries méthyloxydantes, produisent des thiols de par leur physiologie. Que ce soit au cours de cultures de souches pures (Joe-Wong et al. 2012; Adediran et al. 2019; Song et al. 2020) ou



au sein d'environnements où la diversité microbienne est complexe comme les biofilms et périphytons des algues (Bouchet et al. 2018), il ressort que cette production est variée (allant du nM au  $\mu\text{M}$ ) et peut influencer la complexation du mercure dans les environnements contaminés. Par exemple, en laboratoire, la bactérie ferri réductrice *Geobacter sulfurreducens* PCA est capable de produire huit sortes de thiols (dont la cystéine, qui domine les thiols mesurés) à des concentrations de l'ordre du nM, concentrations supérieures aux concentrations en mercure pouvant être retrouvées dans certains environnements (Adediran et al. 2019).

L'effet des thiols sur la méthylation du mercure est thiol-dépendant mais aussi souche-dépendant. Plusieurs études chez la bactérie méthyliante *G. sulfurreducens* PCA ont montré que des thiols tels que la cystéine, le dithioerythritol (DTE) et la cystéamine (non exhaustif) favorisent la méthylation du mercure contrairement à la pénicillamine ou la glutathion (non exhaustif), défavorisant le processus (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al. 2011; Gilmour et al. 2011). En comparaison, ces deux derniers thiols favorisent la méthylation du mercure par la bactérie *P. mercurii* ND132. Il a de plus été mesuré, que certains thiols augmentent les taux d'assimilation du mercure par les bactéries et par conséquent, les taux de méthylation du mercure (Schaefer and Morel 2009). Ces derniers résultats suggèrent ainsi que la géométrie du complexe Hg-thiol est déterminante dans l'étape d'assimilation du mercure qui serait alors à l'origine des différences de méthylation observées selon les thiols. De plus, des études ont démontré que certains thiols favorisent le trafic cellulaire du mercure plus globalement. Des études ont en effet mis en évidence que d'une part (i) les thiols favorisent la remobilisation du Hg(II) adsorbé aux parois cellulaires qui redevient alors disponible pour être assimilé par la cellule (Liu et al. 2016) et d'autre part, (ii) les thiols favorisent la désorption du MeHg de la paroi des cellules (Lin et al. 2015a). Ainsi, que ce soit au niveau de la disponibilité du substrat, le Hg(II), ou au niveau de la dissémination de la neurotoxine, le MeHg, les thiols joueraient un rôle crucial dans la dynamique globale des espèces du mercure au niveau cellulaire. En accord avec cette hypothèse, une étude ayant mesuré l'effet de la cystéine sur les taux de méthylation et de déméthylation a démontré que la cystéine, en plus de favoriser le processus de méthylation du mercure, défavorise le processus de déméthylation du méthylmercure (Lu et al. 2016). Cette étude montre ainsi que les thiols peuvent jouer un rôle sur l'ensemble des espèces du mercure. Néanmoins, étant donné que les microorganismes capables de méthyler le mercure sont aussi capables de déméthylmer le méthylmercure et, que les taux de méthylation résultent de la production nette de méthylmercure, la production accrue de méthylmercure en présence de cystéine pourrait être la conséquence d'une déméthylation défavorisée plutôt que d'une méthylation favorisée.

Favorisant la méthylation du mercure chez les deux souches modèles PCA et ND132 (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al. 2011; Thomas et al. 2020), la cystéine est aujourd'hui le thiol modèle

pour la compréhension de l'effet des thiols sur la méthylation du mercure. La concentration en cystéine joue un rôle important dans la méthylation du mercure en influençant la spéciation des complexes Hg-cystéine (Hg(Cys)) et donc leur assimilation par la cellule (Schaefer and Morel 2009). En effet, une première étude a montré que l'augmentation de la concentration en cystéine de 0.01 à 10  $\mu\text{M}$  augmente la méthylation du mercure puis défavorise le processus de 10 à 1000  $\mu\text{M}$ . Un optimum de méthylation a ainsi été mesuré entre 1 et 100  $\mu\text{M}$  de cystéine. Différentes études ont modélisé que la présence de cystéine dès 0.001  $\mu\text{M}$  favoriserait la formation de complexes Hg(Cys)<sub>2</sub> facilement assimilables par la cellule (**Figure I-5** (Schaefer and Morel 2009; Lin et al. 2015b; Ndu et al. 2015)) dont la concentration ne ferait qu'augmenter avec l'augmentation de la concentration en cystéine jusqu'à 100  $\mu\text{M}$  (Schaefer and Morel 2009; Lin et al. 2015b). En revanche, à partir de 100  $\mu\text{M}$  de cystéine, l'augmentation de la concentration en cystéine formerait des complexes Hg(Cys)<sub>3</sub><sup>-</sup> et Hg(Cys)<sub>4</sub><sup>2-</sup> peu assimilables par la cellule car incapables de traverser la membrane cellulaire en raison de leurs charges (Lin et al. 2015b). Néanmoins, une étude a mesuré expérimentalement une spéciation dominée par des précipités de mercure sous forme de  $\beta\text{HgS}$ , peu assimilables par la cellule, lors de l'ajout de 1000  $\mu\text{M}$  de cystéine associé à 0.5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) (Thomas et al. 2018).

Même si une spéciation sous forme de complexes Hg(Cys)<sub>2</sub> a été modélisée comme favorisant l'assimilation du mercure par les bactéries, des études récentes ont démontré que la délétion du gène codant une enzyme catalysant la dégradation de la cystéine en sulfure, la cystéine désulfhydrase, entraîne une diminution de l'assimilation du mercure chez la souche mutante comparée à la souche sauvage couplée à un changement drastique de la spéciation des complexes mercuriels associés aux cellules (Thomas et al. 2019). Cette étude suggère donc que la dégradation de la cystéine sous forme de sulfure est essentielle pour l'assimilation du mercure. Elle a été menée sur une souche incapable de méthyler le mercure, cependant, chez les bactéries méthylantes, la capacité à produire des sulfures suite à l'ajout de cystéine a systématiquement été observée (Graham et al. 2012a, b; Thomas and Gaillard 2017; Thomas et al. 2018). Ainsi, à l'heure actuelle, il n'est pas clair que l'effet bénéfique de la cystéine sur l'assimilation et la méthylation du Hg soit la résultante de la cystéine elle-même et pourrait être dû à la production de sulfures suite à sa dégradation.

### 2.2.3. L'assimilation du Hg(II) par les cellules méthylantes : active ou passive ?

Alors que diverses études montrent que la méthylation du Hg(II) est un processus intracellulaire (Schaefer and Morel 2009; Gilmour et al. 2011; Parks et al. 2013) et que l'étape d'assimilation du Hg(II) par les microorganismes est déterminante pour ce processus (Benoit et al. 1999a; Schaefer and Morel 2009), le mécanisme par lequel le mercure est assimilé par les microorganismes reste méconnu. A l'heure actuelle, deux mécanismes d'assimilation du mercure sont proposés : (i) une assimilation passive grâce à la perméabilité naturelle des membranes cellulaires

(Gutknecht 1981; Benoit et al. 1999a, b, 2001b; Hsu-Kim et al. 2013; An et al. 2019; Zhou. 2017), et (ii) une assimilation facilitée ou active dépendante de l'énergie impliquant des transporteurs (Golding et al. 2002; Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al. 2011, 2014). Les études en faveur d'une assimilation passive du Hg(II) sont majoritairement soutenues par le fait que la concentration en complexes HgS neutres est positivement corrélée aux taux de méthylation réalisées par les bactéries (Benoit et al. 1999a, b, 2001b; Drott et al. 2007). Les études soutenant une assimilation facilitée ou active se basent sur le fait que la méthylation et l'assimilation du Hg(II) sont favorisées ou défavorisées en fonction des thiols ou des métaux présents dans l'environnement de la cellule suggérant que certains complexes mercuriels sont plus facilement assimilables grâce à des transporteurs spécifiques des thiols ou des métaux (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al. 2011, 2014).

Basée sur les arguments avancés en faveur d'une assimilation facilitée ou active, une étude a visé à déterminer les transporteurs des thiols pouvant être impliqués dans l'assimilation de complexes Hg-thiol chez la bactérie non méthylante *E. coli* (Ndu et al. 2015). Cette étude a démontré que ni la délétion des transporteurs du glutathion ni celles des transporteurs de cystéine/cystine n'impactaient l'assimilation des complexes Hg-glutathion et Hg-cystéine respectivement par la cellule. Ainsi, une assimilation facilitée/active du Hg(II) n'impliquerait pas ces transporteurs. Les auteurs de cette étude ont de plus procédé à la délétion des gènes codant les protéines MerT et MerP, dont l'implication dans la détection et l'assimilation du Hg(II) au sein de l'opéron *mer* a été démontré (Ndu et al. 2015). L'absence de ces protéines chez *E. coli* a conduit certes à une diminution de l'assimilation du Hg(II) par la cellule, néanmoins, la souche mutante a continué à assimiler le Hg(II). Les auteurs concluent donc qu'une assimilation passive du Hg(II) par les bactéries peut avoir lieu mais n'exclut pas pour autant une assimilation facilitée ou active.

Deux études majeures ont été menées sur l'assimilation du Hg(II) chez les bactéries méthylantes (Schaefer et al. 2011; An et al. 2019). Dans ces deux études, un découpleur du gradient de protons, le CCCP, a été utilisé pour déterminer si l'assimilation du Hg(II) se faisait de manière passive ou active. Alors que l'expérience de Schaefer et coll (Schaefer et al. 2011) a démontré que l'utilisation du CCCP conduisait à la perte de la capacité à assimiler le Hg(II), et ainsi que l'assimilation du Hg(II) se faisait majoritairement de manière active, l'étude de An et coll (An et al. 2019) a montré que le CCCP n'impactait pas significativement la capacité à assimiler le Hg(II) et donc que l'assimilation du Hg(II) se faisait majoritairement de manière passive. La seule différence entre ces deux expériences provient de l'ajout de thiol au cours de la première étude. Il pourrait alors s'avérer que l'assimilation du Hg(II) puisse se faire de manière passive mais, que lors de la présence de thiol, une assimilation active puisse se mettre en place pour prendre en charge les complexes Hg-thiol.

### 3. La méthylation du mercure à l'échelle moléculaire

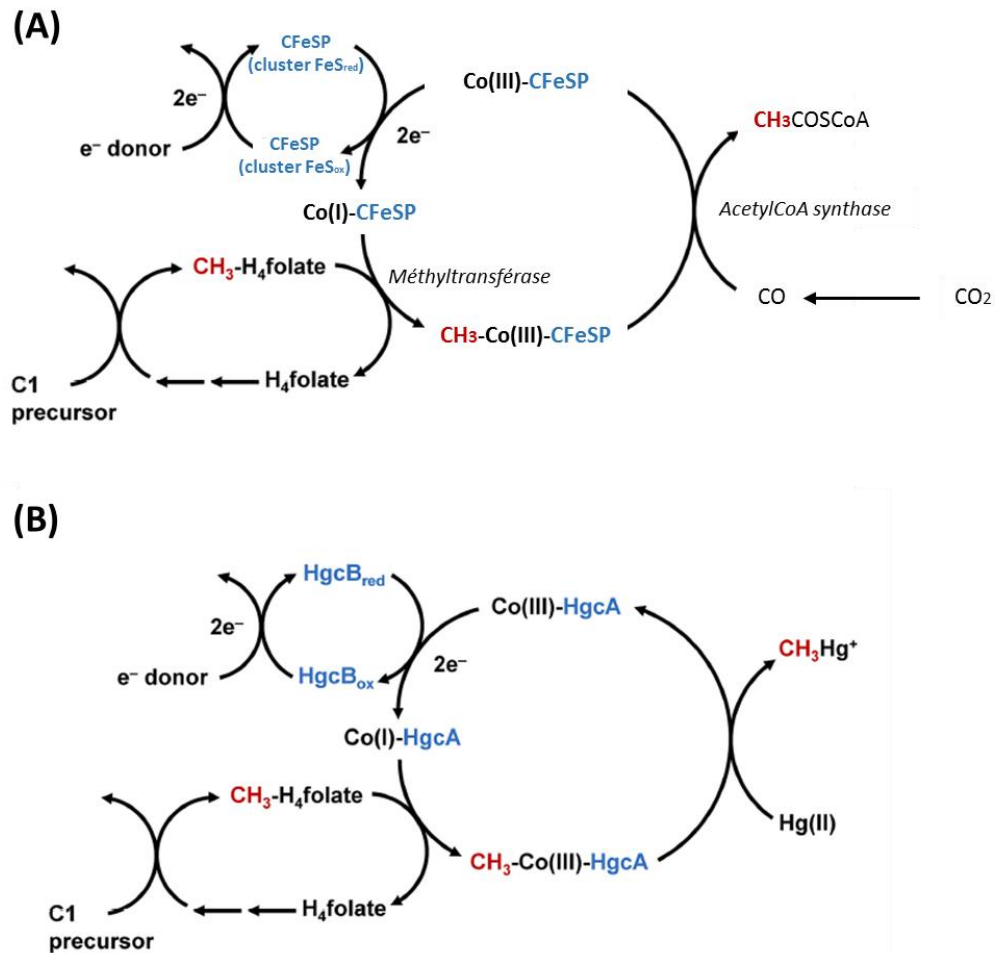
#### 3.1. La réaction de méthylation du mercure : rôle des protéines HgcAB

##### 3.1.1. Présentation de la réaction de méthylation du mercure

Les premières études visant à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la méthylation du mercure ont commencé dans les années 1990 chez la bactérie méthylante *Desulfovibrio desulfuricans* LS. Elles ont mené à la mise en évidence de (i) l'apport du groupe méthyl *via* la voie réductive de l'acétyl CoA synthase ou voie de Wood-Ljungdahl (Choi *et al.* 1994), (ii) l'implication d'une protéine corrinnoïde de 40 kDa (Choi and Bartha 1993; Choi *et al.* 1994) et (iii) l'implication d'une protéine ferrédoxine (Choi *et al.* 1994). La voie réductive de l'acétyl CoA synthase permet la formation d'une molécule d'acétyl CoA à partir d'une coenzyme A, d'un groupe méthyl et d'une molécule de monoxyde de carbone (CO) provenant de la réduction du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (**Figure I-6A**). Grâce à cette voie, un groupe méthyl, provenant d'une molécule de méthyl-folate, est transféré au niveau de l'atome de cobalt (Co) d'une cobalamine (ou vitamine B12) sous l'action d'une méthyltransférase. La cobalamine joue le rôle de cofacteur d'une protéine fer-soufre à corrinnoïde (CFeSP) ayant pour rôle le transfert du groupe méthyl pour former la molécule d'acétyl CoA finale. Le transfert du groupe méthyl sur la cobalamine entraîne l'oxydation de l'atome de Cobalt en Co(III) qui reste oxydé après transfert du groupe méthyl. Une étape de réduction de l'atome de Cobalt en Co(I) est alors essentielle pour qu'un nouveau groupe méthyl soit accepté par la cobalamine. Cette dernière étape est réalisée par l'oxydation de cluster fer-soufre faisant partie de la protéine CFeSP.

Ce n'est que des années plus tard, qu'une étude comparative des génomes entre bactéries méthylantes et non méthylantes a identifié deux protéines, HgcA et HgcB, spécifiques aux microorganismes méthylants (Parks *et al.* 2013). Les gènes *hgcA* et *hgcB* codent respectivement pour une protéine corrinnoïde et une ferrédoxine à cluster fer soufre. Le mécanisme de méthylation du mercure par les protéines HgcA et HgcB a été construit sur la base de la voie réductive de l'acétyl CoA dans laquelle (i) le mercure (Hg) serait le substrat de la réaction de méthylation à la place du monoxyde de carbone (CO), (ii) HgcA serait la protéine corrinnoïde catalysant, en association avec une cobalamine (cofacteur), le transfert du groupe méthyl et (iii) HgcB réduirait l'atome de Cobalt de la cobalamine grâce à l'oxydation de ses clusters fer-soufre afin que cette dernière puisse de nouveau fixer un groupe méthyl (**Figure I-6B**). L'ensemble HgcA-HgcB aurait ainsi un rôle équivalent à une protéine fer-soufre à corrinnoïde (CFeSP) avec comme co facteurs une cobalamine et deux clusters fer-soufre et conduirait ainsi à la formation d'une molécule de méthylmercure. De plus, la délétion de l'un des deux gènes ou des deux gènes *hgcA* ou *hgcB* abolit complètement la capacité à méthyler le mercure chez les souches bactériennes méthylantes *Pseudodesulfovibrio mercurii* ND132 et

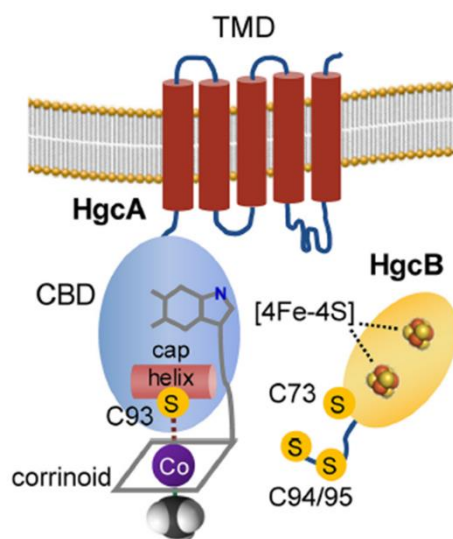
*Geobacter sulfurreducens* PCA démontrant leur importance dans le mécanisme de méthylation du mercure et plus particulièrement l'importance de chacune de leurs fonctions dans cette réaction. En revanche, aucun effet de la délétion des gènes *hgcAB* sur la déméthylation du MeHg par une souche méthylyante ne semble avoir été mis en évidence (Date et al. 2019).



**Figure I-6** : Mécanismes de transfert du groupement méthyl. **(A)** Voie réductive de l'acétyl CoA. CO (monoxyde de carbone); CO<sub>2</sub> (dioxyde de carbone); CFeSP (protéine fer-soufre à corronoïde); CH<sub>3</sub> (groupement méthyl); red (réduit); ox (oxydé). **(B)** Voie hypothétique de la méthylation du mercure par les protéines HgcAB. Hg (mercure). Adapté de Date et al. 2019.

### 3.1.2. Structure des protéines HgcA et HgcB

Le domaine [Asn-(Val/Ile)-Trp-Cys-Ala-(Ala/Gly)-Gly-Lys] est retrouvé conservé chez tous les orthologues de la protéine HgcA. Il se situe dans l'hélice C terminale de la protéine. Ce domaine est à l'heure actuelle supposé être le domaine de liaison avec son cofacteur, récemment confirmé comme étant une cobalamine (Cooper *et al.* 2020). Des expériences de mutagenèse dirigée conduisant à des substitutions des acides aminés (aa) de ce domaine ont montré que la Cystéine 93 (Cystéine centrale du motif) est essentielle pour que la méthylation du mercure par la protéine HgcA ait lieu (Figure I-7).



**Figure I-7** : Représentation de la structure des protéines HgcA et HgcB basées sur leurs séquences. Les cystéines essentielles à l'activité de ces protéines sont annotées. L'atome de Cobalt du cofacteur d'HgcA, la cobalamine, est noté Co tout comme les clusters fer soufre [4Fe-4S] suggérés comme jouant le rôle de cofacteur d'HgcB. TMD: domaines transmembranaires d'HgcA. CBD: domaine de liaison corrinoïde (Date *et al.* 2019).

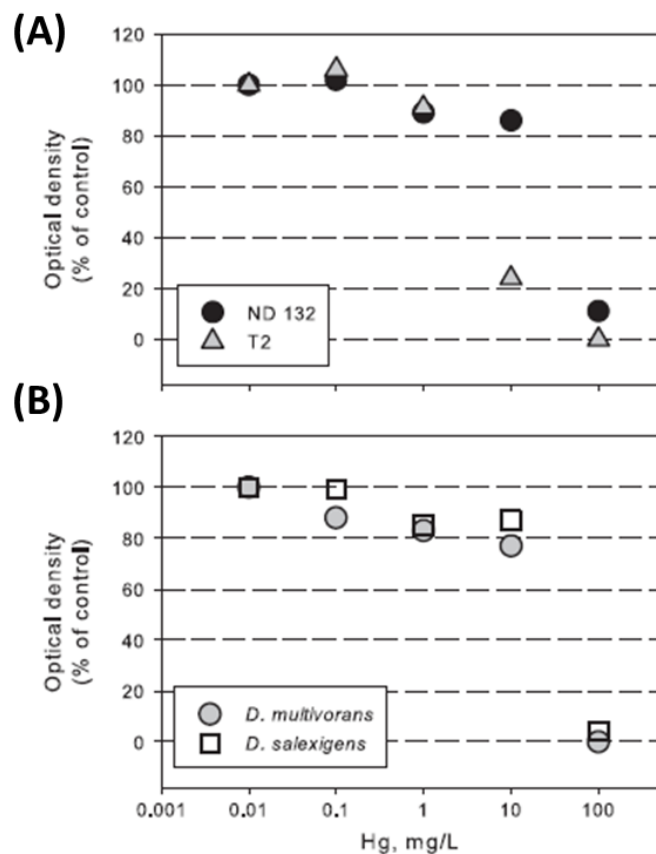
De plus, des mutations conduisant à des substitutions du Tryptophane 92 ou de l'Alanine 94 en Proline (acide aminé qui interrompt les structures secondaires ordonnées d'une protéine) abolissent aussi la capacité à méthyler d'HgcA (Smith *et al.* 2015). Ces résultats montrent que la structure de l'hélice C terminale d'HgcA est essentielle pour sa fonction certainement afin de pouvoir se lier à son cofacteur, la cobalamine, qui lie le groupe méthyl. L'implication d'une cystéine en tant qu'acide aminé essentiel chez une CFeSP est inédite, la liaison se faisant classiquement par l'intermédiaire d'une Histidine (Ludwig and Matthews 1997). Une étude basée sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) a déterminé la structure électronique de la coordination thiolate entre la cystéine 93 et le cobalt et a montré que cette coordination pouvait faire appel à un groupe méthyl sous forme de radical méthyl mais privilégierait la forme méthyl carbanion (Zhou *et al.* 2014).

La protéine HgcA possède de plus cinq domaines transmembranaires permettant son insertion au niveau de la membrane interne (**Figure I-7**). La délétion de ces domaines entraîne la perte de la capacité à méthyler démontrant que ces domaines sont essentiels pour la fonction de la protéine (Smith et al. 2015). Cependant, ces expériences n'ont pas permis de détecter si ces domaines étaient essentiels pour la protection de la protéine contre la dégradation protéolytique ou si HgcA jouerait un rôle spécifique au niveau de la membrane interne. A l'heure actuelle, il est proposé que ces domaines pourraient jouer un rôle dans la protection de la cobalamine ou dans le transport du mercure (Smith et al. 2015). En accord avec cette dernière idée, une étude a de plus montré que la délétion des gènes *hgcAB* entraîne une diminution de 30% de l'assimilation du mercure (Lin et al. 2014a). En revanche, certaines substitutions des acides aminés constituant le domaine conservé de la protéine HgcA entraînent une augmentation de la capacité à méthyler par une souche méthylante démontrant que la fonction de HgcA n'est pas optimale pour la méthylation du mercure (Smith et al. 2015).

La structure de la protéine HgcB a de plus été élucidée. Elle possède 2 motifs capables de lier des clusters fer soufre à géométrie cubane. La liaison d'un cluster [4Fe-4S] est régie par la présence de cystéines au sein de la protéine sous forme d'un motif CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>C caractéristique de cette liaison. La capacité de la protéine d'HgcB à passer d'un état réduit à un état oxydé a été récemment identifiée, suggérant que cette protéine est capable de catalyser une réaction d'oxydoréduction grâce aux clusters fer-soufre qu'elle utiliserait en tant que cofacteurs (Cooper et al. 2020). HgcB possède à son extrémité C terminale deux cystéines vicinales (C94 et C95). Ces cystéines se lient par un pont disulfure et peuvent jouer un rôle dans la liaison au mercure ou dans le changement redox de la protéine. La substitution des deux cystéines vicinales en alanine (acide aminé neutre) entraîne une réduction de la méthylation de 95% alors que la substitution d'une seule des deux cystéines n'impacte pas la capacité à méthyler (Smith et al. 2015). De plus, la mutation d'une autre Cystéine (C73) ne se trouvant pas à proximité des deux cystéines vicinales et ne faisant pas partie des clusters fer-soufre abolit la méthylation du mercure (Parks et al. 2013). La fonction de la protéine HgcB ne fait donc appel qu'à une seule de ces deux cystéines vicinales mais requièrerait la cystéine plus distale en position 73 pour jouer son rôle dans la liaison du mercure comme connu pour la protéine MerB (Smith et al. 2015).

La fonction première des protéines HgcAB n'est pas connue mais ne semble ni être en lien avec les mécanismes de survie cellulaire ni avec ceux impliqués dans la prolifération des souches car aucune altération de la croissance n'est observée chez la souche mutante  $\Delta hgcAB$  comparée à la souche sauvage (Parks et al. 2013). De plus, des tests de sensibilité au Hg(II) ont été effectués en comparant des souches capables de méthyler et possédant les gènes *hgcAB* (*Pseudodesulfovibrio mercurri* ND132 et *Desulfovibrio desulfuricans* T2) à des souches ne possédant pas les gènes *hgcAB* et donc incapables de méthyler le mercure (*Desulfococcus multivorans* DSM 2059 et *Maridesulfovibrio salexigens* DSM 2638) (**Figure I-8**). Ces études ont testé la croissance des souches exposées à une gamme de

concentration de Hg(II) allant de 0.05 à 500  $\mu\text{M}$  ; concentrations élevées comparées à la concentration de 0.1  $\mu\text{M}$  de Hg(II) classiquement retrouvée dans les sédiments contaminés (Gilmour et al. 2011). Il apparaît que la résistance au Hg(II) est identique entre les souches capables de méthyler le Hg et les souches non méthylophiles suggérant fortement que les protéines HgcAB ne confèrent pas une résistance au Hg(II).



**Figure I-8 :** Tests de sensibilité au Hg(II) réalisés sur des souches méthylophiles (A) et des souches non méthylophiles (B). Les souches ont été cultivées en fermentation pyruvate (Gilmour et al. 2011).



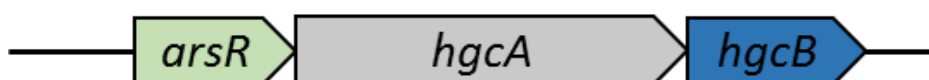
## 3.2. Mécanismes de régulation en réponse aux métaux

### 3.2.1. La méthylation du mercure : un mécanisme régulé ?

Alors que la délétion des gènes *hgcAB* abolit complètement la capacité à méthyler le mercure chez les bactéries méthylantes, elle reste à ce jour la seule preuve du lien entre HgcAB et le mercure. En effet, il a tout d'abord été montré que le mécanisme de méthylation n'était pas inductible par le mercure (Gilmour et al. 2011) mais aussi, de manière plus spécifique, que l'induction de l'expression d'*hgcAB* par le mercure n'était détectable ni au niveau transcriptomique ni au niveau protéomique (Goñi-Urriza et al. 2015; Qian et al. 2018). Etant donné que d'une part, la délétion des gènes *hgcAB* abolit la capacité à méthyler le Hg(II) et que d'autre part, ces gènes ne sont pas inductibles au Hg(II), il serait pertinent d'élargir les recherches sur ce cluster de gènes afin de déterminer si une régulation ne s'opère pas sur les gènes *hgcAB* via un autre inducteur que le mercure.

De manière intéressante, une récente étude comparant l'organisation génomique des souches méthylantes du genre *Desulfovibrio* et *Pseudodesulfovibrio* a identifié un gène codant pour un potentiel régulateur transcriptionnel, annoté *arsR*, se situant en amont du gène *hgcA* chez certaines de ces souches (**Figure I-9**). Ce cluster de gènes *arsR-hgcA*, en plus de ne présenter qu'un seul et unique promoteur se situant en amont d'*arsR*, a été retrouvé comme étant co transcrit en absence ou en présence de Hg(II) (0.05  $\mu$ M et 5  $\mu$ M de Hg(II)). Cette étude suggère alors fortement qu'il existerait un lien entre les protéines de la méthylation du mercure, HgcAB, et, la protéine ArsR. De plus, la protéine ArsR étant annotée comme appartenant à la famille ArsR-SmtB, une vaste famille de régulateur dont les membres sont capables de reconnaître une large diversité de métaux, elle pourrait être en accord avec l'implication d'un inducteur métallique différent du mercure dans la régulation des gènes de la méthylation du mercure.

La suite de la partie 3.2. se consacrera ainsi la description plus précise des régulateurs transcriptionnels de la famille ArsR-SmtB.



**Figure I-9** : Organisation génomique des gènes *arsR*, *hgcA* et *hgcB* chez *P. hydrargyri* souche BerOc1. La direction des ORF est indiquée par les encadrés fléchés (selon Goñi-Urriza et al. 2020).

### 3.2.2. La régulation transcriptionnelle : focus sur la famille ArsR-SmtB

Que l'on parle de métaux essentiels au fonctionnement des organismes (pouvant atteindre de fortes concentrations au niveau cellulaire) ou de métaux non essentiels (présents à des concentrations traces), tous les éléments métalliques peuvent être toxiques pour la cellule. Ainsi, chez les organismes, dont les procaryotes, la mise en place rapide d'une réponse moléculaire afin de récupérer le métal pour l'utiliser, ou au contraire le détoxifier, est essentielle à leur survie. Cette réponse implique de nombreux gènes dont l'expression est régulée par la présence de l'élément métallique (*Osman and Cavet 2010; Saha et al. 2017*).

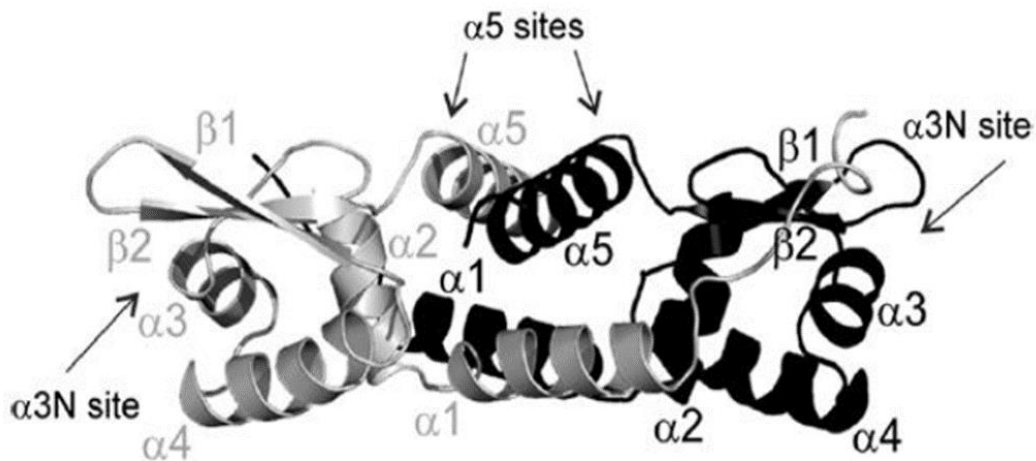
La régulation d'un gène peut se faire à différents niveaux de son expression, au niveau post-transcriptionnel ou transcriptionnel, cette dernière faisant appel à des régulateurs dits transcriptionnels. Les régulateurs transcriptionnels agissent au niveau de la séquence promotrice/opératrice des gènes par interaction physique avec l'ADN et peuvent avoir de multiples cibles dans le génome (gènes ou opérons) impliquées dans la prise en charge des métaux par la cellule. En 2010, sept familles de régulateurs transcriptionnels sensibles aux métaux ont été décrites : ArsR-SmtB, MerR, CsoR-RcnR, CopY, DtxR, Fur et NikR (*Osman and Cavet 2010; Saha et al. 2017*).

Parmi ces familles de régulateurs, la famille ArsR-SmtB est la plus grande par le nombre de membres la composant mais surtout au niveau de la diversité des métaux reconnus (*Osman and Cavet 2010; Saha et al. 2017; Roy et al. 2018*).

#### 3.2.2.1. Présentation de la famille ArsR-SmtB

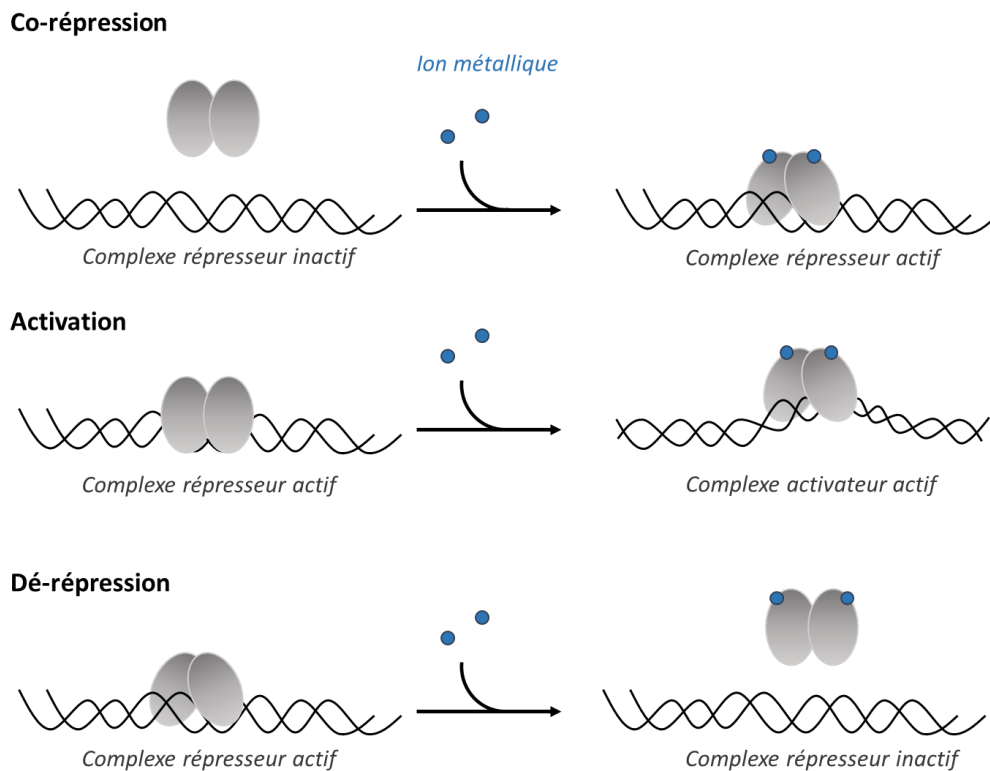
Les protéines appartenant à la grande famille ArsR-SmtB sont des régulateurs transcriptionnels dont la majorité est impliquée dans la détection d'un manque ou d'un excès de métal. Ces protéines possèdent des motifs de liaison aux métaux leur permettant de détecter les métaux et consécutivement de réguler l'expression de gènes cibles pour maintenir l'homéostasie de ces métaux au niveau cellulaire. Au sein de la famille ArsR-SmtB, certaines protéines possèdent aussi des motifs ne liant pas les métaux et étant impliquées dans la régulation d'autres processus tels que le stress oxydatif ou la biosynthèse de pigment (*Osman and Cavet 2010; Saha et al. 2017; Roy et al. 2018*).

Les régulateurs transcriptionnels de la famille ArsR-SmtB liant les métaux sont en général de petites protéines (114,6 acides aminés en moyenne) impliquées dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines engagées dans l'import ou l'export du métal (ex : transporteurs), dans le stockage (ex : ferritines), dans la détoxification (ex : réductases et oxydases), dans le transport intracellulaire (ex : métallochaperones) ou encore dans la séquestration (ex : métallothionéines) (Tottey *et al.* 2005; Osman and Cavet 2010). Ils fonctionnent en homodimères qu'ils soient liés (faible affinité avec la séquence d'ADN cible) ou pas (forte affinité avec la séquence d'ADN cible) au métal. Chaque monomère possède une structure secondaire caractéristique avec cinq hélices  $\alpha$  et deux feuillets  $\beta$  organisée comme suit :  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 5$  (**Figure I-10**). Cette structure secondaire les distingue des autres familles de régulateurs transcriptionnels. Pour exemple, les membres de la famille MerR possède une structure secondaire composée de 4 hélices  $\alpha$  et 3 feuillets  $\beta$  comme suit :  $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ . C'est au niveau des hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  que les motifs de liaison aux métaux de la famille ArsR-SmtB se situent (**voir partie 3.2.2.2.**). De plus, comme tous les régulateurs transcriptionnels, ces protéines possèdent un motif Helix Turn Helix (HTH) très conservé permettant la liaison à l'ADN au niveau de la région promotrice/opératrice (Saha *et al.* 2017; Roy *et al.* 2018). Dans cette famille, le motif HTH est situé au niveau des hélices  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$ , la reconnaissance de la séquence d'ADN étant réalisée par l'hélice  $\alpha 4$  spécifiquement. Le site de fixation à l'ADN est cependant dépendant du régulateur.



**Figure I-10** : Structure quaternaire des membres de la famille ArsR-SmtB (ici la protéine SmtB de *Synechococcus elongatus*). Ces régulateurs transcriptionnels s'associent en homodimères: une sous-unité est représentée en gris et l'autre en noir. La structure secondaire caractéristique de cette famille ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 5$ ) est annotée et les sites de fixation des métaux  $\alpha 3N$  (liaison inter-homodimérique) et  $\alpha 5$  (liaison intrahomodimérique) sont indiqués par des flèches.

Trois modes d’actions distincts dans la régulation des gènes par les régulateurs transcriptionnels sont connus (**Figure 11** (Osman and Cavet 2010)): (i) la co-répression (famille Fur, DtxR et NikR), où la présence du métal entraîne la fixation des régulateurs jouant un rôle de répression des gènes cibles, (ii) l’activation (famille MerR), où le régulateur est continuellement fixé à l’ADN en absence ou en présence de métal, la présence de métal engendrant un changement allostérique de l’homodimère et consécutivement une torsion de l’ADN entraîne l’expression des gènes et (iii), la dé-répression (famille CsoR-RcnR et CopY), où le régulateur transcriptionnel est fixé et réprime l’expression des gènes en absence du métal, la présence du métal entraînant un changement allostérique du régulateur qui cette fois se détache de l’ADN pour que l’expression des gènes puisse avoir lieu. Les protéines de la famille ArsR-SmtB agissent en tant que régulateurs négatifs suivant un mode d’action de dé-répression : la protéine fixée sur l’ADN empêche l’expression du ou des gènes cibles en absence du métal. En présence du métal, ce dernier se fixe au niveau de chaque monomère entraînant un changement allostérique de la protéine diminuant son affinité pour la séquence d’ADN cible. Le régulateur se détache ainsi de sa séquence cible et l’expression du ou des gènes peut alors avoir lieu.



**Figure I-11** : Mode d’action des régulateurs transcriptionnels. Les familles Fur, DtxR et NikR suivent classiquement un mode d’action de co-répression même si certains membres peuvent suivre un mode d’action de co-activation (pas représentées). La famille MerR suit un mode d’action d’activation. Enfin, les familles famille CsoR-RcnR, CopY et ArsR-SmtB suivent un mode d’action de dé-répression.

La famille ArsR-SmtB inclut un nombre très important de régulateurs, parmi eux, trois protéines ont été très bien caractérisées : il s'agit de SmtB, ArsR et CadC. SmtB a été caractérisée chez *Synechococcus* PCC 7942 en 1993 (Morby et al. 1993) comme étant impliquée dans la résistance au zinc. En absence ou en présence de faibles concentrations de zinc, SmtB se fixe sur la région promotrice/opératrice de *smtA* ce qui empêche son expression. Quand la quantité en zinc intracellulaire augmente, SmtB se détache de la région promotrice/opératrice ce qui permet l'expression du gène *smtA* codant une protéine de séquestration du zinc (Morby et al. 1993). ArsR a été bien décrite chez *E. coli* et agit comme SmtB pour réguler l'expression de l'opéron *ars* (voir partie 3.2.2.3.). ArsR peut reconnaître l'arsenic, l'antimoine et pour certaines protéines, le bismuth. Enfin, CadC régule l'expression du gène codant pour la protéine CadA, impliquée dans l'efflux du cadmium (Endo and Silver 1995). La présence de cadmium, de zinc ou de plomb induit l'expression de *cadA* par complexation du métal avec CadC et la libération de la région promotrice/opératrice. Ces trois protéines possèdent des séquences similaires et c'est sur cette base que d'autres protéines régulatrices ont pu être ajoutées à la famille ArsR-SmtB (Osman and Cavet 2010).

Aujourd'hui la famille inclut de nombreuses protéines capables de reconnaître une grande diversité de métaux (Table I-1). Ces protéines sont largement distribuées chez les archées (*Euryarchaeota* et *Crenarchaeota*) et chez les bactéries (*Proteobactéries*, *Firmicutes*, *Actinobactéries* et *Bacteroidetes*). Une même bactérie peut posséder plusieurs régulateurs. C'est notamment le cas de *Mycobacterium tuberculosis* qui possède quatre régulateurs lui assurant une résistance au zinc, cobalt, plomb et à l'arsenic (Gao et al. 2011; Saha et al. 2017; Roy et al. 2018).

**Tableau I-1** : Exemples de régulateurs appartenant à la famille ArsR-SmtB et métaux reconnus.

Principaux régulateurs	Métal (aux) reconnu(s)	Principaux régulateurs	Métal (aux) reconnu(s)
AioF	As	CmtR	Cd, Pb
ArsR	As, Sb, Bi, MAs	SmtB	Zn
CadC	Cd, Pb, Zn	CzrA	Zn, Co
AztR	Cd, Pb, Zn	NmrR	Ni, Co

### 3.2.2.2. Motifs de liaison aux métaux

Les métaux se lient aux protéines au niveau de motifs de liaison caractéristiques. Au sein de ces motifs, les cystéines et les histidines sont des résidus très conservés et essentiels car ce sont eux qui sont impliqués dans la liaison aux métaux. En effet, les métaux présentent une forte affinité pour l'atome de soufre des cystéines ainsi que pour le noyau imidazole des histidines. Les protéines lient deux ions métalliques, soit à l'interface homodimérique (inter) soit au sein de chaque monomère

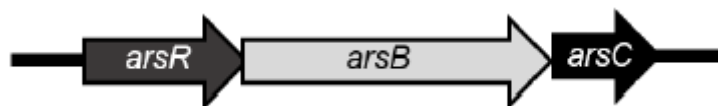
(intra) (Roy et al. 2018). Différents motifs ont été caractérisés et la nomenclature de ces motifs est basée sur la position du motif au sein de la structure secondaire de la protéine. Par exemple, si le motif se situe en hélice  $\alpha 3$  alors les protéines possédant ce motif appartiendront au groupe  $\alpha 3$ . Si le motif contient des résidus en position C-terminale ou N-terminale un C ou un N sont respectivement ajoutés. Ainsi, sept principaux groupes ont été établis par Roy et al. en 2018 :  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ , MX (mixed), NM (non metal) et UK (unknown). Des classes et des sous-classes ont également été créées pour classer les différents motifs existants (Roy et al. 2018). Il apparaît que tous les motifs auraient évolué à partir d'un ancêtre commun afin de pouvoir répondre aux métaux les environnant.

Les membres du groupe  $\alpha 2$  lient typiquement l'arsenic et forment un petit groupe trouvé uniquement chez les bactéries. Le groupe est divisé en deux classes :  $\alpha 2$ - $\alpha 52$  (une cystéine en  $\alpha 2$  et deux en  $\alpha 5$ ) et  $\alpha 2$ - $\alpha 53$  (deux cystéines en  $\alpha 2$  et une en  $\alpha 5$ ). Le groupe  $\alpha 3$  est actuellement celui qui inclut le plus grand nombre de protéines : il regroupe de nombreux régulateurs qui contrôlent dans la majorité des cas la transcription des gènes en reconnaissant l'arsenic. Ce groupe est divisé en 6 classes :  $\alpha 3$ ,  $\alpha 32$ ,  $\alpha 3N$ ,  $\alpha 3N2$ ,  $\alpha 34$  et  $\alpha 35$ . Les membres de ce groupe sont considérés comme les ancêtres de la famille avec une très large variété de motifs qui sont ensuite retrouvés dans d'autres groupes. La protéine ArsR d'*E. coli* appartient à ce groupe et elle comprend un motif CXCX<sub>2</sub>C situé en hélice  $\alpha 3$  dont les trois cystéines (Cys 32, 34 et 37) sont essentielles pour former le motif de fixation (sous classe a). Les membres du groupe  $\alpha 4$  sont typiquement impliqués dans le contrôle de la transcription du gène codant la pompe à efflux et conférant la résistance au cadmium. Ce groupe contient des protéines reconnaissant le cadmium et est divisé en deux classes :  $\alpha 4C$  (2 cystéines en  $\alpha 4$  et une en position C-terminale) et  $\alpha 4C2$  (2 cystéines en  $\alpha 4$  et 2 cystéines en position C-terminale). Un autre groupe majeur est le groupe  $\alpha 5$ , qui est divisé en 8 classes :  $\alpha 5$ ,  $\alpha 5N$ ,  $\alpha 5C$ ,  $\alpha 53$ ,  $\alpha 54$ ,  $\alpha 55$ ,  $\alpha 56$  et  $\alpha 57$ . C'est un grand groupe possédant des protéines répondant principalement au zinc mais également à d'autres métaux du fait du très grand nombre de motifs représentés par le groupe (Saha et al. 2017; Roy et al. 2018).

Les groupes MX, NM et UK sont des groupes qui permettent de classer les membres particuliers de la famille. MX pour « mixed group » comprend des membres possédant deux sites de liaison, un en  $\alpha 3$  et un en  $\alpha 5$ , les deux sites peuvent être essentiels ou un seul peut être suffisant. Ce groupe est divisé en deux classes  $\alpha 3N$ - $\alpha 5$  et  $\alpha 3$ - $\alpha 5$  qui combinent des motifs des groupes  $\alpha 3$  et  $\alpha 5$ . NM pour « non-metal » est un groupe comprenant des membres qui ne reconnaissent pas les métaux, mais régulent l'expression des gènes via une réponse redox. Il comprend deux classes :  $\alpha 2$ - $\alpha 5$  et  $\alpha 33$ . Enfin, le groupe UK pour « unknown » contient des membres qui ne possèdent aucun motif de liaison aux métaux et aucune réponse redox connue. Il contient deux classes : none (aucun motif connu) et none-C (aucun motif mais présence d'une cystéine en  $\alpha 3$ ) (Roy et al. 2018).

### 3.2.2.3. Exemple de la protéine ArsR et l'opéron *ars*

Les protéines ArsR ont des motifs différents leur permettant de reconnaître divers métaux. Dans la majorité des cas, elles reconnaissent l'As(III) (arsénite) mais aussi parfois As(V) (arséniate), Sb(III), Bi(III) et le méthylarsenic c'est-à-dire la plupart des formes de l'arsenic (Saha et al. 2017; Roy et al. 2018). En effet, l'arsenic est un métal non essentiel et toxique pour la cellule sous la plupart de ses formes. Ainsi, les procaryotes ont développé des systèmes de résistance retrouvés dans les plasmides des bactéries Gram- et Gram+ (Kaur and Rosen 1992; Ben Fekih et al. 2018). La première protéine ArsR décrite, provient de l'opéron *ars* découvert chez *Staphylococcus aureus* en 1968 (Novick and Roth 1968) et caractérisé plus tard dans le plasmide R773 d'*E. coli* (San Francisco et al. 1990). Depuis, de nombreux opérons *ars* ont été identifiés chez d'autres microorganismes. Les gènes essentiels assurant la détoxification de l'arsenic sont *arsR*, *arsB* et *arsC* (Figure I-12) mais de nombreux gènes supplémentaires peuvent être retrouvés dans la diversité d'opérons connus (Silver and Phung 2005; Ben Fekih et al. 2018).

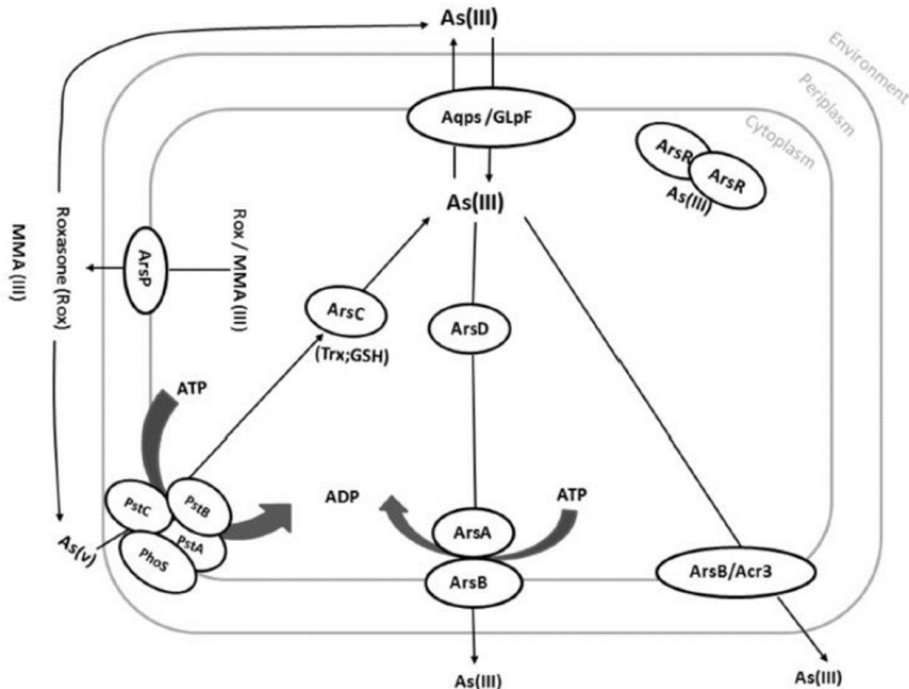


**Figure I-12** : Structure classique de l'opéron *ars* (modifié de Kalia and Joshi 2009).

L'expression de l'opéron *ars* est régulée par ArsR (régulateur de la famille ArsR-SmtB comme présenté précédemment), codé par le gène *arsR*. A l'état basal, cette protéine agit en cis en se fixant sur la région promotrice/opératrice de l'opéron *ars* bloquant ainsi la transcription des gènes *arsB* et *arsC*. En présence d'arsénite, la fixation du métal à ArsR entraîne sa dissociation de la région promotrice/opératrice ce qui permet la transcription de l'opéron. La protéine ArsB est une protéine membranaire intégrale qui assure l'efflux de l'arsénite (Figure I-13) alors que la protéine ArsC est une arséniate réductase qui permet de réduire l'arséniate (As(V)) en arsénite (As(III)) qui peut, sous cette forme, être exporté hors de la cellule grâce à ArsB. Des gènes supplémentaires se sont ajoutés à la structure de base de l'opéron *ars* au cours de l'évolution afin d'optimiser la détoxification de l'As(III) et de l'As(V) mais aussi élargir le spectre d'action de cet opéron aux formes organiques de l'arsenic pouvant être rencontrées dans l'environnement. Ainsi, les gènes *arsA* et *acr3* (Fu et al. 2009) codent respectivement une ATPase et une perméase qui s'associent avec la protéine ArsB afin d'optimiser l'export d'arsénite (As(III)). Cet export est de plus optimisé grâce à une métallochaperone, ArsD, qui fixe l'As(III) et l'apporte aux systèmes d'export (Yang et al. 2010). La protéine ArsI vient élargir le spectre d'action du système en permettant la déméthylation des formes organiques de l'arsenic et consécutivement leur prise en charge par les systèmes d'export. D'autre part, les gènes *arsM*, *arsH* et



*arsP* constituent une autre voie pour la détoxification de l'arsenic en codant respectivement une méthyltransférase, une enzyme organoarsénicale augmentant le spectre d'ArsM et, une pompe à efflux des formes organiques de l'arsenic. D'autres protéines comme *ArsO*, *ArsT* ou encore *ArsN* ont été découvertes et sont probablement impliquées dans la résistance à l'arsenic même si leurs fonctions ne sont pas encore connues (Ben Fekih et al. 2018).



**Figure I-13** : Fonctionnement de l'opéron *ars* chez les procaryotes. As(V) entre dans la cellule via les systèmes d'import du phosphate (PstA, PstB, PstC et PhoS) et est séquentiellement réduit en As(III) par ArsC et exporté de la cellule par les aquaglycéroporines (Aqps/GLpF). Ces dernières peuvent de plus importer le As(III) dans la cellule qui est pris en charge (ArsD) et expulsé de la cellule grâce au système d'efflux ArsB-ArsA qui tire son énergie de l'hydrolyse de l'ATP (ArsA). Le As(III) peut de plus être extrudé via le système d'efflux ArsB-Acr3. ArsR est le régulateur transcritptionnel de l'opéron *ars*: quand la concentration en As(III) augmente, la liaison de l'ion métallique avec l'homodimère ArsR entraîne la dé-répression de l'opéron *ars* et donc son expression. Les formes organiques de l'arsenic (MMA (monométhylarsenic)) peuvent également être éliminées de la cellule grâce à *ArsP* (Wang et al. 2009).

De manière très intéressante, certaines bactéries possèdent plusieurs opérons *ars*. C'est notamment le cas de *Rhodopseudomonas palustris* souche CGA009 qui possède trois opérons *ars* (*ars1*, *ars2* et *ars3*) dont l'expression est induite selon la concentration en arsenic. L'opéron *ars1* est exprimé pour de faibles concentrations en arsenic, tandis que les opérons *ars2* et *ars3* ne sont exprimés que lorsque la concentration en arsénite augmente (avec l'opéron *ars3* permettant la méthylation de l'arsenic). Ce système assure à la bactérie une détoxification de l'arsenic très efficace (Zhao et al. 2015).



### 3.2.3. Le mercure et la famille ArsR-SmtB

Alors que les protéines MerR sont les représentantes majeures de la régulation de l'homéostasie cellulaire du mercure chez les microorganismes, l'implication de régulateurs transcriptionnels appartenant à la famille ArsR-SmtB dans les transformations du mercure a été mise en évidence. Cette régulation n'est cependant pas liée à la méthylation du mercure mais à la réduction du mercure grâce à l'opéron *mer*. Ainsi, ces régulateurs ont historiquement été annotés MerR mais appartiennent bien à la famille ArsR-SmtB. Cette famille de régulateurs a tout d'abord été mise en évidence chez les *Actinobacteria* grâce à des études sur la régulation de l'opéron *mer* chez la souche *Streptomyces lividans* 1326 (Brünker et al. 1996). Chez cette souche, un opéron composé des gènes *merB* et *merA* est transcrit de manière opposée aux gènes *merR*, *merP*, *merT* et *merX*. Grâce au clonage séquentiel de différents fragments de l'opéron couplé à des approches d'induction et de gel retard, les auteurs ont montré qu'en absence de Hg(II), la protéine notée MerR se fixait à la région intercistronique se situant entre l'ATG de MerB et celui de MerR entraînant la répression de l'expression des gènes de l'opéron alors qu'en présence de Hg(II), la protéine notée MerR se détachait de cette région conduisant à l'expression des gènes de l'opéron. Ces résultats démontrent un mode d'action caractéristique des régulateurs transcriptionnels de la famille ArsR-SmtB avec : (i) une fixation entraînant la répression de l'expression des gènes en absence du métal et, (ii) une libération de la région promotrice/opératrice entraînant une dé-répression de l'expression des gènes de l'opéron en présence du métal.

Suite à cette étude, l'implication de régulateurs transcriptionnels appartenant à la famille ArsR-SmtB dans la régulation des mécanismes de transformation du mercure s'est étendue au phylum des *Bacteroidetes* (Allen et al. 2013) mais aussi au domaine des Archées et plus précisément, au phylum des *Creanarchaeota* (Schelert et al. 2004, 2006). En effet, une première étude sur la régulation de l'opéron *mer* (composé des gènes *merRPTA*) chez la flavobactérie marine *Tenacibaculum discolor* 9A5 ont prédit par analyses *in silico* que le régulateur de cet opéron noté MerR pourrait appartenir à la famille ArsR-SmtB et ont observé une forte similarité avec CadC, membre bien décrit de cette famille (Allen et al. 2013). Cette étude a de plus prédit le motif de liaison du métal du régulateur ArsR-SmtB like le classant ainsi dans le groupe  $\alpha 3N$  (voir Partie 3.2.2.2.). Le second groupe d'études a porté sur la régulation de l'opéron *mer* (composé du gène *merR*, *merA* et un gène codant une protéine à fonction inconnue) chez l'archée hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* P2 (Schelert et al. 2004, 2006). Elles ont démontré que l'absence du gène noté *merR* de cet opéron entraînait une expression constitutive du gène *merA* en absence ou en présence de Hg(II). Le régulateur transcriptionnel MerR de *Sulfolobus solfataricus* n'agit donc que de manière négative et inductible sur l'expression du gène *merA*, excluant un mode d'action semblable aux régulateurs de la famille MerR. De plus, des analyses évolutives sur

la protéine MerR de *Sulfolobus solfataricus* le relie fortement à la protéine notée MerR de *Streptomyces lividans* 1326 précédemment identifiée comme appartenant à la famille ArsR-SmtB. Cette dernière analyse suggère que les protéines de la famille ArsR-SmtB codées par les *Crenarchaeota* et les *Actinobacteria* auraient évoluées à partir d'un ancêtre commun (Schelert et al. 2006).

L'acquisition d'un régulateur transcriptionnel est un gain évolutif certain démontré par l'absence de régulateur transcriptionnel dans le phylum des *Aquificales* possédant la protéine ancestrale MerA (Barkay et al. 2010; Boyd and Barkay 2012). Comme décrit précédemment (**Partie 1.2.2.**), l'opéron *mer* actuellement étudié chez les bactéries est un opéron dont l'expression peut être régulée par deux régulateurs transcriptionnels appartenant à la famille MerR appelés MerR et MerD. Des études évolutives de la protéine MerA réalisées sur 272 opérons *mer* ont toutefois démontré qu'il existait 3 régulateurs transcriptionnels pour la régulation de l'opéron *mer* : *merR*, *merD* et *arsR* respectivement retrouvés dans 71.7%, 28.7% et 8.1% des espèces étudiées (Boyd and Barkay 2012). A l'exception de 2 souches (*Bacillus cellulosilyticus* DSM 2522 et *Gordinia bronchialis* DMS 43247) possédant les deux régulateurs *arsR* et *merR*, l'ensemble des 270 autres opérons *mer* analysés ne possède que l'un des deux régulateurs. Ainsi, MerD n'est jamais retrouvé sans MerR, et la présence d'un des deux régulateurs ArsR ou MerR exclut la présence du second. Les régulateurs transcriptionnels de la famille ArsR-SmtB sont ainsi retrouvés chez les *Euryarchaeota* et *Crenarchaeota*, les *Bacteroidetes*, un certain nombre d'*Actinobacteria* et peu de *Firmicutes* et sont complètement exclus des opérons *mer* codés par les *Proteobacteria* (Boyd and Barkay 2012).

Finalement, il apparaît que le gène *arsR* a été remplacé au cours de l'évolution par *merR* chez les *Proteobacteria* et la majorité des *Firmicutes* (Boyd and Barkay 2012). Une étude visant à comparer la composition en acide aminés (essentiels à leur mécanisme) de 11 familles de régulateurs transcriptionnels incluant les familles de régulateurs en réponse aux métaux a montré que la famille MerR était la plus proche de la famille ArsR-SmtB appuyant l'hypothèse que les régulateurs de la famille ArsR-SmtB aient pu évoluer vers la famille MerR dans la régulation du mécanisme de détoxification du mercure (Boyd and Barkay 2012).

Ainsi, alors que les membres de la famille ArsR-SmtB ont majoritairement été décrits comme liant l'arsenic, l'antimoine et le bismuth, ces études sur l'opéron *mer* montrent que certains régulateurs appartenant à la famille ArsR-SmtB sont capables de lier le mercure et d'induire une réponse spécifique.

### 3.3. Systèmes de détection et de résistance en réponse aux métaux

Le mercure, ainsi que d'autres métaux toxiques tels que le cadmium, le cuivre ou l'arsenic sont largement disséminés dans les environnements. Les microorganismes vivant dans ces environnements pollués ont évolué pour faire face aux métaux en développant des mécanismes de détoxification mais aussi de détection permettant d'induire une réponse spécifique en présence du métal. Les mécanismes de détoxification sont caractérisés de mécanismes de résistance aux métaux et sont répertoriés selon deux modes d'action vis à vis d'une population : (i) les mécanismes coopératifs, contribuant à la détoxification du métal pour l'ensemble de la population ou (ii) les mécanismes égoïstes, contribuant à la détoxification du métal seulement pour la cellule les mettant en place (O'Brien 2015). Ces mécanismes de résistance sont les suivants : (i) la diminution de la perméabilité membranaire aux métaux (égoïste, ex : perte des porines OmpC/F chez *Escherichia Coli* (Li et al. 1997)), (ii) la séquestration extracellulaire (coopératif, ex : sidérophore chélatant le cuivre chez *Pseudomonas aeruginosa*, (Teitzel et al. 2006)), (iii) la séquestration intracellulaire (coopératif, ex : accumulation du cuivre dans le périplasme codé par l'opéron *cop* chez *Pseudomonas syringae*, (Cha and Cooksey 1991)), (iv) la réduction ou la volatilisation des métaux (coopératif et égoïste, ex : réduction de l'argent par une pyocyanine chez *P. aeruginosa*, (Muller and Merrett 2014)) et, (v) les systèmes d'efflux (égoïste, ex : pompes à efflux RND du cuivre et zinc chez *Rhodococcus Metallidurans*, (von Rozycki and Nies 2009)).

Alors qu'à l'heure actuelle, le mécanisme de méthylation du mercure ne semble pas conférer la résistance au mercure (Gilmour et al. 2011), il apparaît primordial de déterminer quels sont les mécanismes mis en place par les bactéries méthylantes pour détecter et résister au Hg(II) afin de déterminer si ces derniers sont égoïstes (dissémination du Hg(II)) ou coopératifs (séquestration du Hg(II)).

#### 3.3.1. Des systèmes de détection et de résistance au mercure chez les microorganismes méthylants ?

A l'heure actuelle, le seul mécanisme de résistance au Hg est le système *mer* (voir Partie 1.2.2.). Peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de résistance au Hg chez les microorganismes capables de méthyler le Hg(II) ne possédant pas *mer*. Des études menées sur la bactérie méthylante *G. sulfurreducens* souche PCA ont mis en évidence la capacité de cette souche à réduire le Hg(II) en Hg(0) (Hu et al. 2013; Lin et al. 2014b). Les acteurs moléculaires impliqués dans cette réaction de réduction ont de plus été identifiés ; il s'agit de cytochromes de type c insérés au niveau de la membrane externe codés par les gènes *omcBESTZ* (Lin et al. 2015b). Cependant, bien que ces protéines semblent conférer la capacité à réduire le mercure (mécanisme de détoxification du

Hg(II)), elles ne semblent être ni spécifiques de la réponse au Hg(II) (réduction du Fe(III) aussi) ni retrouvées chez les autres microorganismes capables de méthyler le mercure ((Lin et al. 2014a), étude menée en parallèle sur la souche *P. mercurii* ND132). D'autre part, des études ont visé à déterminer le rôle des protéines HgcAB en étudiant les acteurs moléculaires différentiellement produits par la souche délétée pour les gènes *hgcAB* (Qian et al. 2016, 2018). Ces études de protéomique comparative chez les bactéries méthylantes *Geobacter sulfurreducens* PCA et *Pseudodesulfovibrio mercurii* ND132 ont observé une diminution globale dans l'abondance des protéines localisées dans la membrane externe et le périplasme. De manière intéressante, elles ont démontré que l'absence d'HgcAB impacte l'abondance de systèmes impliqués dans l'homéostasie et la résistance aux métaux et particulièrement des pompes à efflux appartenant à la famille RND (Resistance-Nodulation cell Division). Ces études suggèrent qu'il existe un lien fort entre les protéines HgcAB, et donc la méthylation du mercure et, l'homéostasie cellulaire. De plus, une étude de transcriptomique différentielle menée au laboratoire entre une condition contrôle, sans mercure, et une condition en présence de Hg(II) et de MeHg sur la bactérie méthylante *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1 a mis en évidence à la fois une surexpression en réponse au Hg(II) et une répression en réponse au MeHg de gènes codant des systèmes de détection des métaux, des systèmes de transduction du signal à deux composantes et, des systèmes d'efflux des métaux (Goñi-Urriza et al. Données non publiées).

La partie 3.3.3. s'intéressera à introduire les systèmes mis en place par les bactéries en réponse aux métaux et plus particulièrement, les systèmes de transduction du signal à deux composantes et les systèmes d'efflux afin de pouvoir faire le parallèle entre des mécanismes connus et les mécanismes mis en place en réponse au mercure.

### 3.3.2. Système de transduction du signal à deux composantes

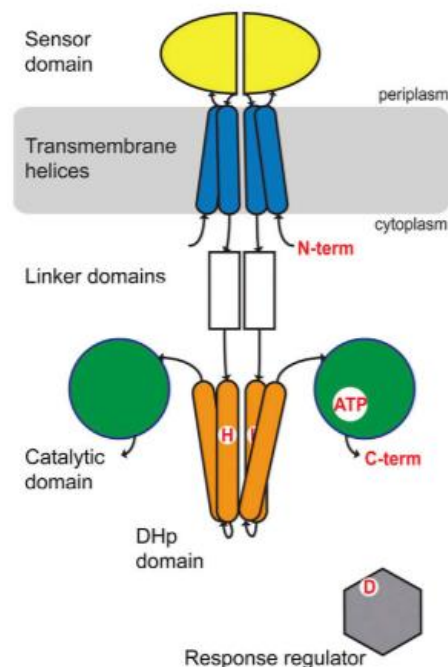
#### 3.3.2.1. Rôle des systèmes de transduction du signal à deux composantes

Les systèmes de transduction du signal à deux composantes (2CSS) jouent un rôle majeur pour l'adaptation de la bactérie à son environnement. Ils permettent de détecter les variations de paramètres extérieurs à la cellule, de transmettre le signal du périplasme vers le cytoplasme puis, d'induire la ou les réponses appropriées. Les 2CSS constituent la forme majeure de transduction du signal chez les bactéries; plus de 100 systèmes différents ont été identifiés (Stock et al. 1999). Ces systèmes contrôlent des processus biologiques très divers tels que la motilité, le métabolisme ou l'homéostasie des toxines mais sont aussi impliqués dans la virulence des bactéries pathogènes (Nixon et al. 1986; Stout and Gottesman 1990; Baranova and Nikaido 2002; Navazo et al. 2009). Une bactérie peut posséder plusieurs systèmes à deux composantes : c'est le cas d'*E. coli* qui possède environ 30 systèmes de ce type (Yamamoto et al. 2005).

### 3.3.2.2. Mécanisme et domaines conservés des systèmes de transduction du signal à deux composantes

Les systèmes de transduction du signal à deux composantes impliquent deux protéines *a minima* : (i) une protéine possédant une activité histidine kinase insérée au niveau de la membrane interne et (ii) un régulateur transcriptionnel localisé dans le cytoplasme ((*Parkinson and Kofoed 1992*) **Figure I-14**).

Les protéines histidine kinase (HK) s'associent en homodimère (**Figure I-14**). Une protéine HK est composée d'un domaine périplasmique senseur impliqué dans la détection du signal, de deux domaines transmembranaires pour son insertion dans la membrane, d'un domaine connecteur cytoplasmique reliant le domaine transmembranaire au domaine histidine kinase, et finalement d'un domaine cytoplasmique en C terminal qui possède l'activité histidine kinase et phosphatase (*Gao and Stock 2009; Bhate et al. 2015*). Ce dernier domaine est impliqué dans la phosphorylation de l'histidine, le phosphotransfert au régulateur transcriptionnel et la dimérisation de l'histidine kinase. Il est suivi par un domaine catalytique permettant la liaison avec l'ATP nécessaire à la réaction d'autophosphorylation de l'histidine kinase (**Figure I-14**). Le régulateur transcriptionnel est composé d'un domaine de fixation à l'ADN et d'un domaine central ATPase (AAA+) indispensable pour la formation du complexe polymérase (*Gao and Stock 2009*).



**Figure I-14** : Domaines caractéristiques d'une histidine kinase et d'un régulateur transcriptionnel appartenant à un système de transduction du signal à deux composantes. Domaines conservés : domaine périplasmique senseur (jaune), domaines transmembranaires (bleu), domaine linker (blanc), domaines DHp impliqués dans la dimérisation et l'autophosphorylation (orange) et domaines catalytiques fixant l'ATP (vert). Le régulateur transcriptionnel est représenté en gris. Les acides aminés essentiels à l'activité des protéines sont annotés (H et D) (*Bhate et al. 2015*).

La détection du signal dans le périplasma par le domaine senseur de l'histidine kinase va déclencher l'autophosphorylation du domaine histidine kinase (au niveau d'une histidine (H)) localisé dans le cytoplasme. L'activité phosphatase de ce domaine va ensuite transférer le phosphate sur l'acide aspartique (D) d'un régulateur transcriptionnel libre dans le cytoplasme. Ainsi phosphorylé et actif, le régulateur transcriptionnel va se fixer sur la région promotrice de gènes pour moduler leur expression (*Jung et al. 2012*).

### 3.3.2.3. Exemple de la famille Cpx : le système Zra

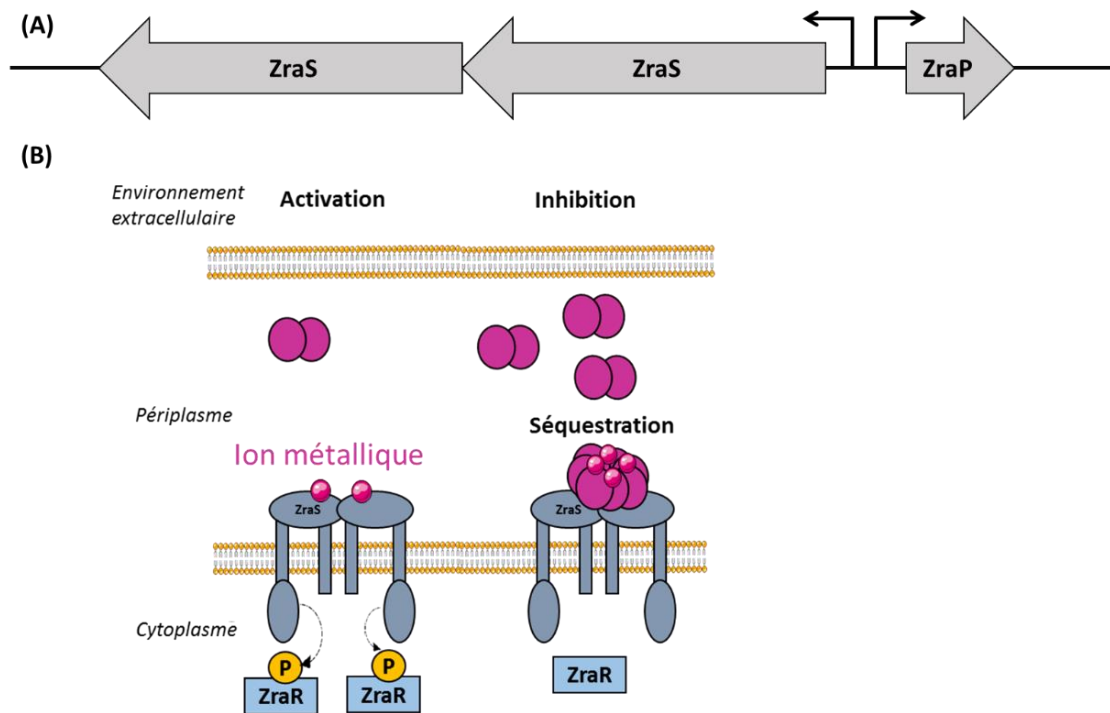
Le système Zra est un système de transduction du signal à deux composantes de la famille Cpx faisant intervenir la protéine ZraS (histidine kinase) et la protéine ZraR (régulateur transcriptionnel) (**Figure I-15A**). Comparé aux systèmes à deux composantes classiques, il possède la particularité de faire intervenir une troisième protéine, la protéine ZraP. ZraP est une petite protéine accessoire (12kDa) localisée dans le périplasma et codée dans le brin opposé au système ZraRS (**Figure I-15A**). Même si ce système répond spécifiquement au zinc (*Appia-Ayme et al. 2012; Petit-Härtlein et al. 2015*), il n'est actuellement pas connu comme impliqué dans la régulation de son homéostasie (*van der Weel et al. 2019*). Le système Zra fonctionne selon deux états :

En présence de faibles concentrations de zinc, un ion zinc vient se fixer sur le site de liaison des métaux du domaine senseur périplasmique de la protéine ZraS qui transduit par une cascade de phosphorylation le signal à la protéine ZraR (*Taher and de Rosny 2021*) **Figure I-15B**). Une autorégulation positive du système Zra se fait alors par la fixation de la protéine ZraR active sur la région promotrice contenant les promoteurs de *zraRS* et celui de *zraP* (**Figure I-15A**). Cette fixation est spécifique et fait intervenir la séquence palindromique suivante (*Leonhartsberger et al. 2001*) : AACGAGTAAAAATGACN<sub>16</sub>GCGAGTCATTTTACTCATT. Dans ces conditions, la protéine ZraP est sous forme de dimères et son induction grâce à l'activité de la protéine ZraR conduit à l'augmentation de sa quantité dans le périplasma.

Lorsque la concentration de zinc augmente, la protéine ZraP fixe le zinc en excès conduisant à sa complexation sous forme d'octamères. Ce changement de structure entraîne une inhibition du système ZraRS par interaction directe entre l'octamère ZraP et le domaine senseur des protéines ZraS (*Petit-Härtlein et al. 2015; Rome et al. 2018; Taher and de Rosny 2021*) mais aussi il entraîne une séquestration du zinc dans le périplasma qui ne peut plus atteindre le cytoplasme de la cellule. L'accumulation de ZraP entraîne une tolérance accrue au zinc chez *E. coli*. Cette protéine est même la protéine capable de lier le plus le zinc dans la cellule (*Sevcenco et al. 2011*).

L'association du zinc avec les ZraP se fait à l'interface entre chaque dimère conduisant à la stabilisation de la structure octamérique. Ainsi un total de 4 ions métalliques est fixé par complexe

(Petit-Härtlein et al. 2015). Structurellement, il a été montré que la partie N terminale de la protéine ZraP, et en particulier l’histidine 1, est impliquée dans la coordination du zinc alors que les 7 derniers résidus de la partie C terminale de la protéine sont impliqués dans la tétramérisation des dimères (Petit-Härtlein et al. 2015). Enfin, la seule cystéine de la protéine permet la formation d’un pont disulfure entre les complexes dimériques.



**Figure I-15** : Système de transduction du signal à deux composantes Zra. **(A)** Organisation génomique du système Zra d’*E. coli* souche K12. **(B)** Mécanisme du système Zra en réponse à de faibles (activation) et de fortes concentrations en zinc (inhibition). D’après Taher et al 2021.

La structure cristallographique de ZraP révèle de plus qu’elle possède 2 hélices  $\alpha$  antiparallèles et est semblable à celle des protéines Spy et CpxP (protéines de la même famille) à la seule différence que la partie C terminale de ZraP est désordonnée (chez Spy et CpxP la partie C terminale est sous forme hélice  $\alpha$ ). De plus, Spy et CpxP ont un rôle de chaperonne ; elles peuvent s’associer en dimère formant un « berceau » pour lier les protéines cibles mal repliées, tout comme ZraP qui s’associe par contre en multimère sous forme d’une boucle aplatie avec une cavité centrale.

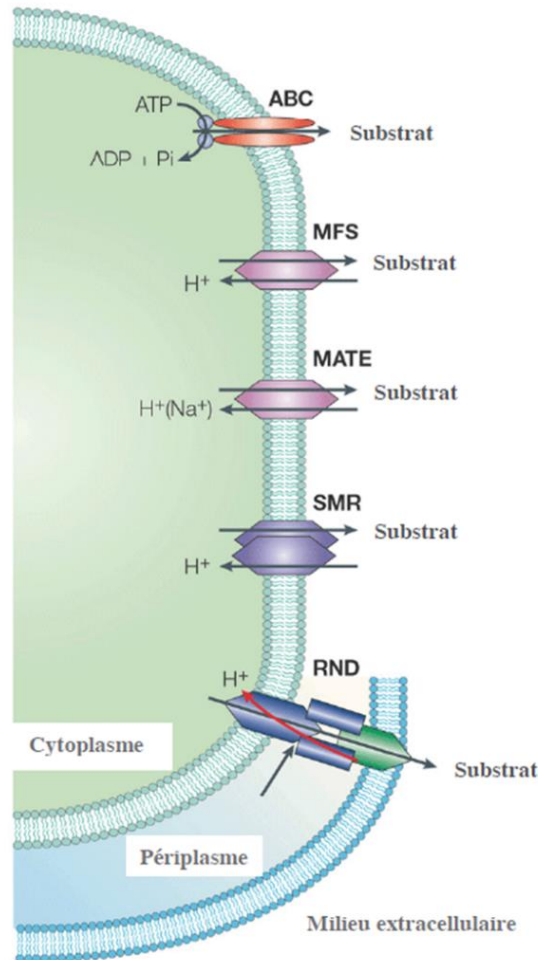
### 3.3.3. Systèmes d'efflux

#### 3.3.3.1. Rôle et classification des systèmes d'efflux

L'efflux est un système permettant aux organismes d'expulser un composé localisé dans le périplasme ou le cytoplasme de la cellule vers le milieu extérieur. Ces systèmes confèrent ainsi la résistance à une grande variété de composés toxiques tels que les antibiotiques, les composés pharmaceutiques ou encore les métaux mais permettent également l'export de peptides et autres molécules synthétisés par les cellules. Ainsi, ils assurent le maintien de l'homéostasie cellulaire (Helling *et al.* 2002), la virulence des bactéries pathogènes (Taylor *et al.* 2012) mais aussi la communication cellulaire (quorum sensing - (Minagawa *et al.* 2012)) pouvant conduire à la formation de biofilm pour la protection contre des toxines (Matsumura *et al.* 2011; Soto 2013). Ces systèmes possèdent une spécificité de substrat ou au contraire sont des systèmes de résistance à spectre large (*multidrug resistance*). De plus, un même organisme peut exprimer une multitude de systèmes d'efflux lui conférant une réponse spécifique à chaque composé rencontré.

L'efflux est un mécanisme actif réalisé par l'association de protéines membranaires. Il existe 5 grandes familles de systèmes d'efflux ((Poole 2007) **Figure I-16**) : les RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*), les ABC (*ATP binding cassette*), les MSF (*Major Facilitator Superfamily*), les SMR (*Small multidrug resistance*) et les MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*). Ces familles se distinguent par leur organisation ou encore la source d'énergie leur permettant de fonctionner. Certains transporteurs utilisent comme source d'énergie l'hydrolyse de l'ATP ; c'est le cas de la famille ABC. D'autres sont des antiports exportant leurs substrats contre un gradient de protons leur servant de force motrice (familles MFS, RND et SMR (Sun *et al.* 2014)) ou d'ions sodium (famille MATE, (Kuroda and Tsuchiya 2009; Ogawa *et al.* 2015)).





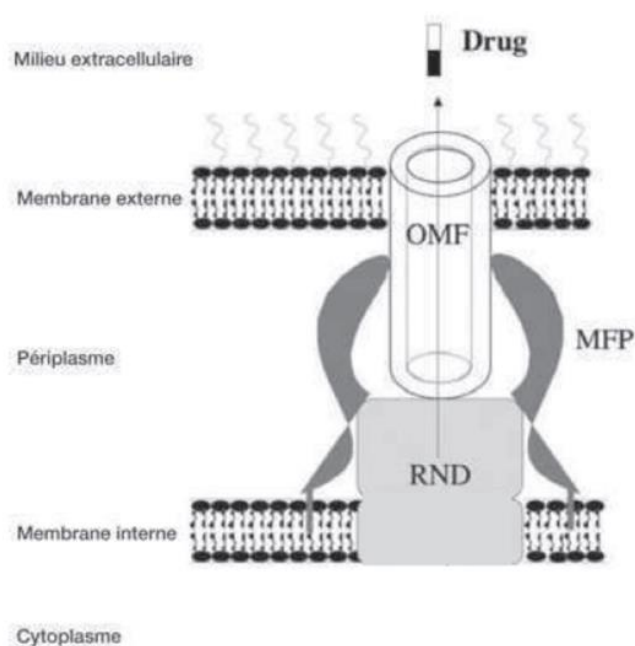
**Figure I-16** : Classification des systèmes d'efflux bactériens. Les systèmes d'efflux sont classés en 5 familles ABC : ATP-Binding Cassette, MFS : Major Facilitator Superfamily, MATE : Multidrug and Toxic compound Extrusion, SMR : Small Multidrug Resistance et, RND : Resistance-Nodulation-cell Division. Les systèmes RND ne sont retrouvés que chez les bactéries à gram négatif ; ainsi ils sont tripartites pour transporter le substrat au travers de la membrane interne, le périplasma et la membrane externe (Kruwlich et al. 2005).

### 3.3.3.2. Mécanisme et domaines conservés des pompes à efflux de la famille RND

Les pompes à efflux de la famille RND sont spécifiques aux bactéries Gram négatives. Elles assurent la majorité des exports d'antibiotiques chez ces bactéries et possèdent une très large spécificité de substrats. Elles sont dites tripartites puisque formées par l'assemblage de trois protéines (**Figure I-17** (Nikaido 2011)) : une protéine insérée au niveau de la membrane interne (RND), une protéine insérée au niveau de la membrane externe (OMF ; outer membrane factor) et une protéine de fusion périplasmique associant les deux parties membranaires (MFP ; membrane fusion protein). L'export de composés à l'extérieur de la cellule par ces systèmes se fait en échange de l'entrée de protons dans le cytoplasme, mouvement par lequel le système tire son énergie. L'expression des gènes de ces systèmes est inductible par le composé à exporter (Franke et al. 2001; Gudipaty et al. 2012).

Classiquement les gènes codant ces systèmes tripartites sont organisés en opéron bien que l'OMF peut être retrouvé seul. L'association de trois complexes protéiques (tripartite) rend plus efficace le mécanisme de détoxification en comparaison avec les systèmes d'efflux insérés seuls au niveau de la membrane interne qui expulse les composés dans le périplasma qui peuvent ensuite rediffuser facilement vers le cytoplasme.

Les systèmes RND tripartites les plus connues sont MexAB-OprM impliqués dans la résistance multiple aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* ou encore le système AcrAB-TolC impliqué dans la résistance multiple aux antibiotiques mais aussi des métaux chez *Escherichia coli*.



**Figure I-17 :** Système d'efflux tripartite (RND) d'une bactérie à Gram négatif. RND : Resistance-Nodulation-cell Division ; MFP : Membrane Fusion Protein ; OMF : Outer Membrane Factor (Pagès et al. 2011).

MexB et AcrB sont les protéines ancrées dans la membrane interne (RND) du système d'efflux. Ces protéines sont structurellement organisées en 12 domaines transmembranaires et 2 boucles périplasmiques (Tamura et al. 2005). La partie périplasmique de la protéine est essentielle puisqu'elle assure la reconnaissance et forment la « poche » de liaison des substrats qui lui sont apportés. Cette « poche » possède divers sites de liaison aux substrats ce qui entraîne la poly spécificité des systèmes d'efflux RND mais aussi une compétition entre les substrats pris en charge par le système (Nikaido and Takatsuka 2009; Pagès and Amaral 2009; Nikaido 2011). Dans le cas du système AcrAB-TolC, une étude a démontré qu'une quatrième protéine, AcrZ, peut venir s'associer avec la protéine AcrB entraînant

un changement allostérique de cette dernière et lui conférant ainsi une spécificité de substrat. D'autre part, des résidus conservés, retrouvés au niveau des domaines transmembranaires 4, 10 et 11 de la protéine AcrB, sont essentiels pour la translocation des protons constituant l'énergie du système (*Su et al. 2006; Nikaido and Takatsuka 2009*). Les études cristallographiques sur AcrB (*Murakami et al. 2006*) et MexB (*Sennhauser et al. 2009*) montrent un assemblage en homotrimères avec une cavité centrale. Les protéines RND sont à la fois reliées au périplasme par des cavités latérales et à l'OMF par un entonnoir central.

Les protéines OprM et TolC insérées dans la membrane externe s'organisent en homotrimère tout comme MexB et AcrB. L'export final du composé se fait à travers une structure en tonneau constituée de feuillets  $\beta$  formant la partie transmembranaire de TolC. Le reste de la protéine est constitué de 12 hélices  $\alpha$  par monomère formant la partie périplasmique capable d'une dynamique de fermeture et d'ouverture pour laisser passer les substrats (*Pagès et al. 2011*).

Enfin, une étude récente sur la protéine de fusion localisée dans le périplasme (MFP) a montré que 6 monomères de AcrA (*Xu et al. 2011*) s'associeraient pour former une structure hexamérique en anneau (aussi observée pour la protéine CusB dans le système CusABC (*Long et al. 2012*) et MexA pour le système MexAB-OprM (*Higgins et al. 2004*)). Cette structure entoure et relie les deux homotrimères TolC et AcrB pour former un complexe final de 771 kDa. Il a été montré que la protéine périplasmique était ancrée à la membrane interne par palmitoylation d'un résidu cystéinyle N-terminal (*Pagès et al. 2011*).

### 3.3.4. Couplage systèmes de transduction du signal à deux composantes et systèmes d'efflux : exemple du système *cus*

Le système *cus* (pour Cu-sensing) retrouvé chez la bactérie Gram négative *Escherichia coli* est constitué de deux locus de gènes chacun codant respectivement pour un système de transduction du signal à deux composantes, CusRS, et un système d'efflux, CusCFBA (**Figure I-18A**). Le locus de gènes *cusRS* code pour une histidine kinase, CusS, et un régulateur transcriptionnel, CusR. Dans des conditions d'aérobiose en présence de concentration intracellulaire de cuivre supérieure à 50  $\mu\text{M}$  ou dans des conditions d'anaérobiose, le Cu(I) va venir se fixer sur le domaine senseur de la protéine histidine kinase CusS induisant son autophosphorylation et consécutivement l'activation de CusR (**Figure I-18B**). CusR se fixe alors sur l'ADN au niveau d'une séquence répétée inversée AAAATGACAAN<sub>2</sub>TTGCATTTT (retrouvée uniquement entre les opérons divergents *cusRS* et *cusCFBA*, (Zahid *et al.* 2012)). CusR induit ainsi l'expression des gènes codant le système à double composante CusRS (autorégulation) et le système d'efflux CusCFBA qui permet l'export du Cu(I) ou du Cu(II) depuis le périplasme vers le milieu extracellulaire. CusCBA présente une homologie de structure avec le système d'efflux tripartite des antibiotiques/métaux AcrAB-TolC (Zgurskaya *et al.* 2011) :

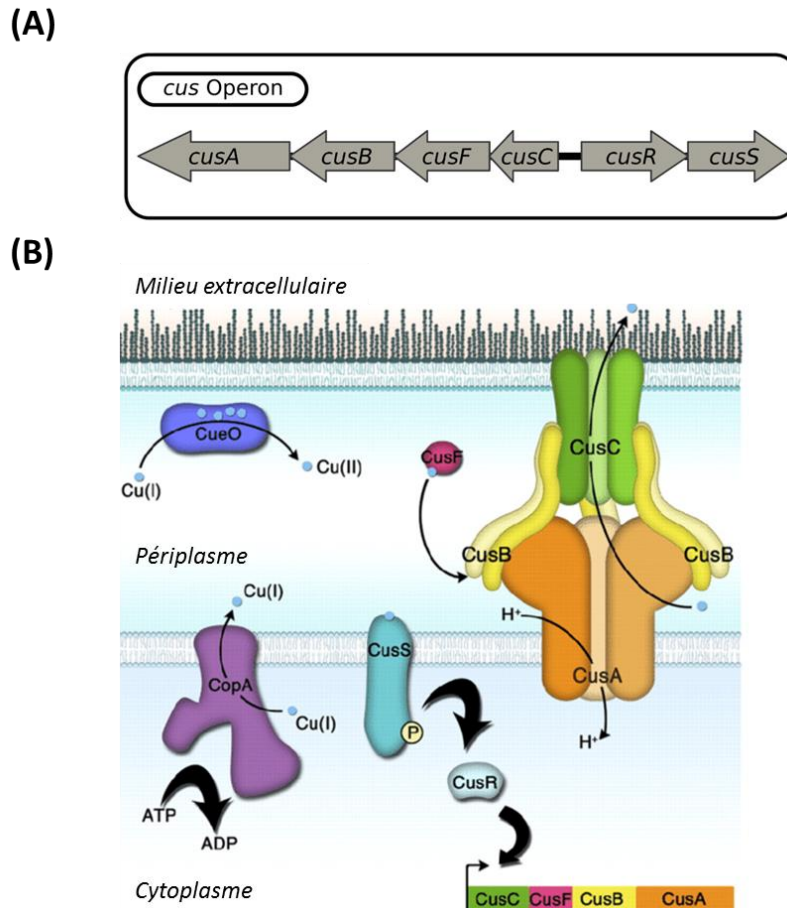
- CusA est la protéine de la membrane interne appartenant à la superfamille des RND. Les méthionines 573, 623 et 672 localisées dans les boucles périplasmiques de la protéine CusA ainsi que l'alanine 399 sont essentielles pour le bon fonctionnement de cette protéine (Franke *et al.* 2003).

- CusB est la protéine de fusion membranaire (MFP). Les résidus méthionines 21, 36 et 38 forment le site de fixation du métal. En présence de cuivre, un changement allostérique de cette protéine entraîne l'ouverture du canal du complexe CusCBA (Kim *et al.* 2011).

- CusC est la protéine de la membrane externe (OMF) prouvée comme étant essentielle dans la résistance au cuivre (Rensing and Grass 2003).

De manière intéressante, l'opéron *cusCBA* codant le système d'efflux tripartite possède la particularité d'être supplémenté par le gène *cusF* codant une petite protéine accessoire de 10 kDa localisée dans le périplasme appelée CusF (**Figure I-18A**). Identifiée chez *E. coli*, cette protéine capte les ions Cu(I) ou Cu(II) périplasmique provenant respectivement de l'extrusion cytoplasmique réalisée par le système d'efflux de la membrane interne CopA ou, de l'oxydation du Cu(I) par la protéine périplasmique CueO (**Figure I-18B**). CusF est une métallochaperonne à cuivre ou à argent capable d'apporter le métal à expulser jusqu'au complexe CusCBA. La protéine CusF ne possède qu'un seul site de liaison aux métaux cependant, des études ont montré qu'en plus de son rôle d'assistance dans l'efflux des métaux, elle est capable de former des multimères afin de séquestrer le cuivre dans l'espace périplasmique et jouer un rôle de protection de la cellule (Chacon *et al.* 2014). Le site de

fixation du métal au sein de la protéine CusF est formé par trois acides aminés essentiels : 2 résidus méthionines aux positions 47 et 49 et 1 résidu histidine en position 36 (Kittleson *et al.* 2006; Bagai *et al.* 2008).



**Figure I-18** : Système *cus*. (A) Organisation génomique de l'opéron *cus* codant à la fois un système de transduction du signal à deux composantes (*cusRS*) et un système d'efflux de la famille RND (*cusCFBA*). (B) Fonctionnement du système *cus* (Richard *et al.* 2019).

## 4. Objectifs de la thèse

Actuellement, la compréhension des mécanismes mis en place par les bactéries capables de méthyler le mercure est limitée. L'ensemble des études suggèrent que le mécanisme de méthylation du mercure peut être influencé par différents facteurs : des facteurs environnementaux tels que la présence de ligands forts du Hg (les sulfures et les thiols) qui vont déterminer la spéciation et influencer la biodisponibilité du Hg, mais aussi des déterminismes génétiques, notamment impliqués dans la régulation de l'expression des gènes et la résistance au mercure.

Ainsi, l'objectif global de ma thèse est d'identifier les déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au mercure et dans sa méthylation chez la bactérie sulfato réductrice *Pseudodesulfovibrio hydrogyri* souche BerOc1. Dans ce but et dans le but de comprendre de manière plus globale comment la souche BerOc1 est impactée par le mercure et comment elle l'assimile et le méthyle, les premiers objectifs spécifiques de mes travaux de thèse ont été :

- (i) La mise au point d'un protocole de génération de souche mutante de délétion, première étape pour étudier les déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au mercure.
- (ii) La mise en place de conditions de croissance comparables et optimales pour étudier le mécanisme de méthylation du mercure.
- (iii) L'évaluation de l'impact des thiols et des sulfures dans la méthylation du mercure.

Suite à cela, les deux autres objectifs spécifiques de ma thèse ont concerné l'étude de déterminismes génétiques suspectés comme étant impliqués dans la réponse au Hg en réalisant :

- (iv) L'étude d'un régulateur transcriptionnel prédit comme appartenant à la famille ArsR-SmtB associé aux gènes *hgcAB* et, son rôle dans la méthylation du mercure.
- (v) L'étude d'un locus de gènes portant deux systèmes de résistance au mercure.

De manière générale, ces travaux de thèse ont permis de progresser dans la compréhension de la méthylation de Hg chez les bactéries sulfato réductrices en mettant en évidence différents déterminismes génétiques impliqués dans la régulation, la détection, et la séquestration et l'efflux du mercure.



## CHAPITRE II - Procédures expérimentales





## 1. Souches bactériennes et conditions de culture

### 1.1. Souches bactériennes

#### 1.1.1. La bactérie méthylyante *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1

Isolée de l'étang de Berre, situé dans le Sud Est de la France (30 km à l'Ouest de Marseille) où les concentrations en polluants (hydrocarbures, plomb, cadmium, mercure) dans les sédiments sont élevées (Accornero et al. 2008), la bactérie *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1 (anciennement : *Desulfovibrio hydrargyri* ou *Desulfovibrio dechloracetivorans*) est une bactérie sulfato réductrice (BSR) Gram négative de morphologie *vibrio* mesurant environ 1.5 µm de long et vivant en milieu anoxique strict (Ranchou-Peyruse et al. 2018). Retenue pour sa capacité à méthyler le mercure, elle possède aussi la capacité à déméthyliser le méthylmercure (Bridou et al. 2011; Isaure et al. 2020). Son génome, d'une taille d'environ 4 millions de paires de bases (pb), a été séquencé en 2010 et assemblé en 2011 sous forme de 5 contigs (N° Accession NCBI Nucléotide : NZ\_LKAQ01000001 à NZ\_LKAQ01000005) permettant actuellement de mener des études sur la méthylation du mercure à l'échelle moléculaire (Goñi-Urriza et al. 2015; Goñi Urriza et al. 2017; Goñi-Urriza et al. 2020; Isaure et al. 2020).

#### 1.1.2. La bactérie non méthylyante *Desulfovibrio alaskensis* G20

La bactérie *Desulfovibrio alaskensis* souche G20 (autrefois, *Desulfovibrio desulfuricans* et parfois notée souche G200) est une BSR dérivée de la bactérie *Desulfovibrio desulfuricans* souche G100A isolée à partir d'un puits de pétrole en activité en Californie dans le comté de Ventura (Weimer et al. 1988). La souche G20 a été choisie pour l'étude de la méthylation du mercure puisqu'elle présente plusieurs avantages : (i) son génome a été séquencé en 2011 (Hauser et al. 2011) et il est relativement proche de celui de la souche BerOc1 (67.77 % (ANI Calculator ; EZBioCloud)), (ii) les outils génétiques ont été développés (Li et al. 2009) et (iii) elle ne possède pas la capacité à méthyler le mercure tout en pouvant le déméthyliser (Pedrero et al. 2012; Isaure et al. 2020). Ces critères permettent d'entreprendre des études comparatives entre la souche méthylyante BerOc1 et la souche non méthylyante G20 pour mieux comprendre le mécanisme de méthylation du mercure au niveau moléculaire. Notamment dans ce travail, la souche G20 a été utilisée afin de réaliser des expériences d'expression hétérologue des gènes de la méthylation du mercure et déterminer consécutivement si ces gènes lui conféraient la capacité à méthyler le mercure.

#### 1.1.3. *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* souche TOP10 (génotype : F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1* *nupG*  $\lambda$ ) a été

utilisée en tant qu'outil pour la construction de vecteurs recombinants nécessaires pour la génération de souches de G20 complémentées ou de souches mutantes de BerOc1 délétées.

## 1.2. Conditions de culture

### 1.2.1. Milieux de culture

Pour l'ensemble des expériences, la BSR *P. hydrargyri* souche BerOc1, qui croit naturellement en eau saumâtre, a été cultivée à 37°C et pH 7 en condition anoxique (dégazage du milieu liquide et atmosphère azote (N<sub>2</sub>)) dans la base minérale Multipurpose Medium (Widdel and Bak 1992) avec 10 g/L de NaCl ainsi noté MM<sub>10</sub>. La composition détaillée de cette base minérale est listée dans le **Tableau II-1**. La base minérale MM<sub>10</sub> contient une solution de Sélénite-Tungstate (0.5 g NaOH, 2 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> et 4 mg Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O pour un litre d'eau MilliQ) et une solution d'oligoéléments notée SL12B (Overmann et al. 2004) dont la composition est détaillée dans le **Tableau II-2**. Dans des expériences pour lesquelles la quantité de soufre a voulu être limitée, une solution SL12B modifiée notée SL12B\* ne contenant plus de soufre grâce au remplacement du FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O par du FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O a été utilisée (**Tableau II-2** (\*)). De plus, du potassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à 0.2 g/L et une solution de vitamines notée V7 (Trüper and Pfennig 1992) à 1 mL/L ont été ajoutés à la base minérale MM<sub>10</sub> après autoclave pour éviter leurs dégradations par ce procédé. La composition de la solution de vitamines V7 est détaillée dans le **Tableau II-3**.

**Tableau II-1** : Composition de la base minérale MM<sub>10</sub> (Multipurpose Medium) pour un litre d'eau MilliQ. La base minérale contient une solution d'oligoéléments notée SL12B dont la composition est développée dans le Tableau II-2 et une solution de Sélénite-Tungstate notée ST. Les cultures des bactéries sulfato réductrices *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1 et *Desulfovibrio alaskensis* souche G20 ont été réalisées dans cette base minérale à l'exception près que le NaCl n'est pas ajouté pour les cultures de la souche G20.

<u>Dans 1 litre d'eau MilliQ, pH 7</u>	Concentration molaire finale (en mM)	Masse molaire (en g.mol <sup>-1</sup> )	Masse (en g) ou *Volume (en mL)
NaCl (sodium chloride)	170	58,44	10
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (magnesium chloride hexahydrate)	5,9	203,30	1,2
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (calcium chloride dihydrate)	0,68	147,01	0,1
NH <sub>4</sub> Cl (ammonium chloride)	4,7	53,49	0,25
KCl (potassium chloride)	6,7	74,55	0,5
Oligoéléments (solution SL12B)			1*
Sélénite-tungstate (solution ST)			1*
HEPES	10	260	2,60

**Tableau II-2** : Composition de la solution de SL12B. Les quantités listées (en mg) sont pour réaliser un litre de solution. (\*) Une solution de SL12B modifiée notée SL12B\* a été préparée pour limiter la quantité de soufre dans les cultures; pour cela le  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a été remplacé par du  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en proportion identique.

<u>Dans 1 litre d'eau MilliQ</u>	Concentration molaire finale (en mM)	Masse molaire (en $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	Masse (en mg)
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (acide borique)	4,85	61,83	300
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (*) (Iron(II) sulfate heptahydrate)	3,96	278,01	1100
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cobalt(II) chloride hexahydrate)	0,80	237,93	190
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (manganese chloride dihydrate)	0,31	161,87	50
$\text{ZnCl}_2$ (zinc chlorure)	0,31	136,29	42
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (nickel(II) chloride hexahydrate)	0,10	237,69	24
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sodium molybdate(vi) dihydrate)	0,07	241,95	18
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (copper(ii) chloride dihydrate)	0,01	170,48	2

**Tableau II-3** : Composition de la solution de vitamines V7. La solution contient 7 vitamines différentes (B1, B3, B5, B5, B8, B10 et B12). Elle est ajoutée aux milieux de culture après autoclave.

<u>Dans 1 litre d'eau MilliQ</u>	Concentration molaire finale (en $\mu\text{M}$ )	Masse molaire (en $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	Masse (en mg)
<b>Biotine</b> (vitamine B8)	8,19	244,31	2
<b>para-Aminobenzoate</b> (vitamine B10)	72,92	137,14	10
<b>Thiamine</b> (vitamine B1)	37,68	265,36	10
<b>Pantothénate</b> (vitamine B5)	22,81	219,23	5
<b>Pyridoxamine</b> (vitamine B6)	297,28	168,19	50
<b>Cobalamine</b> (vitamine B12)	14,76	1 355,37	20
<b>Nicotinate</b> (vitamine B3)	162,46	123,11	20

Des couples donneur-accepteur d'électrons ont été rajoutés à la base minérale MM<sub>10</sub> afin de favoriser certains métabolismes bactériens. Ces substrats métaboliques ont été préparés dans de l'eau MilliQ dégazée (bullage azote (N<sub>2</sub>)) à 0.5 M ou 1 M. Différents couples donneur-accepteur d'électrons ainsi que leurs concentrations ont été testés afin de comparer la physiologie de la souche BerOc1 (**détaillés Chapitre III**) cependant, la majorité des expériences s'est déroulée soit en respiration sulfate grâce au couple pyruvate-sulfate (40 mM chacun) soit, en respiration fumarate avec le couple pyruvate-fumarate (40 mM chacun). Dans cette dernière condition métabolique, il a été essentiel de rajouter une source de soufre afin que la croissance de la souche puisse avoir lieu. Comme pour les couples donneur-accepteur d'électrons, plusieurs sources de soufre tout comme leurs concentrations ont été testées pour leur capacité à favoriser la croissance de la souche BerOc1 (**détaillées Chapitre III**) mais seulement deux sources de soufre ont été retenues pour réaliser la suite des expériences: les sulfures ou la cystéine à 0.1 mM chacun.

Concernant le processus de génération de mutants chez la souche BerOc1, un milieu MM<sub>10</sub> favorisant une respiration fumarate et supplémenté avec 0.5 mM de sulfate et 1 g/L d'extrait de levure (Yeast Extract (YE)) a été sélectionné suite à différents tests (**détaillés Chapitre III**) ; ce milieu a été noté MM<sub>10</sub>PFYE. Lorsque les conditions le demandaient, il a été complémenté avec 100 à 800 µg/mL de spectinomycine (préparée à 50 mg/mL dans de l'eau MilliQ stérilisée, Sigma-Aldrich®), l'antibiotique utilisé comme pression de sélection lors des expériences de génération de souches mutantes délétées chez la souche BerOc1. De l'agar (European bacteriological Agar, Condalab®) à 1.5% a été ajouté pour réaliser un milieu solide utilisé dans l'étape de criblage du processus de génération de souches mutantes. L'étalement des cultures sur boîtes de Pétri s'est fait en surface sur un milieu riche (MM<sub>10</sub>PFYE) complémenté avec 0.5 mL/L de citrate de titane (III) (5 mL d'une solution de chlorure de titane (III) à 15% dans 50 mL d'une solution de citrate de sodium à 0.2 M le tout neutralisé avec une solution de carbonate sodium saturée). Finalement, afin d'éviter les contaminations fongiques se développant davantage dans les milieux contenant de l'extrait de levure, les cultures et les boîtes de pétris réalisées avec ce milieu ont été supplémentées avec 25 µg/mL de Natamycine (préparée à 5 mg/mL dans de l'eau MilliQ stérilisée, Sigma-Aldrich®).

Ainsi, les conditions de croissance de la souche BerOc1 majoritairement utilisées ont été notées : (i) MM<sub>10</sub>PS, (ii) MM<sub>10</sub>PFSulf, (iii) MM<sub>10</sub>PFCys et (iv) MM<sub>10</sub>PFYE et font respectivement référence aux conditions de croissance en (i) respiration sulfate (couple pyruvate-sulfate), (ii) respiration fumarate (couple pyruvate-fumarate) supplémentée avec 0.1 mM de sulfures, (iii) respiration fumarate (couple pyruvate-fumarate) supplémentée avec 0.1 mM de cystéine et (iv) respiration fumarate (couple pyruvate-fumarate) supplémentée avec 1 g/L d'extrait de levure.

La souche G20 est une BSR qui croit naturellement en eau douce. Ainsi les conditions de croissance en laboratoire ont été exactement les mêmes que pour la souche BerOc1 (base minérale MM) en éliminant le sel (NaCl) de la composition de cette base minérale. Cette base minérale a donc été notée MM<sub>0</sub>. Cette souche est capable de croître en respiration sulfate (pyruvate-sulfate). En revanche, sa croissance en respiration fumarate (pyruvate-fumarate) n'est pas optimale. De ce fait, afin de comparer les souches BerOc1 et G20, la même base minérale (MM) et le même métabolisme à savoir la respiration sulfate ont été utilisés pour éviter les variations dues à des processus métaboliques et physio chimiques différents au cours de nos expériences.

Concernant la génération de souches modifiées chez la souche G20 (expression hétérologue), le milieu de croissance utilisé a été le milieu Postgate C dont la composition est listée dans le **Tableau II-4**. Un milieu solide Postgate E a été utilisé pour le criblage des bactéries transformées (**Tableau II-4**). Lorsque les conditions le nécessitaient, la kanamycine (préparée à 50 mg/mL dans de l'eau MilliQ stérilisée, Sigma-Aldrich®) a été ajoutée dans les milieux liquides ou solides à une concentration finale de 150 µg/mL.

**Tableau II-4** : Compositions des milieux Postgate C et Postgate E. Ces milieux ont été utilisés pour le protocole de transformation de la bactérie *Desulfovibrio alaskensis* souche G20.

Milieu Postgate C				Milieu Postgate E			
Dans 1 litre d'eau MilliQ, pH 7.3	Concentration molaire finale (en mM)	Masse molaire (en g.mol <sup>-1</sup> )	Masse (en g) ou *Volume (en mL)	Dans 1 litre d'eau MilliQ, pH 7.5	Concentration molaire finale (en mM)	Masse molaire (en g.mol <sup>-1</sup> )	Masse (en g) ou *Volume (en mL)
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (magnesium sulfate heptahydrate)	8,1	246,47	2,0	MgCl <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O (magnesium chloride heptahydrate)	8,3	221,32	1,83
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (calcium chloride dihydrate)	0,4	147,01	0,06	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (calcium chloride dihydrate)	4,6	147,01	0,67
NH <sub>4</sub> Cl (ammonium chloride)	18,7	53,49	1,0	NH <sub>4</sub> Cl (ammonium chloride)	18,7	53,49	1,0
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>7</sub> 2 H <sub>2</sub> O (trisodium sulfate dihydrate)	1,2	294,10	0,35	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (potassium phosphate monobasic)	3,7	136,09	0,5
Extrait de levure			1,0	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (iron(II) sulfate heptahydrate)	1,8	278,01	0,5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (sodium sulfate)	31,7	142,04	4,5	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> (ascorbate)	0,6	176,12	0,1
NaC <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (sodium lactate 60%)	29,96	112,06	5,6*	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S (thioglycolate)	1,1	92,12	0,1
				Extrait de levure			1,0
				Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (sodium sulfate)	7,0	142,04	1
				NaC <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (sodium lactate 60%)	26,8	112,06	5*
				Agar			15

*E. coli* TOP10 a été cultivée à 37°C sous agitation (250 rpm) dans un milieu Luria-Bertani broth lennox (LB, Condalab®) en milieu liquide ou dans le milieu LB agar lennox (Condalab®) en milieu solide. Lorsque les conditions le demandaient, 100 µg/mL de spectinomycine ou 150 µg/mL de kanamycine ont été ajoutés dans le milieu de croissance.

### 1.2.2. Condition d'inoculation des souches

Afin d'adapter les souches à leurs milieux, *a minima* deux repiquages dans le milieu désiré ont été faits avant de procéder aux expériences. Les souches ont été inoculées de 0.03 à 0.05 DO (« DO » définie Partie 2.1.) soit dans une chambre anoxique dans des tubes de 12 mL de type Bellco consécutivement scellés soit, à la paillasse dans des tubes de 16.5 mL de type Hungate remplis au maximum de leur capacité (bouchon vissé). Ces deux conditions d'inoculation ont été réalisées dans le but de limiter au maximum la présence d'oxygène dans les cultures. Chaque condition testée a été effectuée en triplicat.

### 1.2.3. Cultures en présence de mercure

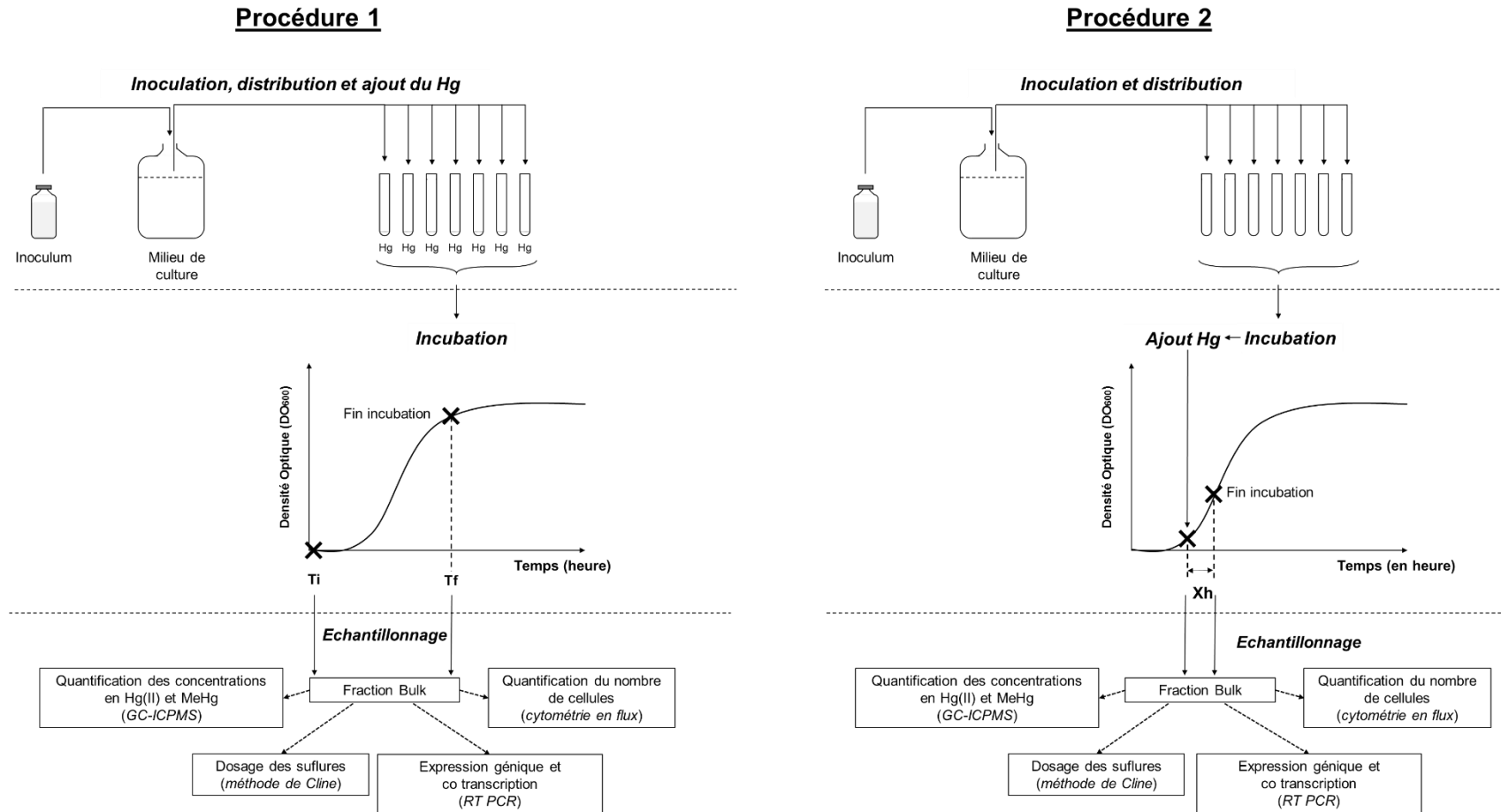
Les cultures réalisées en présence de mercure ont été exposées soit au Hg(II) (solution mère à 9.14 mM de HgCl<sub>2</sub> dans 1% HCl) soit au MeHg (solution mère à 13.22 mM dans un mélange 1:3 méthanol:acide acétique). L'ensemble des expériences présentées dans ce manuscrit sont listées dans le **Tableau II-5**. L'ajout du mercure s'est fait selon deux procédures expérimentales (**Figure II-1**): la première (Procédure 1) a consisté à ajouter le mercure immédiatement après l'inoculation de la souche (Ti) alors que, selon la seconde (Procédure 2), l'ajout de mercure a été réalisé en phase exponentielle de croissance de la souche (après un doublement de DO). Les expériences menées selon la procédure 1 ont été des expositions longues au mercure (échantillonnage en fin de phase exponentielle de croissance, Tf) comparées aux expériences suivies selon la procédure 2 pour lesquelles le temps d'exposition au mercure était court (quelques minutes à quelques heures). En fin d'expérience, divers échantillonnages de la culture (Fraction Bulk) ont permis de : quantifier les espèces mercurielles, les sulfures, le nombre de cellules ou encore le niveau d'expression des gènes et leur co transcription (**Figure II-1**).

Pour aller plus loin dans l'interprétation de certains phénotypes, les cultures ont été lavées et fractionnées. Selon la question, trois procédures de fractionnement ont été réalisées (**Figure II-2**). Le fractionnement 1 a visé à distinguer la partition des espèces du mercure (Hg(II) et MeHg) entre la fraction cellulaire (fraction culot) et la fraction extracellulaire (fraction surnageant) selon les conditions de croissance. Le fractionnement 2 a eu pour but de questionner la partition du mercure entre la fraction intracellulaire et la fraction adsorbée aux cellules. Pour cela, des chélateurs forts du mercure, l'EDTA (100 mM), l'oxalate (100 mM), le glutathion (GSH, 10 mM) et l'ascorbate (3 mM), ont été utilisés pour laver les parois des cellules et ainsi ne récupérer que la fraction intracellulaire par filtration à 0.2 µm. Finalement, le dernier fractionnement (3) a eu pour but de laver rapidement les cellules afin d'éliminer l'essentiel du mercure et des sels du milieu de culture tout en gardant une morphologie cellulaire intacte pour finalement imager le mercure à l'échelle d'une cellule.

**Tableau II-5** : Conditions expérimentales réalisées pour l'intégralité des expériences en présence de Hg.  $\Delta$  : délétion du gène. pK7 : plasmide portant le locus de gènes *arsRhgcAhgcB*. Les procédures expérimentales 1 et 2 ainsi que les procédures de fractionnement 1, 2 et 3 sont détaillées dans les Figures II-1 et II-2 respectivement.

ID	Expérience	Souche	Milieu de culture	Volume culture (contenant)	Procédure expérimentale	Espèce du mercure ajoutée (concentrations)	Temps d'exposition au Hg	Type d'échantillonnage	Procédure fractionnement
1	Effet des sulfures	BerOc1 sauvage	MM <sub>10</sub> PS, MM <sub>10</sub> PFSulf, MM <sub>10</sub> PFCys	16.5 mL (tube hungate)	Procédure 1	Hg(II) (0.05, 2 et 5 $\mu$ M)	25h (MM <sub>10</sub> PS), 70h (MM <sub>10</sub> PFSulf), 60h (MM <sub>10</sub> PFCys)	Quantif Hg, Dosage sulfure, Nombre de cellules	Fractionnement 1
2	Caractérisation mutants délétion	BerOc1 sauvage BerOc1 $\Delta$ <i>hgcB</i> BerOc1 $\Delta$ <i>arsR</i>	MM <sub>10</sub> PFYE	16.5 mL (tube hungate)	Procédure 1	Hg(II) (0.05 et 0.5 $\mu$ M)	40 heures	Quantif Hg	-
3	Test de résistance au Hg	BerOc1 sauvage BerOc1 $\Delta$ <i>arsR</i> BerOc1 $\Delta$ 470-467	MM <sub>10</sub> PFCys*	9 mL (tube Bellco)	Procédure 1	Hg(II) (0.005, 0.05, 0.5, 2, 5, 25 et 50 $\mu$ M) MeHg (0.000047, 0.00047, 0.0047, 0.047, 0.47 et 4.7 $\mu$ M)	45 heures	Quantif Hg, Dosage sulfure, Nombre de cellules	-
4	Induction du gène <i>arsR</i> et co transcription <i>arsRhgcAhgcB</i>	BerOc1 sauvage	MM <sub>10</sub> PFCys*	9 mL (tube Bellco)	Procédure 2	Hg(II) (0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 2, 5 et 25 $\mu$ M)	8 minutes, 37 minutes, 94 minutes	Expression génique	-
5	Induction du gène <i>hgcA</i>	BerOc1 $\Delta$ <i>arsR</i>	MM <sub>10</sub> PFCys*	9 mL (tube Bellco)	Procédure 1	Hg(II) (0.5 $\mu$ M)	20 heures	Expression génique	-
6	Expression hétérologue locus <i>arsRhgcAhgcB</i>	BerOc1 sauvage G20 sauvage G20 + pk7	MM <sub>10</sub> PS MM <sub>6</sub> PS	16.5 mL (tube hungate)	Procédure 1	Hg(II) (0.05, 0.5 et 2 $\mu$ M)	24 heures	Quantif Hg	-
7	Co transcription locus <i>arsRhgcAhgcB</i> et 470-467	BerOc1 sauvage	MM <sub>10</sub> PFCys*	9 mL (tube Bellco)	Procédure 2	Hg(II) (0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 2, 5 et 25 $\mu$ M)	8 minutes, 37 minutes et 94 minutes	Co transcription	-
8	Mercure intracellulaire	BerOc1 sauvage BerOc1 $\Delta$ 470-467	MM <sub>10</sub> PFCys*	16.5 mL (tube hungate)	Procédure 2	Hg(II) (0.0005, 0.05, 0.5, 2, 5, 25 $\mu$ M)	4 heures	Quantif Hg	Fractionnement 2
9	Imagerie du Hg	BerOc1 sauvage BerOc1 $\Delta$ 470-467	MM <sub>10</sub> PFCys*	16.5 mL (tube hungate)	Procédure 2	Hg(II) (2 $\mu$ M)	4 heures	-	Fractionnement 3





**Figure II-1** : Représentation schématique des procédures utilisées lors des expériences impliquant un ajout de mercure. Ti : consécutivement à l'inoculation de la souche. Tf : fin de phase exponentielle de croissance.

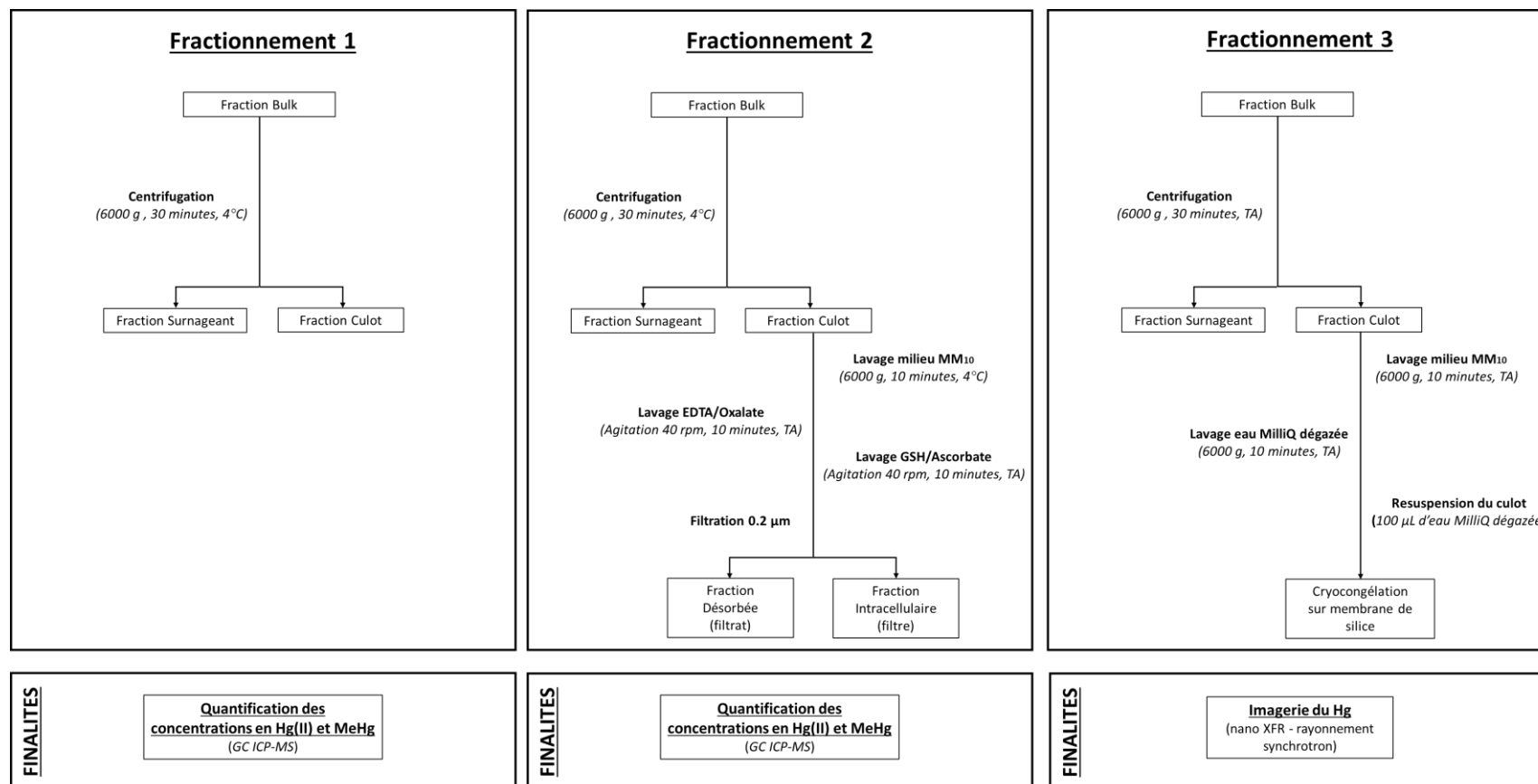


Figure II-2 : Représentation schématique des protocoles suivis pour fractionner les cultures. TA : Température ambiante.

## 2. Caractérisation physiologique des souches

Les cultures ont régulièrement été observées par microscopie optique (Microscope Leica en immersion dans de l'huile sous filtre DF (clair/sombre)) afin de vérifier l'absence de contamination ainsi que la morphologie et l'état de la culture (cellules en division, motilité).

### 2.1. Production de biomasse

La biomasse cellulaire a été mesurée par densité optique (DO) à 600 nm grâce à un spectrophotomètre (Spectronic CamSpec Ltd M107) en mode absorbance. Les suivis de croissance des cultures (DO au cours du temps) ont permis d'observer les différentes phases de croissance (latence, exponentielle et plateau) qui, dans le cas des croissances en respiration fumarate ont affichées 2 phases de croissance : une rapide (phase 1) et une lente (phase 2) (**détaillées Chapitre III**). Ainsi, grâce à la mesure par DO, nous avons pu calculer la production de biomasse ( $\Delta DO$ ) selon les conditions de croissance ainsi que les taux de croissance ( $\mu$ ) et les temps de doublement (TD) selon les phases de croissance comme suit :

$$\Delta DO = DO_{(fin\ de\ phase\ exponentielle)} - DO_{(début\ phase\ exponentielle)}$$

$$\mu\ (en\ heure^{-1}) = \frac{\ln(DO_{(fin\ phase\ X)}) - \ln(DO_{(début\ phase\ X)})}{\Delta t}$$

$$TD\ (en\ heure) = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Avec phase X, phase 1 ou phase 2 de la phase de croissance et  $\Delta t$ , le temps écoulé entre le début et la fin de la phase.

### 2.2. Quantification du nombre de cellules par cytométrie en flux

Des aliquotes de 1.6 mL ou 0.8 mL de cultures ont été prélevés puis placés dans des cryotubes contenant 5% final de formaldéhyde filtré (v/v) (Formaldéhyde 37%, Sigma Aldrich). Après homogénéisation et 15 minutes de stabilisation à température ambiante, les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'au comptage des cellules. L'association formaldéhyde-congélation à -80°C permet de conserver la morphologie originelle des cellules.

La densité optique est le reflet de la biomasse cellulaire. Dans le but de pouvoir reporter les quantités de mercure mesurées par nombre de cellules et non pas par biomasse, le nombre de cellules a été déterminé par cytométrie en flux. Les analyses ont été faites sur un cytomètre BD Accuri C6

(TBMCore) qui dispose de 2 lasers (bleu (488nm) et rouge (640nm)), 2 détecteurs de diffusion de lumière (FSC and SSC) et 4 détecteurs de fluorescence laser. Cette technique permet d'analyser des particules en suspension (dont des cellules) en les détectant selon leur taille, leur forme, leur granulométrie et leur fluorescence. Pour cela, les particules sont injectées une à une et analysées selon les signaux qu'elles émettent après excitation laser. Deux détecteurs sont nécessaires : le premier (FSC, Forward Scatter) détecte la lumière diffusée dans l'axe du laser et renseigne sur la taille des particules et, le second (SSC, Side Scatter) détecte la lumière diffusée à un angle de 90° par rapport à l'axe du laser informant sur la forme et la granularité des particules. La cytométrie en flux permet de détecter la fluorescence naturelle de certaines cellules (autofluorescence) mais, dans la plupart des cas, les populations cellulaires doivent être marquées à l'aide d'une sonde fluorescente comme réalisé durant nos expériences. Ainsi, la séparation des particules selon l'ensemble de ces paramètres permet de séparer avec précision les cellules des particules issues du milieu de culture évitant les biais de comptage.

La mesure du nombre de cellules a été faite par cytométrie en flux et grâce au logiciel associé soit à la plateforme de cytométrie de Bordeaux (France) soit au laboratoire de l'IPREM à Pau. Le bruit de fond dû aux particules du milieu de culture (déterminé par rapport à leur taille et leur fluorescence) a été soustrait du comptage lors de tests préliminaires sur chaque milieu de culture. Dans le but d'obtenir un comptage fiable, des conditions analytiques pour l'injection ont été fixées à un comptage entre 600 et 800 évènements/secondes. Les échantillons ont été marqués avec du SYBR® 10X (Invitrogen) pendant 15 minutes dans l'obscurité, et immédiatement comptés par cytométrie. Dans chaque échantillon, 10% (v/v) de billes Trucounts (BD) ont été ajoutés en tant qu'étalon interne. Ces billes, plus grosses que les cellules et avec un marquage fluorescent spécifique, permettent de contrôler le volume injecté pendant l'analyse. L'ensemble des résultats de cytométrie obtenus a permis d'obtenir une corrélation linéaire ( $R^2 = 0.72$ ,  $n = 361$ ) entre le nombre de cellules (y) et la DO (x) comme suivant :  $y = 1.0739E+09x$ .

### 3. Génération de souches modifiées

#### 3.1. Vecteurs utilisés

pNot19 est un vecteur de 2694 pb dérivé du vecteur pUC19. pNot19 possède (i) une origine de réplication pBR322 mutée lui permettant de se répliquer chez la bactérie *E. coli* en un grand nombre de copies (500 à 700 copies par cellule), (ii) une cassette de résistance à l'ampicilline et, (iii) un site de clonage multiple (SCM) en amont du gène *lacZ*. Il fait partie du groupe d'incompatibilité A. Le gène *cat* codant la résistance au chloramphénicol/thiamphénicol a été inséré au niveau du SCM par l'équipe MEB-Microbiologie Environnementale et Biotechnologies du MIO à l'université Aix-Marseille. Le vecteur ainsi construit fait 4059 pb et est noté pNot19 $\Delta$ PCM. Ne possédant qu'une origine de réplication chez *E. coli*, il a été utilisé pour obtenir une construction finale par POE PCR permettant un échange d'allèle chez la souche *P. hydrargyri* BerOc1 (**définie Partie 3.2.**).

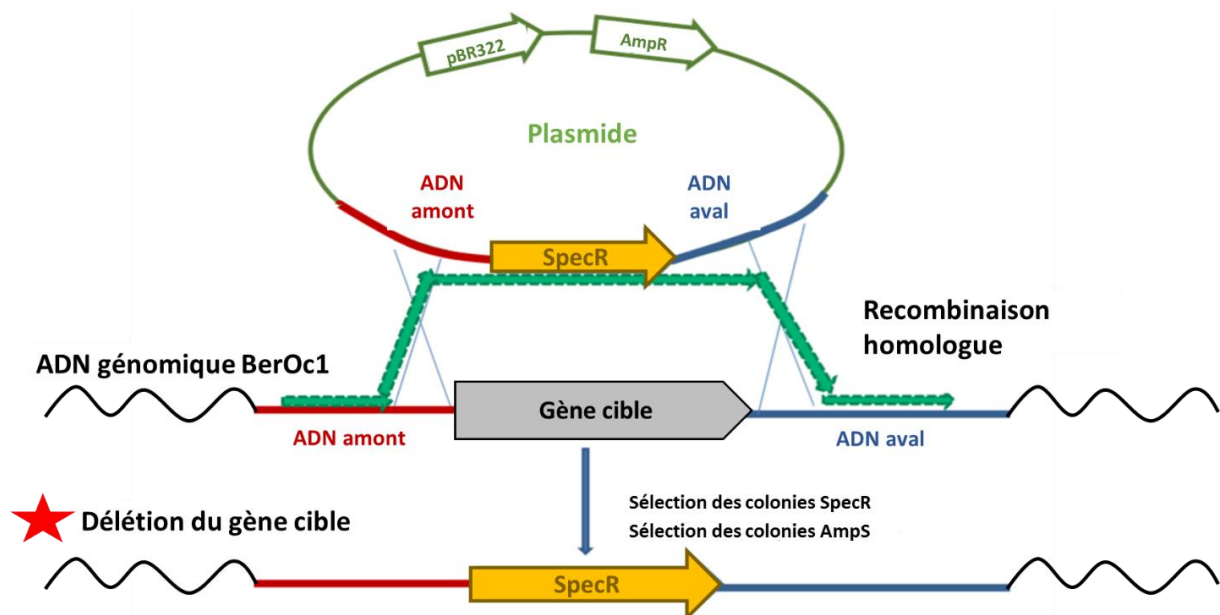
pBMK7 est un vecteur de 7430 pb possédant (i) une origine de réplication pMB1 lui permettant de se répliquer chez la bactérie *E. coli* en un nombre intermédiaire de copies (15 à 20 copies par cellule), (ii) une origine de réplication pBG1 lui permettant de se répliquer chez les bactéries du genre *Desulfovibrio* en un nombre intermédiaire de copies (15 à 20 copies par cellule), (iii) une cassette de résistance à la kanamycine (gène *npt*), une origine de transfert (*oriT*) et (iv) un site de clonage multiple (SCM) en amont du gène *lacZ* (Rousset et al. 1998). Il fait partie du groupe d'incompatibilité Q. Ce vecteur a été utilisé pour l'expression hétérologue du cluster de gènes *arsRhgcAhgcB* chez la bactérie *D. alaskensis* G20 (**définie Partie 3.3.**).

pBMC7 est un vecteur de 7210 pb identique au vecteur pBMK7 excepté qu'il possède une cassette de résistance au chloramphénicol/thiamphénicol (gène *cat*) à la place de la cassette de résistance à la kanamycine (Rousset et al. 1998). Il fait partie du groupe d'incompatibilité Q. Le gène *aadA* codant la résistance à la spectinomycine a été inséré au niveau du SCM par l'équipe MEB-Microbiologie Environnementale et Biotechnologies du MIO à l'université Aix-Marseille. Le vecteur ainsi construit fait 8336 pb et a été utilisé pour récupérer la cassette de résistance à la spectinomycine et la cloner au sein du plasmide pNot19 $\Delta$ PCM à la place de la cassette de résistance au chloramphénicol/thiamphénicol.

## 3.2. Génération de mutants de délétion chez la bactérie méthylante *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1

### 3.2.1. Principe de génération de mutant de délétion

Dans le but d'étudier les acteurs moléculaires liés à la méthylation du mercure, nous avons choisi de générer des mutants de délétion chez la bactérie méthylante *P. hydrargyri* souche BerOc1. Pour cela, une stratégie d'échange d'allèle par double recombinaison homologue a été sélectionnée. Elle consiste à remplacer un fragment d'ADN cible par un gène codant une résistance à un antibiotique qui servira de pression de sélection pour cribler les cellules délétées du fragment d'ADN cible. Cette méthode fait intervenir un plasmide portant le gène codant la résistance à un antibiotique flanqué par deux régions de l'ADN génomique de la souche BerOc1 qui correspondent aux régions en amont et en aval du fragment d'ADN cible (**Figure II-3**). Ainsi, lors de l'introduction du plasmide dans la souche, un mécanisme de double recombinaison homologue peut se produire entre les régions amont et aval du gène cible conduisant au remplacement de ce gène par le gène codant la résistance à l'antibiotique. Le génome de la souche est ainsi délété du gène cible qui se retrouve alors sur le plasmide. Il est donc nécessaire que le plasmide soit un plasmide ne possédant pas la capacité à se maintenir dans la cellule (non répliquatif chez BerOc1) pour que le criblage par l'antibiotique sélectionne les cellules recombinantes. La double recombinaison (et donc, perte du fragment d'ADN cible) est vérifiée par sensibilité à un deuxième antibiotique dont le gène de résistance est porté dans le plasmide.



**Figure II-3** : Représentation schématique de la stratégie de délétion des gènes utilisée pour générer des souches mutantes chez la souche BerOc1. pBR322: origine de réplication. AmpR: cassette de résistance ampicilline. AmpS: ampicilline sensible. SpecR: cassette de résistance spectinomycine/spectinomycine résistant. Modifié à partir de Wall et al. 2014 -présentation-.

### 3.2.2. Construction du vecteur

Le plasmide pNot19ΔPCM a été choisi pour générer des souches délétées pour les gènes cibles. Ce plasmide ne peut pas se répliquer chez *P. hydrargyri* BerOc1 et possède deux cassettes de résistance, la résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol (**voir Partie 3.1**). Des tests préliminaires ont mis en évidence que la sélection par le chloramphénicol chez *P. hydrargyri* BerOc1 ne fonctionnait pas correctement contrairement à la sélection par la spectinomycine. La première étape a ainsi été de remplacer, le gène codant la résistance au chloramphénicol contenu dans le plasmide pNot19ΔPCM par un gène codant la résistance à la spectinomycine (Sp) provenant du plasmide pBMC7 (**voir Partie 3.1**). Suite à cela, un clonage par POE PCR (Prolonged Overlap Extension PCR (*You et al. 2012*)) a été effectué afin d'insérer les régions amont et aval du fragment d'ADN cible de part et d'autre du gène codant la résistance à la spectinomycine. La méthode de POE PCR permet de faire une construction génétique avec des fragments d'ADN (obtenus par PCR) qui possèdent des extrémités 3' et 5' chevauchantes (**Figure II-4**). Lors de la POE, les régions terminales vont s'hybrider et la molécule constituée de plusieurs fragments de PCR concaténés sera amplifiée par PCR. Ainsi, 4 fragments d'ADN doivent être amplifiés par PCR avec des amorces portant des extrémités chevauchantes (**Tableau II-6**): les régions amont (up) et aval (down) du fragment cible à déléter, le fragment possédant la résistance à la spectinomycine et le vecteur (backbone, bb). L'essai de construction en une seule étape a été infructueux. Ainsi plusieurs étapes ont été nécessaires : d'abord une POE-PCR a dû être faite pour insérer le fragment en amont au sein du vecteur constitué du gène de la spectinomycine et du vecteur (Amplification ADN amont et Linéarisation plasmide amont, **Tableau II-6**) puis, l'ajout du fragment aval a été réalisé sur cette construction par une deuxième POE-PCR (Amplification ADN aval et Linéarisation plasmide aval, **Tableau II-6**).

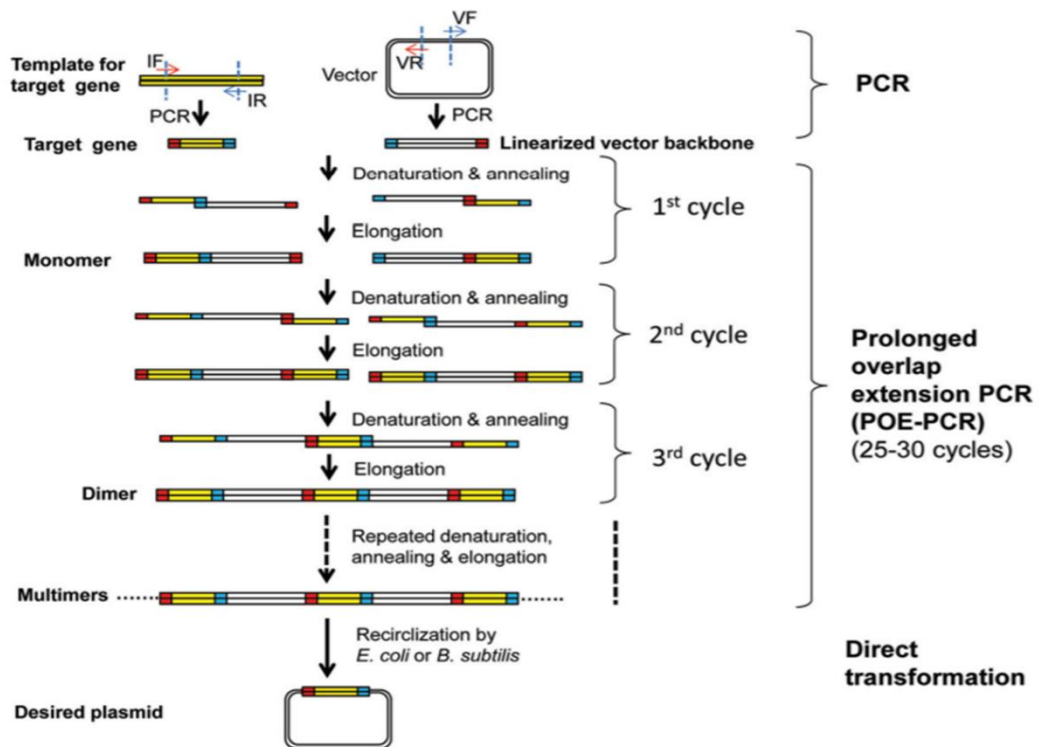
Les amplifications de chaque fragment nécessaire à la construction ont été réalisées par PCR dans un mélange réactionnel de 25 µL final composé de 0.02 Unités/µL d'ADN polymérase Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (M0530S -New England Biolabs®), 0.2 mM de dNTP (VWR), 0.5 µM de chaque amorce, une quantité spécifique d'ADN matriciel (ADN génomique BerOc1 ou ADN plasmique pNot19ΔPCM) détaillée dans le **tableau II-6** et du tampon GC à 1X final (New England Biolabs®). Les réactions de PCR ont été réalisées selon les étapes suivantes : (i) une étape d'activation de l'enzyme à 98°C pendant 30 secondes, (ii) 30 cycles d'amplification chacun composé d'une étape de dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 10 secondes, d'une étape d'hybridation des amorces pendant 30 secondes à une température spécifique à chaque couple d'amorce (**Tableau II-6**) et d'une étape d'élongation à 72°C durant 20 secondes/kb à amplifier selon les recommandations du fournisseur de l'ADN polymérase Phusion™ (**Tableau II-6**) et, (iii) une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Les PCR ont été réalisées dans le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 – AppliedBiosystems.

Les produits de PCR (amplicons) ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose non dénaturante. Les gels contenaient 1% (masse/volume) d'agarose dissous dans du tampon TBE 1X (Acide borique 90 mM, Tris-bas 90 mM, EDTA 2.5 M pH 8.3) et 1 µg/mL de bromure d'éthidium (BET) pour marquer les acides nucléiques. La migration a été réalisée sous une tension de 130 Volts pendant 20 minutes puis les amplicons ont été visualisés sous lumière UV. La purification des amplicons a été effectuée sur gel grâce au kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Illustra™). Après purification, un clonage par POE-PCR permettant l'assemblage amplicons-plasmide a été réalisé. La réussite du clonage est fortement dépendante du ratio fragment – fragment utilisé pour la POE-PCR. Ainsi, la concentration des plasmides et des fragments d'ADN d'intérêt a été mesurée à l'aide des kits Qubit™ dsDNA Assay, high sensitivity (HS, de 2 à 100 ng d'ADN) et broad range (BR, de 2–1000 ng d'ADN) (Invitrogen™) et, du fluoromètre Qubit (Invitrogen™).

Les réactions de POE PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µL composé de 0.04 Unités/µL d'ADN polymérase Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (M0530S -New England Biolabs®), 0.2 mM de dNTP (VWR), un ratio équimolaire insert/plasmide et du tampon GC à 1X final (New England Biolabs®). Aucune amorce n'a été rajoutée au cours de cette réaction. Les réactions de POE-PCR ont été réalisées selon les étapes suivantes : (i) une étape d'activation de l'enzyme à 98°C pendant 30 secondes, (ii) 30 cycles d'amplification chacun composé d'une étape de dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 10 secondes, d'une étape d'hybridation des extrémités chevauchantes à 60°C pendant 10 secondes et d'une étape d'élongation à 72°C durant 26 secondes/kb à amplifier c'est-à-dire environ 1.3 fois le temps recommandé par le fournisseur de l'ADN polymérase Phusion™ (**Tableau II-6**) et, (iii) une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Les PCR ont été réalisées dans le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 – AppliedBiosystems. L'assemblage amplicons-plasmide obtenu par POE-PCR sera circularisé lorsqu'il sera transformé chez une souche d'*Escherichia coli* électro compétente (TOP10 (Invitrogen™)), puisque le plasmide est répliatif dans cette souche. Les cellules transformées ont été sélectionnées sur milieu LB solide complété avec 100 µg/mL de spectinomycine. Les clones obtenus ont été mis en culture dans du milieu LB liquide supplémenté avec 100 µg/mL de spectinomycine. Une fois une biomasse suffisante atteinte, entre 2 et 5 mL de culture ont été échantillonnés et centrifugés 15 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Les culots cellulaires ainsi récupérés ont été conservés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN plasmidique. Les plasmides ont été extraits à l'aide du kit QIAprep Spin MiniPrep (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur, resuspendus dans 50 µL d'eau MilliQ traitée avec du pyrocarbonate de diéthyle (DEPC) et autoclavée, quantifiés (comme précédemment détaillé, kit Qubit™) et séquencés avant d'être ensuite utilisés pour la transformation de la souche BerOc1. Les gènes cibles délétés de la souche BerOc1 durant ma thèse



ont été les gènes *hgcB*, *arsR* et le locus de gènes 470-467. Les concentrations des plasmides obtenus pour chacune des constructions sont répertoriées dans le **Tableau II-6**.



**Figure II-4** : Principe de la POE-PCR. La première étape consiste à amplifier par **PCR** tous les fragments d'ADN (ADN amont du gène cible, ADN aval du gène cible et plasmide) nécessaires à la construction finale grâce à des amorces possédant des extrémités chevauchantes. La seconde étape est une PCR sans amorce avec l'ensemble des fragments d'ADN précédemment amplifiés (**POE-PCR**). Elle permet de réunir tous les fragments d'ADN en un seul et unique fragment (multimers). Il sera circularisé après transformation dans une souche d'*E. coli* qui permet sa réplication (You et al. 2012).

**Tableau II-6 :** Amorces utilisées pour la construction des plasmides utilisés pour la délétion des gènes *hgcB*, *arsR* et du cluster de gènes 470-467 chez la souche BerOc1 et pour l'expression hétérologue chez la souche G20. Chaque construction a nécessité 4 étapes d'amplifications par PCR. Up : fragment amont, dwn : fragment aval, bb : backbone (vecteur), S ou Spec : spectinomycine. Extrémités chevauchantes en rouge. Les sites de restriction sont mis en gras et soulignés.

Souches	Etapas	Amorces	Séquence (5'3')	Quantité matrice (ng)	Température d'hybridation (°C)	Taille amplicon (pb)	Concentration plasmide
BerOc1 <i>ΔhgcB</i>	Amplification ADN amont	>hgcB_up_bb_IF	<b>TTGTA AACGACGCGCCAGTGAATTC</b> cggttcaaagtgatctggg	27	60	599	230 ng/mL
		>hgcB_up_bb_IR	cgtttcaaataaaggaggcc <b>AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG</b>				
	Linéarisation plasmide amont	>hgcB_bb_up_VF	CTATGACCATGATTACGCCAAGCTT <b>ggcctctttattggagaacg</b>	3,63	60	2606	
		>hgcB_bb_up_(V)R	<b>cccagatcactttgaagccg</b> GAATCACTGCGCGTCGTTTTACAA				
	Amplification ADN aval	>hgcB_dwn_S_(I)F	<b>ATTACTAATTAATTGGGGACCTT</b> ccgaagctgcttcgctgctgc	27	65	475	
		>hgcB_dwn_bb_(I)R	<b>CTATGACCATGATTACGCCAAGCTT</b> cctcaagctgttcaggaggag				
Linéarisation plasmide aval	>hgcB_bb_dwn_(V)F	<b>ctcctgaacagcttgagg</b> AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG	9,11	70	5120		
	>hgcB_S_dwn_VR	<b>gcagcaggggaatcgaccttcgg</b> AGGGTCCCAATTAATAGTAAT					
BerOc1 <i>ΔarsR</i>	Amplification ADN amont	>arsR_up_bb_(I)F	<b>TTGTA AACGACGCGCCAGTGAATTC</b> aactcctgctcggcttctctt	24	68	632	143 ng/mL
		>arsR_up_S_(I)R	<b>TGGCTGGCGAACGAGCGCAA</b> cgtaatcgacgatagacgatagc				
	Linéarisation plasmide amont	>arsR_S_up_V(F)	<b>gctatcgtctatcgtcatttacg</b> TGCGCTCGTTCGCCAGCCA	33	70	4601	
		>arsR_bb_up_V(R)	<b>aagacgaagccgagcagcgtt</b> GAATCACTGCGCGTCGTTTTACAA				
	Amplification ADN aval	>arsR_dwn_Spec_IF3	<b>ATCCGCATTAATAATCTAGCGT</b> gctggaaccggaaaaccat	24	68	727	
		>arsR_dwn_bb_IR2	<b>ACCATGATTACGCCAAGCTT</b> acgccttctgacctcgcgt				
Linéarisation plasmide aval	>arsR_bb_dwn_VF2	<b>acgcgaggtcagaagcgt</b> AAGCTTGGCGTAATCATGGT	14	70	4720		
	>arsR_Spec_dwn_VR3	<b>atggtttccggttcacgca</b> CGCTAGATTTAATGCGGAT					
BerOc1 <i>Δ470-467</i>	Amplification ADN amont	>470_up_bb_(I)F	<b>TTGTA AACGACGCGCCAGTGAATTC</b> tccgatgcagggactcgat	24	68	651	104 ng/mL
		>470_up_S_(I)R	<b>TGGCTGGCGAACGAGCGCAA</b> atgaaacctctgtaggggt				
	Linéarisation plasmide amont	>470_S_up_V(F)	<b>aacctacaggagtttcat</b> TGCGCTCGTTCGCCAGCCA	7	61	4597	
		>470_bb_up_V(R)	<b>atcgagtccctgcatccgga</b> GAATCACTGCGCGTCGTTTTACAA				
	Amplification ADN aval	>470_dwn_Spec_IF2	<b>ATCCGCATTAATAATCTAGCGT</b> caaccgggacatttaccacga	32	70	809	
		>470_dwn_bb_IR	<b>ACCATGATTACGCCAAGCTT</b> atggccttgaccctggat				
Linéarisation plasmide aval	>470_bb_dwn_VF	<b>atccagcggtaagccat</b> AAGCTTGGCGTAATCATGGT	13	60	4614		
	>470_Spec_dwn_VR2	<b>tcggtgaaaatgtcccggtg</b> CGCTAGATTTAATGCGGAT					
G20 + pK7 ( <i>arsRhgcA</i> <i>hgcB</i> )	Amplification <i>arsRhgcA</i> <i>hgcB</i>	>arsRhgcAB_XbaI_F	<b>gctccgcttagatgatcg</b>	32	65	2854	875 ng/mL
		>arsRhgcAB_BamHI_R2	<b>ccgggatccacgtacgca</b>				

### 3.2.3. Transformation de la souche BerOc1

La transformation de la souche BerOc1 a été réalisée par électroporation. Cette technique demande une étape préalable permettant de rendre les cellules compétentes à recevoir le plasmide. Le protocole utilisé pour réaliser (i) la préparation des cellules avant transformation, (ii) la transformation mais aussi (iii) la sélection et le criblage des cellules ayant reçues le plasmide est détaillé **Figure II-5**. Des contrôles (électroporation de cellules compétentes avec eau MilliQ ou cellules compétentes non électroporées) ont été réalisés afin de déterminer la mortalité des processus et les taux de génération spontanée de cellules résistantes sous pression de sélection ou en absence de pression de sélection.

Les colonies isolées obtenues sur milieu MM<sub>10</sub>PFYE solide suite au processus de sélection et de criblage sont ensuite inoculées dans du milieu MM<sub>10</sub>PFYE liquide en présence de 400 µg/mL de spectinomycine puis incubées à 37°C.

## Protocole de génération de souche modifiée chez la souche BerOc1

### Préparation des cellules

#### J-1

- Inoculation de la souche BerOc1 dans 50 mL de milieu MM<sub>10</sub>PFYE

#### J0

- Dilution de la culture à 50% en milieu MM<sub>10</sub>PFYE. Laisser croître jusqu'en milieu de phase exponentielle à 37°C. (~6-8h)
- Centrifuger la totalité des 100 mL de culture dans des Falcons (4150 rpm, 12 minutes, 4°C).
- Laver les cellules : 2 lavage eau MilliQ dégazée froide (4150 rpm, 12 minutes, 4°C).
- Resuspendre dans 200 µL d'eau MilliQ dégazée froide pour rassembler l'ensemble des culots dans un Eppendorf : 1.2 mL total.
- Centrifuger (4150 rpm, 12 minutes, 4°C).
- Resuspendre dans 300 µL d'eau MilliQ dégazée froide.
- Conserver les cellules compétentes dans la glace.

### Electroporation et récupération des cellules

#### Conditions de transformation :

- **Cuve** : Dans la glace. Largeur = 1 mm.
- **Cellules** : Dans la glace. 1 eppendorf 50 µL de cellules par transformation.
- **Plasmide** : Dans la glace. 0.5 ou 1 µg.
- **Voltage** : ECM 630 electroporator BTX à 1500 Volts, 200 Ohm et 25 µF.
- **Lieu** : Transformation sur la paillasse.

#### Protocole :

- Introduire le volume de plasmide nécessaire dans un Eppendorf contenant 50 µL de cellules compétentes.
- Mélanger doucement.
- Transvaser le mélange dans la cuve d'électroporation.
- Essuyer la cuve et procéder à l'électroporation.
- Ajouter immédiatement 1 mL de milieu MM<sub>10</sub>PFYE dans la cuve.
- Récupérer la totalité du contenu de la cuve et inoculer 5 mL de milieu MM<sub>10</sub>PFYE sans pression de sélection (DO 0.2-0.3)
- Incuber à 37°C jusqu'à DO 0.4-0.5

### Sélection et Criblage

#### Conditions et matériels :

- **Matériel** : réduit au moins 48 heures avant utilisation dans une chambre anoxique
- **Etalement** : en surface, au râteau dans une chambre anoxique
- **Boîte de Petri** : Fraîchement préparées et conservées (48h) dans une chambre anoxique
- **Temps et condition de croissance sur milieu solide** : conditions contrôle de 5 à 7 jours et

conditions transformées avec plasmide de 1 à 2 mois dans une boîte/jarre anoxique à 37°C

#### Protocole :

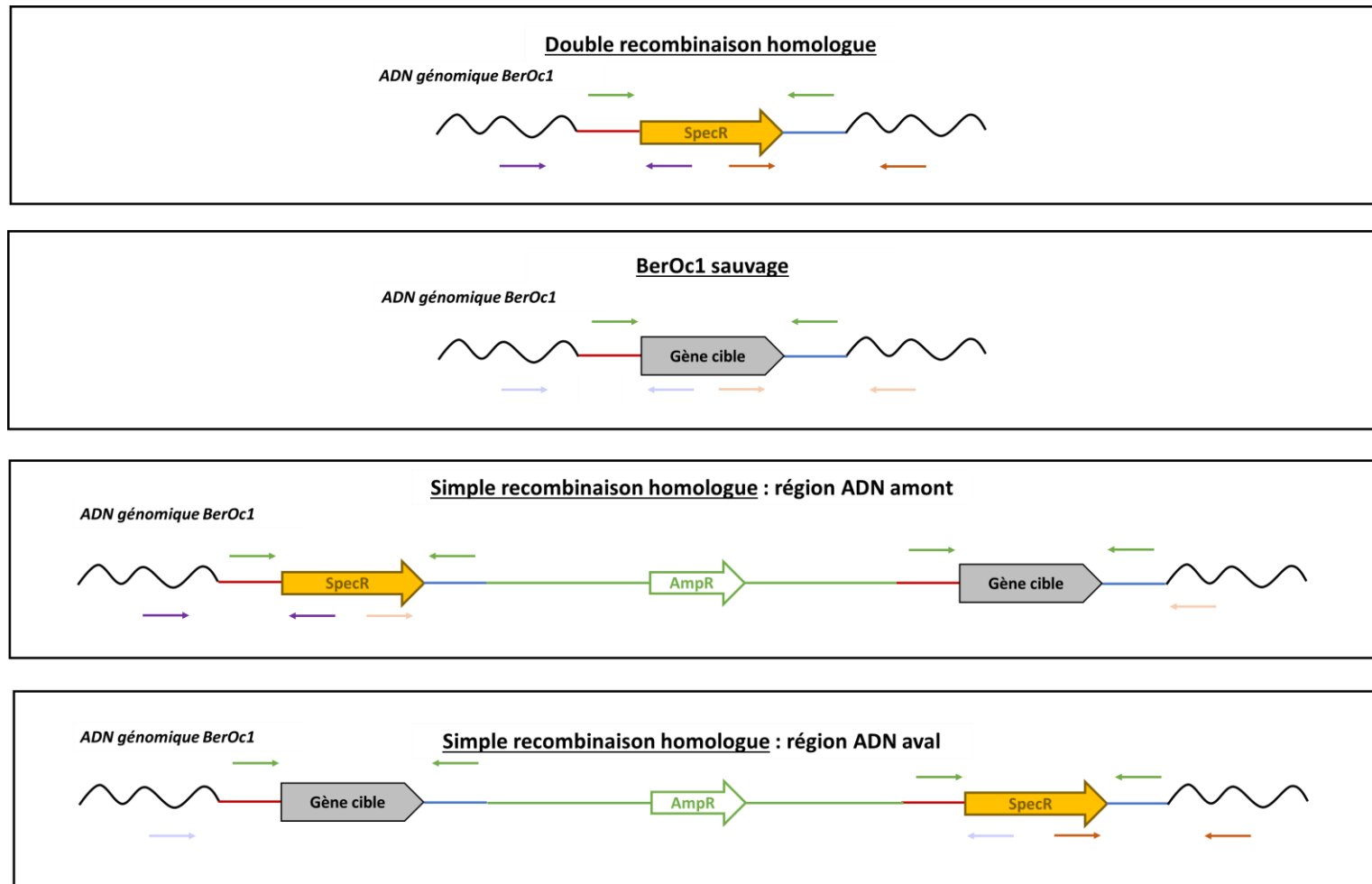
- **Etaler les contrôles** d'électroporation et de préparation des cellules en dilutions en série de 10<sup>0</sup> à 10<sup>-7</sup> sur milieu MM<sub>10</sub>PFYE solide sans pression de sélection (100 µL par boîte) et à 10<sup>0</sup> sur milieu MM<sub>10</sub>PFYE solide avec 400 µg/mL des spectinomycine (100 µL et 250 µL). (au J+1)
- **Repiquer les conditions transformées** avec plasmide à 50% dans du MM<sub>10</sub>PFYE avec 100 µg/mL de spectinomycine : incubation à 37°C jusqu'à 0.3-0.5 DO. Ce repiquage est noté **AT1**. (au J+1)
  - Prélever 2 mL du repiquage AT1 pour vérification de la double recombinaison homologue par PCR
  - Etalement sur milieu MM<sub>10</sub>PFYE solide avec 100 µg/mL et 400 µg/mL des spectinomycine (2 x 250 µL et 1x 2.5 mL de culture centrifugée 15 minutes à 10000 rpm à 4 °C resuspendue dans 100 µL de MM<sub>10</sub>PFYE).
- **Repiquer les conditions transformées** avec plasmide à 20% avec 100 µg/mL et 400 µg/mL de spectinomycine : incubation à 37°C jusqu'à 0.3-0.4 DO. Ce repiquage est noté **AT2**.
  - Prélever 2 mL du repiquage AT2 pour suivre la double recombinaison homologue par PCR
  - Etalement sur milieu MM<sub>10</sub>PFYE solide avec 400 µg/mL et 800 µg/mL des spectinomycine (1 x 100 µL et 1 x 250 µL).
- **Repiquer les conditions transformées** avec plasmide à 10% avec 400 µg/mL de spectinomycine : incubation à 37°C. (**AT3**)
  - Prélever 2 mL du repiquage AT2 pour suivre la double recombinaison homologue par PCR
  - Etalement sur milieu MM<sub>10</sub>PFYE solide avec 400 µg/mL et 800 µg/mL des spectinomycine (1 x 100 µL et 1 x 250 µL).

**Figure II-5** : Protocole détaillé de génération de souches modifiées chez la bactérie *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1.

### 3.2.4. Vérification de l'échange d'allèle

La croissance en condition sous pression de sélection peut conduire à la génération de cellules résistantes de manière spontanée. Pour vérifier l'échange d'allèles c'est-à-dire, la double recombinaison homologe (**Figure II-6**), 3 PCR ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques (**Tableau II-7**). Un de ces couples permet de vérifier le remplacement du gène cible par le gène codant la résistance à la spectinomycine (les amorces sont placés dans les régions amont et aval du gène cible, Vérification 2 « Déletion gène cible » **Tableau II-7** et amorces vertes **Figure II-6**). Les deux autres couples d'amorces permettent de vérifier que le gène codant la résistance à la spectinomycine est bien positionné dans le génome de la souche BerOc1 mais aussi qu'il ne se trouve plus sur le plasmide (Vérification 1 « Insertion Spec au génome - partie amont -» et Vérification 3 « Insertion Spec au génome - partie aval -» **Tableau II-7** et amorces violette et orange **Figure II-6**). Les PCR ont été effectuées soit, sur l'ADN génomique de BerOc1 extrait grâce aux kits DNeasy® UltraClean® Microbial (Qiagen) à partir de culots cellulaires provenant de 2 mL de culture centrifugés durant 15 minutes à 10 000 rpm à 4°C soit, directement en plaçant un clone dans le mélange réactionnel de la PCR.

Les PCR ont été réalisées dans un mélange réactionnel de 25 µL composé d'AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (4398881-Applied Biosystem) à 1X final, de 1 ng/µL d'ADN génomique ou de 1 colonie et de 0.2 µM de chaque amorce (**Tableau II-7**). Les réactions PCR ont été effectuées dans le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) suivant les étapes suivantes : (i) une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes, (ii) 30 cycles d'amplification chacun composé d'une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 30 secondes, d'une étape d'hybridation des amorces pendant 40 secondes à une température spécifique (**Tableau II-7**) et d'une étape d'élongation à 72°C durant 1 minute/kb à amplifier comme recommandé par le fournisseur de l'ADN polymérase AmpliTaq Gold™ (**Tableau II-7**) et, (iii) une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.



**Figure II-6** : Représentation schématique des différentes organisations génomiques possibles suite à la transformation de la souche BerOc1. Ces organisations font suite soit à une double recombinaison homologue entre le plasmide et le génome de la souche BerOc1 soit, une absence de recombinaison homologue (BerOc1 sauvage) soit, une simple recombinaison homologue entre la partie amont (rouge) ou la partie aval (bleu) du gène cible. Trois couples d'amorces représentés en violet, vert et orange ont été utilisés pour déterminer l'organisation génomique des clones récupérés après le processus de sélection et correspondent aux couples Vérification 1, 2 et 3 présentés dans le tableau II-7. Les couples floutés ne donnent lieu à aucune amplification.

**Tableau II-7:** Amorces utilisées pour la vérification de l'organisation génomique de la souche BerOc1 suite à une transformation. DR : double recombinaison, WT : souche sauvage, SR amont : simple recombinaison amont, SR aval : simple recombinaison aval

Souches	Vérifications	Amorces	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (°C)	Taille amplicon attendue (en pb)
<b>BerOc1</b> <b><i>ΔhgcB</i></b>	(Vérification 1) Insertion Spec au génome - partie amont -	>hgcB_verif_up_Sp_F	gatcgtctacagcgtgaacc	56	DR : 988 WT : 0 SR amont : 988 SR aval : 0
		>hgcB_verif_up_Sp_R	ATGCGGATCAGTGAGGGTTT		
	(Vérification 2) Délétion gène cible	>hgcB_verif_up_down_F	atctggccatgaactcacc	56	DR : 2308 WT : 656 SR amont : 2308 + 656 SR aval : 2308 + 656
		>hgcB_verif_up_down_R	gatgacccatattgtcctgg		
	(Vérification 3) Insertion Spec au génome –partie aval-	>hgcB_verif_Sp_down_F	AAGCGTGCATAATAAGCCCT	58	DR : 699 WT : 0 SR amont : 0 SR aval : 699
		>hgcB_verif_Sp_down_R	aaaacgactatttccccgggc		
<b>BerOc1</b> <b><i>ΔarsR</i></b>	(Vérification 1) Insertion Spec au génome - partie amont -	> arsR_verif_up_Sp_F	ctgatgatcgggttcaactg	56	DR: 853 WT: 0 SR amont : 853 SR aval : 0
		> Verif_up_Sp_R	CGAACCGAACAGGCTTATGT		
	(Vérification 2) Délétion gène cible	> arsR_up_bb_I (F)	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCaacgtcctcctcggcttctctt	60	DR : 2 713 WT : 1 581 SR amont : 2 713 + 1 581 SR aval : 2 713 + 1 581
		> arsR_dwn_bb_IR2	ACCATGATTACGCCAAGCTTaccctttctgacctgcgt		
	(Vérification 3) Insertion Spec au génome –partie aval-	> Verif_Sp_dwn_F	GGCGAGATCACCAAGGTAGT	57	DR : 1 096 WT : 0 SR amont : 0 SR aval : 1 096
		> 1401_DNDR1	gaatatctccaccgggatga		
<b>BerOc1</b> <b><i>Δ470-467</i></b>	(Vérification 1) Insertion Spec au génome - partie amont -	> 470_verif_up_SP_F	CGTCCGTTGCCACTTCCGTT	58	DR : 902 WT : 0 SR amont : 902 SR aval : 0
		> Verif_up_Sp_R	CGAACCGAACAGGCTTATGT		
	(Vérification 2) Délétion gène cible	>470_up_bb_I(F)	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCcggatgcagggactcgt	60	DR : 2 769 WT : 3 816 SR amont : 2 769 + 3 816 SR aval : 2 769 + 3 816
		>470_dwn_bb_IR	ACCATGATTACGCCAAGCTTatggccttgaccctggat		
	(Vérification 3) Insertion Spec au génome –partie aval-	> Verif_Sp_dwn_F	GGCGAGATCACCAAGGTAGT	57	DR : 1 280 WT : 0 SR amont : 0 SR aval : 1 280
		> 470_verif_Sp_dw_R	GGTCTGCGATGCCATAGATG		

### 3.3. Expression hétérologue chez la bactérie non méthylante *Desulfovibrio alaskensis* souche G20

#### 3.3.1. Principe de génération d'un hôte hétérologue

Afin de déterminer si certains gènes sont suffisants pour conférer la capacité à méthyler le mercure aux bactéries, une stratégie d'expression hétérologue de ces gènes chez la souche non méthylante *D. alaskensis* G20 a été réalisée. Cette stratégie consiste à introduire un gène ou un locus de gènes chez une souche ne les possédant pas naturellement par l'intermédiaire d'un plasmide. Contrairement aux attentes concernant le plasmide utilisé pour générer la délétion de gènes chez la souche BerOc1, le plasmide utilisé pour l'expression hétérologue chez la souche G20 doit posséder la capacité à se maintenir.

#### 3.3.2. Construction du plasmide

Le plasmide pBMK7 possédant la capacité à se maintenir chez les bactéries du genre *Desulfovibrio* (voir Partie 3.1.) a été choisi pour les expériences d'expression hétérologue. Il présente un gène codant la résistance à la kanamycine qui a ainsi été utilisé comme antibiotique de sélection des souches transformées. Pour réaliser nos expériences nous avons choisi d'introduire le locus de gène *arsRhgcAhgcB* sous le contrôle de leur propre promoteur. La méthode de clonage pour la construction du plasmide n'a cette fois pas utilisée la méthode de la POE PCR mais, une méthode classique par enzymes de restriction. Pour cela, l'ensemble promoteur-*arsRhgcAhgcB* a été amplifié à partir du génome de la souche BerOc1 grâce à des amorces appropriées (**Tableau II-6**). Ces amorces contiennent un site de restriction spécifique aux enzymes XbaI (R0145, NEB®, site de restriction TCTAGA) et BamHI (R0136, NEB®, site de restriction GGATCC). Le plasmide pBMK7 ainsi que l'amplicon ont été digérés avec les enzymes de restriction XbaI et BamHI puis l'ensemble amplicon-plasmide a été ligué grâce à l'ADN ligase T4 (M0202, NEB®) selon les recommandations du fournisseur. Le produit de ligation a été transformé dans des cellules d'*E. coli* TOP10 électro compétentes (Invitrogen®). Les cellules transformées ont été sélectionnées sur milieu LB solide supplémenté avec 150 µg/mL de kanamycine et les clones obtenus ont été repiqués dans du milieu LB liquide supplémenté avec 150 µg/mL de kanamycine. Suite à la croissance en milieu liquide, le plasmide a été extrait, purifié, quantifié et séquencé comme décrit précédemment (**Partie 3.2.2.**).



### 3.3.3. Transformation de la souche G20

La transformation de la souche G20 a été réalisée dans l'équipe MEB-Microbiologie Environnementale et Biotechnologies, au MIO à l'université Aix-Marseille. Le protocole utilisé pour réaliser les transformations chez la souche G20 est détaillé **Figure II-7**.

#### Protocole de génération de souche modifiée chez la souche G20

##### Préparation des cellules

*J-1*

- Inoculation de la souche G20 dans 50 mL de milieu Postgate C.

*J0*

- Centrifuger la totalité des 50 mL de culture (DO 0.6) dans des Falcons (7000 rpm, 15 minutes, 4°C).
- Laver les cellules : 2 lavage eau MilliQ dégazée froide (7000 rpm, 15 minutes, 4°C).
- Resuspendre dans 1 mL d'eau MilliQ dégazée froide pour rassembler l'ensemble des culots dans un Eppendorf.
- Centrifuger (7000 rpm, 8 minutes, 4°C).
- Resuspendre dans 250 µL d'eau MilliQ dégazée froide.
- Conserver les cellules compétentes dans la glace.

##### Electroporation et récupération des cellules

Conditions de transformation :

- **Cuve** : Dans la glace. Largeur = 1 mm.
- **Cellules** : Dans la glace. 1 Eppendorf 50 µL de cellules par transformation.
- **Plasmide** : Dans la glace. 0.25 ou 0.5 µg.
- **Voltage** : 1900 Volts, 250 Ohm et 25 µF.
- **Lieu** : Transformation sur la paillasse.

Protocole :

- Introduire le volume de plasmide nécessaire dans un Eppendorf contenant 50 µL de cellules compétentes.
- Mélanger doucement.
- Transvaser le mélange dans la cuve d'électroporation.
- Essuyer la cuve et procéder à l'électroporation.
- Ajouter immédiatement 1 mL de milieu Postgate C dans la cuve.
- Récupérer la totalité du contenu de la cuve et inoculer 30 mL de milieu Postgate C sans pression de sélection.
- Incuber à 33°C durant 6 heures
- Répéter le protocole pour les autres quantités de plasmide.

##### Sélection et Criblage

Conditions et matériels :

- **Matériel** : réduit au moins 48 heures avant utilisation dans une chambre anoxique

- **Étalement** : en surface, avec billes dans une chambre anoxique
- **Boîte de Petri** : Fraîchement préparées (48h) et conservées dans une chambre anoxique
- **Temps et condition de croissance sur milieu solide** : conditions contrôle et transformée de 5 à 7 jours à 33°C dans une chambre anoxique.

Protocole :

- Après 6 heures d'incubation, repiquer les conditions transformées avec 150 µg/mL de kanamycine.
- Quand la DO atteint 0.3-0.4 : centrifuger 100 µL et étaler sur milieu Postgate E solide avec 150 µg/mL de kanamycine à 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-6</sup>.
- Incuber à 33°C jusqu'à l'obtention de colonies.

**Figure II-7** : Protocole détaillé de génération de souches modifiées chez la bactérie *Desulfovibrio alaskensis* souche G20.

## 4. Expression génique

### 4.1. Extraction et quantification des ARN

Les expériences de co-transcription et de mesure de l'expression génique ont nécessité l'extraction des ARN, molécules se dégradant facilement. Afin de récupérer des ARN intacts provenant des cultures bactériennes, une solution de stabilisation des ARN (95% d'éthanol et 5% de phénol saturé avec une solution d'acétate de sodium 1M à pH 5) a été ajoutée entre 4.2% et 12.5 % final volume à volume selon la DO de culture. Après l'ajout de cette solution, les échantillons ont été vortexés pendant 5 secondes, incubés pendant 5 minutes à température ambiante et centrifugés 10 minutes à 5000 g à 4°C. Les culots cellulaires ainsi obtenus sont conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN.

Les ARN totaux ont été extraits avec le kit EXTRACT ALL® selon les recommandations du fournisseur (Eurobio). Ce kit permet de séparer d'un extrait cellulaire l'ADN, l'ARN et les protéines. Pour nos expériences, seule la fraction contenant les ARN a été récupérée. Les ARN ont été extraits, précipités puis resuspendus dans un volume final de 50 µL d'eau traitée DEPC et autoclavée afin d'éliminer les ribonucléases. La présence d'ADN a été vérifiée par PCR comme décrit précédemment (**Partie 3.2.4.**) avec des amorces ciblant le gène codant l'ARN ribosomique 16S, directement sur les ARN extraits (**Tableau II-8 – ID 1**). En cas de confirmation d'une contamination avec de l'ADN, un traitement à la DNase (TURBO DNA free™(Ambion® Invitrogen™)) a été effectué en suivant les recommandations du fournisseur. Un deuxième contrôle par PCR a été réalisé pour vérifier que le traitement DNase a éliminé tout l'ADN. Les ARN purifiés ont été conservés à -80°C.

La qualité des ARN extraits a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose non dénaturante comme précédemment (**Partie 3.2.2.**). Les échantillons d'ARN ont été quantifiés avec le kit Quant-iT RNA Assay (Invitrogen™). Le fluoromètre Synergy HTX multi-mode reader (BioTek) a permis de mesurer la fluorescence à une  $\lambda_{\text{excitation}} = 644 \text{ nm}$  et une  $\lambda_{\text{émission}} = 673 \text{ nm}$ , comme préconisé par le fournisseur du kit Quant-iT RNA Assay.

### 4.2. Rétrotranscription des ARN

La rétrotranscription est une réaction réalisée par une ADN polymérase ARN dépendante appelée transcriptase inverse qui permet la synthèse d'un brin ADN dit complémentaire (ADNc) à partir d'un brin d'ARN. Afin de réaliser la synthèse d'ADNc, la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (RT M-MLV) fournie par Invitrogen™ avec son tampon et une solution de dithiothréitol (DTT) ont été utilisées. Les ARN ont été dilués à une concentration de 20 ng/µL final dans de l'eau traitée DEPC et autoclavée. La réaction de rétrotranscription a été réalisée comme suit : 1 µL d'une solution d'ARN diluée (20 ng/µL) a été ajouté à une solution contenant 1 µL d'hexamères

aléatoires (50 ng/ $\mu$ L, Roche®), 1  $\mu$ L de dNTP (10 mM, VWR) et 9  $\mu$ L de d'eau traitée DEPC. La solution a été homogénéisée, incubée à 65°C pendant 5 minutes pour dénaturer les éventuelles structures secondaires des ARN puis immédiatement stockée sur la glace pour éviter leurs formations *de novo*. En restant sur la glace, 2  $\mu$ L de dithiothréitol (DTT, 0.1 M), 4  $\mu$ L du Buffer de l'enzyme RT M-MLV (5X) et 1  $\mu$ L de RNaseOUT Recombinant Ribonuclease inhibitor (40 U/ $\mu$ L) fournis par Invitrogen™ ont été ajoutés à la solution précédente, mélangés doucement et incubés à 37°C pendant 2 minutes permettant d'inactiver les RNase dégradant les ARN. Finalement, 1  $\mu$ L d'enzyme RT M-MLV a été ajouté et l'ensemble de la solution a été incubé à (i) 25°C pendant 10 minutes pour hybrider les hexamères aléatoires puis, (ii) 37°C pendant 50 minutes pour promouvoir l'élongation des brins et, (iii) 50°C pendant 15 minutes pour inactiver la réaction.

La vérification de la synthèse des ADNc lors de la rétrotranscription des ARN a été réalisée par PCR sur le gène codant l'ARN ribosomique 16S (**Tableau II-8 – ID 1**) et les résultats ont été visualisés sur gel d'agarose comme précédemment (**Partie 3.2.2.**). Lorsque les quantités d'ADNc paraissaient faibles ou nulles, une nouvelle étape de rétrotranscription a été réalisée.

**Tableau II-8 :** Amorces utilisées pour réaliser le contrôle qualité des ARN et des ADNc, les RT qPCR (taux d'expression génique) et les RT PCR (co transcription des gènes).

ID	Expérience	Technique moléculaire	Amorces	Séquence (5'3')	Taille amplicon (en pb) Efficacité qPCR	Température d'hybridation (°C)
1	Contrôle qualité ARN/ADNc	PCR 16S	>63F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	1324	58
			>1387R	GGGCGGWGTGTACAAGGC		
2	Expression génique	RT qPCR <i>gyrB</i>	> <i>gyrBF1</i>	CCTCGAAGAAGGTGTTCAGC	180	60
			> <i>gyrBR1</i>	CCAAGAAGCTGGTCCAGAAG	2.01	
3	Expression génique	RT qPCR <i>arsR</i>	> <i>arsR_F_qPCR</i>	atcgcctcctcaggcagtt	103	60
			> <i>arsR_R_qPCR</i>	ccttgaggctgactgacc	2.00	
4	Expression génique	RT qPCR <i>hgcA</i>	> <i>peg.1401(hgcA)_DNDF1</i>	GTGCGGCTTCAAAGTGATCT	145	60
			> <i>peg.1401(hgcA)_DNDR1</i>	GAATATCTCCACCGGGATGA	1.97	
5	Co transcription	RT PCR locus 472-466	>470F1	AGGATTCCACTGCCGACC	F1-R1: 400	F1-R1 : 56
			>469R1	CCCCAGTTGTGATGCAGC	F1-R2 : 813	F1-R2: 56
			>468R2	AGGGTGGTGGTTATAGCTGT	F1-R3: 2181	F1-R3: 56
			>467R3	CACAGGGCCAGCTTGATTC	F1-R4 : 2665	F1-R4: 56
			>466R4	CAGGTGATGTTTCCGTCGTC	F2-R3 : 541	F2-R3: 56
			>468F2	ACTACTATCCCGATTTACCT	F2-R4 : 1025	F2-R4: 56
			>471F3	ACTGAACATCGGCATCAACG		
			>472R5	AGGAGTAGCGGTCATGAT	F3-R5 : 561	F3-R5: 53
6	Co transcription	RT PCR locus <i>arsRhgcA</i> <i>hgcB</i>	> <i>arsR_F_qPCR</i>	atcgcctcctcaggcagtt	<i>arsR_F_qPCR</i> - <i>hgcB_DNDR1</i> : 1777 <i>hgcA_DNDF1</i> - <i>hgcB_DNDR1</i> : 933 <i>hgcB_DNDF1</i> - <i>hgcB_DNDR1</i> : 104	<i>arsR_F_qPCR</i> - <i>hgcB_DNDR1</i> : 56 <i>hgcA_DNDF1</i> - <i>hgcB_DNDR1</i> / 56 <i>hgcB_DNDF1</i> - <i>hgcB_DNDR1</i> / 56
			> <i>peg.1401(hgcA)_DNDF1</i>	GTGCGGCTTCAAAGTGATCT		
			> <i>peg.1402(hgcB)_DNDF1</i>	CCTACCTCATCTCGGTCTGG		
			> <i>peg.1402(hgcB)_DNDR1</i>	GGTCATAACCGTGGACGAGA		

### 4.3. Quantification de l'expression des gènes

#### 4.3.1. Principe et méthode d'analyse

L'expression des gènes chez *P. hydrargyri* BerOc1 a été mesurée par une technique de RT-PCR en temps réel (RT-RT-PCR ou RT qPCR). Elle permet de déterminer la quantité d'ADNc initiale dans les échantillons. La RT qPCR se base sur l'amplification par PCR des ADNc détectée grâce à l'ajout d'un fluorochrome, ici, du SYBR Green ( $\lambda_{\text{excitation}} = 497 \text{ nm}$  -  $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$ ). Ce fluorochrome se lie à l'ADN double brin ce qui induit l'émission de la fluorescence qui est ainsi directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés par PCR. La quantification de la fluorescence se fait en temps réel c'est-à-dire après chaque cycle de PCR. Ainsi, plus la quantité d'ADNc dans un échantillon est élevée, plus le signal sera détecté rapidement, donné par le nombre de cycles. Le cycle permettant de déterminer la quantité d'ADNc est appelé cycle seuil (Ct). Il correspond au cycle pour lequel le signal de fluorescence détecté est supérieur au bruit de fond (threshold) de la technique et montre une amplification exponentielle.

Les niveaux d'expression des gènes mesurés par RT qPCR sont fortement dépendants de la qualité de l'extraction des ARN et de la synthèse des ADNc. Afin d'obtenir des données comparables selon les conditions expérimentales mais aussi comparables à long terme, c'est-à-dire entre diverses expériences, un contrôle interne est nécessaire. L'expression des gènes d'intérêt a été ainsi reportée au niveau d'expression d'un gène de ménage (dont l'expression n'est pas censée varier), le gène *gyrB* codant la sous unité  $\beta$  de l'ADN gyrase. D'autre part, le but de nos expériences était de déterminer le niveau d'induction des gènes d'intérêt en réponse au mercure (exposé). Ainsi, la méthode d'analyse quantitative relative de 'Delta delta Ct' a été réalisée comme suit :

$$\text{Niveau d'induction du gène d'intérêt} =$$

$$2^{(Ct(\text{gène d'intérêt(exposé)}) - Ct(\text{gène de ménage(exposé)}) - (Ct(\text{gène d'intérêt(non exposé)}) - Ct(\text{gène de ménage(non exposé)}))}$$

Cependant, pour pouvoir utiliser cette méthode les efficacités d'amplification du gène d'intérêt et de ménage doivent être équivalentes. Ainsi, la première étape de ces expériences a été de réaliser un standard externe nous permettant de déterminer les efficacités d'amplification par PCR de chacun des gènes.

#### 4.3.2. Standard externe et efficacité d'amplification d'un gène

L'efficacité (E) d'amplification par PCR d'un fragment d'ADN (c'est-à-dire, la duplication du nombre de copies du fragment après chaque cycle de PCR) est déterminée grâce à la valeur de la pente de la courbe d'étalonnage mettant en relation le nombre de Ct et la concentration en ADN (échelle logarithmique). La relation est la suivante :  $E = 10^{-1/\text{pente}}$ . Le standard externe utilisé pour nos

expériences a été une solution d'ADN génomique (ADNg) de la souche BerOc1 de concentration connue. Il a été utilisé afin de réaliser une gamme de concentration allant de  $10^0$  à  $10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  et ainsi tester l'efficacité de la réaction de PCR mettant en jeu les amorces spécifiques pour l'amplification des gènes d'intérêts et du gène de ménage par qPCR. Les couples d'amorces testés ont concerné les gènes *hgcA*, *arsR*, et le gène de ménage *gyrB*. Ils ont été spécifiquement définis pour la souche BerOc1 et sont répertoriés dans le **Tableau II-8 (ID 2 à 4)** ainsi que leurs efficacités. Les efficacités des réactions de PCR étant équivalentes pour tous les couples d'amorces testés, nous avons pu appliquer la méthode d'analyse 'Delta delta Ct', en reportant l'expression des gènes d'intérêt à celle du gène de ménage *gyrB*.

#### 4.3.3. Amplification en temps réel

La valeur de Ct mesurée par qPCR est le reflet de la quantité d'ADNg ou d'ADNc contenue dans les échantillons. Les quantités d'ADN (gamme) ou d'ADNc (échantillons) ont été mesurées par qPCR grâce au thermocycleur en temps réel CFX Connect Real-Time PCR System (Biorad) lors d'une réaction mettant en jeu 1  $\mu\text{L}$  d'ADNg ou ADNc (20 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0.4  $\mu\text{M}$  des amorces appropriées et le mélange enzymatique DyNAmo™ ColorFlash SYBR® Green qPCR Kit (Finnzyme) à une concentration finale de 1X dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$ . La réaction de qPCR a débuté par une étape de dénaturation de 7 minutes à 95°C suivie par 45 cycles d'amplification composée de deux étapes : 10 secondes à 95°C et 20 secondes à 60°C. A la fin des cycles d'amplification, une courbe de fusion a été réalisée en programmant une rampe de température allant de 55°C à 95 °C et augmentant suivant des pas de 0.5°C. Durant cette rampe, la fluorescence a été acquise en continu. Cette courbe de fusion a permis de déterminer la spécificité des amplifications. Chaque condition testée a été effectuée en triplicat biologiques et mesurés par qPCR en triplicat techniques.

#### 4.4. Co transcription des gènes

Dans le but de déterminer si les gènes du locus *arsRhgcAhgcB* et ceux du locus 470-467 appartenaient à une même unité transcriptionnelle, des expériences de RT PCR visant à observer leur co transcription ont été réalisées. Ainsi, les ARN issus de cultures en présence ou en absence de mercure ont été rétrotranscrits et des PCR en point final ont été effectuées comme précédemment décrit (**partie 3.2.4.**) grâce aux amorces listées **Tableau II-8 (ID 5 et 6)**. Les résultats ont été observés sur gel d'agarose 1% marqué au BET.

## 5. Analyses bio-informatiques

### 5.1. Caractéristiques générales, domaines conservés et structure des protéines

Les séquences protéiques ont été obtenues par traduction de séquences nucléotidiques grâce à l'outil Translate accessible depuis Expasy (<https://www.expasy.org/>). Les caractéristiques générales et le rôle putatif des protéines ont été donnés par les outils UniProtKB et Compute pI/Mw accessibles dans Expasy. De plus, les domaines conservés, informant eux aussi sur le rôle putatif de la protéine, ont été prédits grâce au logiciel BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) depuis NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La E value (E) décrit le nombre d'occurrences que l'on peut s'attendre à voir par hasard lors de la recherche dans une base de données d'une taille donnée. Elle diminue de manière exponentielle à mesure que le score de la correspondance entre la protéine analysée et la famille prédite augmente.

Les séquences promotrices ont été prédites par le logiciel FruitFly ([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) en choisissant l'option 'prokaryote', et par l'algorithme BPROM accessible depuis Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>). Ainsi, le positionnement du codon START (ATG) des protéines mais aussi la recherche des sites de fixation à l'ADN de protéines régulatrices ont pu être restreints.

La prédiction des structures secondaires a été réalisée à l'aide du logiciel Jpred4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4>) avec les paramètres par défaut. Afin de prédire les structures tertiaires, le logiciel RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) avec le programme 'Distance-based Protein Folding Powered by Deep Learning' a permis d'obtenir une prédiction qui a ensuite été visualisée et modifiée grâce au logiciel PyMol version 4.6.14761 (<https://pymol.org/2/>). Sur PyMol, les motifs secondaires ainsi que les acides aminés importants ont pu être mis en évidence.

La prédiction de la localisation des protéines au sein de la cellule a été effectuée grâce au logiciel ProtCompB (Localization of bacterial protein, <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=pcompb&group=programs&subgroup=proloc>).

## 5.2. Comparaison de séquences : alignement multiple et relation évolutive

Des alignements multiples des séquences nucléotidiques en amont du cadre ouvert de lecture (ORF) de la protéine ArsR ont été réalisés pour déterminer le site potentiel de fixation à l'ADN de cette protéine. D'autre part, des alignements multiples de la protéine ArsR de *P. hydrargyri* BerOc1 et d'autres protéines proches ont été réalisés pour visualiser les homologies structurelles et les résidus conservés entre ces protéines. Les alignements multiples de séquences nucléotidiques ou protéiques ont été réalisés grâce au logiciel Multiple sequence alignment (MSA) proposé par EMBL avec l'outil Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). De plus, pour quantifier le pourcentage d'identité et de similarité entre la protéine ArsR de BerOc1 et les protéines les plus proches d'ArsR de BerOc1, la séquence protéique d'ArsR de BerOc1 a été alignée aux autres séquences protéiques grâce au logiciel BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et plus précisément l'option 'Alignement de deux ou plusieurs séquences'. La synténie a été déterminée dans MAGE (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>).

Pour générer les arbres de relation évolutive le logiciel MEGA version 7.0.26 a été utilisé. Les arbres ont été créés en utilisant la méthode de Neighbor-Joining. L'arbre consensus déduit de 500 répétitions est considéré comme représentatif de l'histoire évolutive des taxons analysés. Les branches avec une partition reproduite dans moins de 50% des répliques de bootstrap ont été supprimées. Le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les taxons associés sont regroupés dans le test de bootstrap est indiqué à côté des branches. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode de correction de Poisson et sont exprimées en unités de nombre de substitutions d'acides aminés par site. Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées.

## 6. Quantification des espèces du mercure et des sulfures

### 6.1. Quantification des espèces mercurielles

#### 6.1.1. Echantillonnage et stockage pour quantification du mercure

Afin de quantifier les concentrations en Hg(II) et MeHg dans la globalité de la culture (fraction bulk), 500 µL de cultures ont été placées dans 500 µL d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> 6N) permettant une quantification des espèces du mercure se trouvant à la fois à l'intérieur des cellules, adsorbées sur leurs parois et dans le milieu extracellulaire. Les fractions obtenues par les procédures de fractionnement (**Figure II-2**) ont aussi été dissoutes grâce à de l'acide nitrique 6N comme suit : (i) les surnageants (500 µL échantillon dans 500 µL HNO<sub>3</sub> 6N), (ii) les culots préalablement resuspendus dans 1 mL de milieu MM<sub>10</sub> (100 µL échantillon dans 100 µL HNO<sub>3</sub> 6N), (iii) les filtres représentant la fraction



intracellulaire (1 filtre dans 2 mL de HNO<sub>3</sub> 6N) et (iv) les fractions adsorbées (500 µL échantillon de filtrat dans 500 µL HNO<sub>3</sub> 6N).

### 6.1.2. Principe de la dilution isotopique et caractérisation des standards de mercure

Les concentrations des espèces mercurielles (Hg(II) et MeHg) dans les fractions prélevées au cours de nos expériences ont été déterminées par GC-ICPMS (Gas Chromatography Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry) et grâce à l'application de la méthode de la dilution isotopique (*Monperrus et al. 2005*). La méthode de la dilution isotopique, contrairement à un dosage classique faisant appel à un étalonnage externe peu robuste, fait intervenir un traceur enrichi isotopiquement ajouté dans chaque échantillon en tant qu'étalon interne. L'ajout d'un étalon interne permet de réduire les erreurs analytiques liées à la préparation des échantillons et à l'effet matrice. L'ajout du traceur isotopique se fait dès le début de la préparation de l'échantillon ainsi, il subit de la même manière que ce dernier les processus physico chimiques survenant lors de l'étape de préparation. La méthode ne se base donc pas sur une valeur absolue d'une quantité mesurée lors de l'analyse mais sur une valeur relative d'un rapport isotopique obtenu entre le mercure ajouté au cours des expériences et le mercure enrichi isotopiquement ajouté en tant que traceur interne comme suit :

$$c = \frac{c' w' Ar(RY' - X')}{w Ar'(X - RY)}$$

Avec,  $c$  : la concentration en Hg(II) ou MeHg dans l'échantillon,  $c'$  : la concentration du traceur Hg(II) ou MeHg enrichi,  $w$  : la masse ajoutée en échantillon,  $w'$  : la masse ajoutée en traceur Hg(II) ou MeHg enrichi,  $Ar$  : la masse atomique du mercure ajouté dans l'échantillon,  $Ar'$  : la masse atomique du traceur Hg(II) ou MeHg enrichi,  $R$  : le rapport isotopique entre l'aire mesurée de l'isotope A et l'aire de mesure pour l'isotope B,  $Y'$  et  $X'$  : l'abondance isotopique du traceur Hg(II) ou MeHg enrichi en isotope B et A respectivement,  $Y$  et  $X$  : l'abondance isotopique du mercure ajouté dans l'échantillon en isotope B et A respectivement.

Le mercure naturel est sous forme de 7 isotopes (196, 198, 199, 200, 201, 202, 204) parmi lesquels l'isotope 202 est majoritaire (29.86 %). Les incubations ont été réalisées avec des solutions mères de Hg(II) de MeHg naturels et, lors de la dilution isotopique, deux traceurs isotopiques sont ajoutés, à savoir du <sup>199</sup>Hg(II) et du <sup>201</sup>MeHg (ISC Science Oviedo) dont les concentrations et les abondances isotopiques ont été mesurées à chaque session d'analyse. Les concentrations de Hg(II) et de MeHg seront alors déterminées grâce aux rapports <sup>202</sup>Hg(II)/<sup>199</sup>Hg(II) et <sup>202</sup>MeHg/<sup>201</sup>MeHg.

La détermination de la concentration en Hg(II) ou en MeHg dans un échantillon par la méthode de la dilution isotopique repose sur une relation faisant intervenir les rapports isotopiques précédemment décrits, la concentration du traceur enrichi ajouté, la quantité ajoutée de ce traceur,

la quantité ajoutée de l'échantillon mais aussi, les masses atomiques et les abondances de chaque isotope du mercure. Ainsi, la grande précision de la quantification par dilution isotopique vient aussi du fait que (i) chaque ajout (échantillon ou traceur enrichi) est pesé avec une grande précision (0.00001 g) et, (ii) les abondances et les masses atomiques des traceurs enrichis sont déterminées précisément (RSD inférieure à 1%) avant chaque session d'analyse. Les abondances du mercure naturel ajouté lors de nos expériences ainsi que sa masse atomique sont connues et constantes.

Finalement, des blancs analytiques ont été effectués plusieurs fois par session dans lesquels aucune solution de mercure n'a été ajoutée.

### 6.1.3. Principe de la GC-ICPMS et préparation des échantillons

Le couplage GC-ICPMS est une technique d'analyse qui permet de séparer par chromatographie gazeuse (GC, Focus GC, ThermoElectron), ioniser (ICP) et détecter (MS, ICPMS X7 series, ThermoElectron) les espèces mercurielles avec une très bonne sensibilité. Les limites de détection absolues sont de l'ordre de quelques femtogrammes et le domaine de linéarité est de 0.05 nM (LOD) à 5 nM.

La préparation des échantillons a consisté à une étape de dérivation par éthylation au cours de laquelle des espèces mercurielles sont transformées sous forme de  $\text{MeHgC}_2\text{H}_5$  et  $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgC}_2\text{H}_5$  afin qu'ils soient retrouvés sous forme volatile lors de l'analyse. Dans un vial de 22 mL, une quantité d'échantillon est ajoutée à 5 mL de solution tampon acétate à pH 4 (0.1 mM). Des quantités connues de  $^{199}\text{Hg(II)}$  et  $^{201}\text{MeHg}$  ont été ensuite ajoutées de manière à obtenir des rapports isotopiques proches de 1 (rapport isotopique optimal). Si nécessaire, le pH a ensuite été ajusté à pH 4 soit avec du  $\text{NH}_3$  soit du  $\text{HCl}$  purs. La réaction d'éthylation se fait par ajout de 80  $\mu\text{L}$  d'une solution de sodium tétraéthylborate ( $\text{NaBEt}_4$ , 25% v/v). Les espèces volatiles ont été concentrées dans une phase organique composée d'isooctane pur dont le volume a été adapté selon les concentrations en espèces du Hg finales désirées. Le vial est ensuite fermé avec un bouchon en PTFE et le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 20 minutes minimum afin d'optimiser le transfert des espèces mercurielles éthylées de la phase aqueuse vers la phase organique. La phase organique a finalement été récupérée pour être placée dans un vial de 2 mL bouché par un septum en PTFE et stocké à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à l'injection en GC-ICPMS. Toutes les préparations antérieures à la mesure ont été faites dans une vaisselle en verre (vials 22 mL avec bouchons PTFE) nettoyée au préalable avec des bains d'acide ( $\text{HNO}_3$  10% et de  $\text{HCl}$  10%), maintenus dans un bain à ultrasons. Des rinçages successifs à l'eau MilliQ permettent ensuite d'éliminer toute trace d'acide.

### 6.1.4. Analyses des données

Pour chaque échantillon, un chromatogramme par isotope est enregistré lors de l'analyse. Chaque chromatogramme affiche deux pics : le premier, avec un temps de rétention plus court, correspond au MeHg et, le second, avec un temps de rétention plus long, correspond au Hg(II). En effet, l'étape de dérivatisation du Hg(II) et du MeHg conduit à une molécule plus lourde pour le Hg(II) ( $C_2H_5HgC_2H_5$ ) que pour le MeHg ( $MeHgC_2H_5$ ).

Les données ont été traitées grâce au logiciel PlasmaLab qui permet l'intégration de chaque pic et le calcul des aires de pic pour obtenir les rapports isotopiques  $^{202}Hg(II)/^{199}Hg(II)$  et  $^{202}MeHg/^{201}MeHg$  et déduire les concentrations en mercure dans les échantillons par la formule décrite précédemment.

Les potentiels de méthylation (noté M%, en %), les taux de méthylation (noté Tmet, en mol.cellule<sup>-1</sup>.heure<sup>-1</sup>) et les taux de déméthylation (noté Tdemet, en mol.cellule<sup>-1</sup>.heure<sup>-1</sup>) ont été calculés comme suit :

$$M\% = \frac{[MeHg_{Tf}] - [MeHg_{Ti}]}{[Hg_{total}]} \times 100$$

$$T_{met} = \frac{(( [MeHg_{Tf}] - [MeHg_{Ti}] ) / 215) * 10^{-9}}{[cell] \times h}$$

$$T_{demet} = \frac{(( [MeHg_{Ti}] - [MeHg_{Tf}] ) / 215) * 10^{-9}}{[cell] \times h}$$

Avec les concentrations en espèce mercurielles en ng/mL, la concentration en cellules en cellule/mL et h, le temps d'exposition au mercure en heure.

## 6.2. Dosage des sulfures

### 6.2.1. Principe du dosage des sulfures

Le dosage des sulfures a été effectué suivant la méthode colorimétrique de Cline (*Cline 1969*). L'apparition de bleu de méthylène par réaction entre deux molécules de N,N-diméthylparaphénylènediamine (DMPD) et des sulfures d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) est mesurée par absorbance à 670 nm. Cette réaction n'a lieu qu'en présence d'ions ferriques (Fe<sup>3+</sup>) permettant d'oxyder les molécules de DMPD qui peuvent alors réagir avec les sulfures. La coloration est directement proportionnelle à la concentration de sulfure dans la solution.

### 6.2.2. Echantillonnage et stockage pour dosage des sulfures

Afin de conserver les sulfures contenus dans les échantillons, 100 µL d'échantillon ont été ajoutés à 400 µL d'acétate de zinc à 2% (m/v) (20 g d'acétate de zinc, 1 mL d'acide acétique, QSP 1 L d'eau MilliQ) permettant de piéger les sulfures par la formation de complexes de sulfure de zinc. Les échantillons sont agités manuellement et stockés à 4°C jusqu'à l'analyse.

### 6.2.3. Gamme d'étalonnage

Une solution mère de sulfure ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich) a été préparée dans une chambre anoxique afin d'éviter l'oxydation des sulfures puis, une gamme étalon a été réalisée par dilution dans de l'eau MilliQ dégazée et des aliquotes de 100 µL placés dans 400 µL d'acétate de zinc. Cette gamme est linéaire de 0.003 µM à 0.425 mM ( $R^2 = 0.999$  ;  $y = 2.1427x + 0.0453$ ). La limite de détection a été déterminée par la méthode de l'analyse des blancs (100 µL d'eau MilliQ dégazée dans 400 µL d'acétate de zinc 2%) suivant la relation suivante :  $\text{LOD} = x_{\text{blanc}} + 3*s_{\text{blanc}}$  où  $x$  est la moyenne des blancs et  $s$  l'écart type. Ainsi, 16 blancs ont été réalisés et la LOD a été déterminée à 0.92 µM.

### 6.2.4. Quantification des sulfures

Les sulfures piégés dans la solution d'acétate de zinc ont été quantifiés en ajoutant 150 µL de DMPD à 0.2% (m/v) (2 g de N,N-diméthylparaphénylènediamine sulfate ( $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ , Sigma Aldrich), 200 mL d'acide sulfurique concentré ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), QSP 1L d'eau MilliQ) et 10 µL de chlorure de fer à 10% (m/v) ( $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dilué dans de l'eau MilliQ), ces derniers fournissant les ions ferriques essentiels pour catalyser la réaction de formation du bleu de méthylène. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante à l'obscurité, l'absorbance à 670 nm est mesurée (Synergy HTX multi-mode reader (BioTek)). Les concentrations en sulfure sont directement déterminées grâce à la gamme d'étalonnage.

## 7. Imagerie du mercure par nano-fluorescence X sur rayonnement synchrotron

L'imagerie du mercure au niveau cellulaire permet de déterminer sa localisation (extracellulaire, membranaire/périplasmique ou cytoplasmique), de la comparer à d'autres éléments tels que le soufre, le calcium, le fer et le phosphore et enfin, d'observer son hétérogénéité au sein de l'échantillon. De par les concentrations relativement faibles de mercure présentes, il est nécessaire d'utiliser une technique sensible. De plus, il est essentiel que la taille de faisceau soit de l'ordre de la dizaine de nanomètres afin de sonder à l'échelle de la cellule bactérienne mais aussi que la méthode de préparation et d'analyse préserve au mieux à la fois la structure cellulaire et la distribution des éléments chimiques. Pour ces différentes raisons, nous avons utilisé la fluorescence aux rayons X sur rayonnement synchrotron à l'échelle nanométrique (nano-XRF). Les analyses ont été réalisées à l'ESRF

(European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble sur la ligne de lumière ID16A (Silva et al. 2017) qui offre une résolution spatiale de l'ordre de 50 nm et permet des mesures en cryogénie afin de préserver au mieux l'échantillon.

Les mesures ont été réalisées sur la souche sauvage BerOc1 et le mutant BerOc1  $\Delta 470-467$ . Les deux souches ont été exposées en début de phase exponentielle de croissance à 2  $\mu\text{M}$  de Hg(II) (**Tableau II-5 ID-9**). Après 4h d'exposition au mercure (**Figure II-1 – Procédure expérimentale 2**), les cultures ont été centrifugées 10 minutes à 6000g à température ambiante et le surnageant a été enlevé. Le culot a été lavé avec 1 mL de milieu MM<sub>10</sub> sans Hg et centrifugé comme préalablement. L'opération a été renouvelée avec 1 mL d'eau milliQ dégazée. Finalement, après avoir enlevé le surnageant, le culot a été resuspendu dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ dégazée (**Figure II-2 – Fractionnement 3**). Le cryoplongeur Leica EM-GP2 a ensuite été utilisé pour la préparation. Un volume de 7  $\mu\text{L}$  de suspension a été déposé sur une membrane Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, et le surplus de liquide a été immédiatement absorbé par 'blotting' avant d'être plongé dans de l'éthane liquide refroidi à l'azote liquide afin d'assurer une congélation ultra-rapide. Les membranes ont ensuite été conservées dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse. La préparation des échantillons a été faite au CBMN de Bordeaux. Les membranes ont ensuite été transférées sur la ligne de lumière à l'aide d'une canne de transfert permettant le positionnement à froid des échantillons. Les mesures ont été réalisées en condition cryogénique grâce à un cryostat sous azote liquide avec un micro-faisceau de taille 39 nm (vertical) x 64 nm (horizontal), une énergie de 17 keV et un flux de  $1.9 \times 10^{11}$  photons/secondes. Les échantillons ont été scannés avec une taille de pixel de 30 nm et un temps d'intégration de 50 ou 100 millisecondes. Le signal de fluorescence des rayons X a été collecté avec une diode 4 éléments (Silicon Drift Detector). Les spectres XRF ont été traités en utilisant le logiciel PYMCA (Solé et al. 2007) pour obtenir des cartes de densité surfacique ( $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ ). L'étalonnage a été effectué en utilisant la référence de film mince AXO (Dresden, GmbH). Les cartes élémentaires résultantes ont été exprimées en cartes de densité surfacique en  $\text{ng}\cdot\mu\text{m}^{-2}$ .

## 8. Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel R studio. Les analyses visant à déterminer si une corrélation existait entre deux variables ont été effectuées par le coefficient de corrélation linéaire de Pearson (Fonction : `cor.test(x,y, method="pearson")`). Les analyses visant à définir s'il existait des différences significatives entre deux conditions ont été effectuées grâce au test non paramétrique Kruskal Wallis (Fonction : `kruskal.test`) suivi par le test « post hoc » de Dunn (Package : `dunn.test`).

CHAPITRE III - Etude physiologique de la bactérie  
*Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1  
pour mise au point d'un protocole de  
génération de souches mutantes de délétion



## 1. Introduction

Les études sur la méthylation du mercure ont identifié un couple de gènes, *hgcA* et *hgcB*, impliqué dans la méthylation du Hg(II) (Parks et al. 2013). Cependant, l'expression de ces gènes n'est pas déterminée par la présence de Hg(II) (Goñi-Urriza et al. 2015; Qian et al. 2018). A l'heure actuelle, HgcA et HgcB sont les seuls déterminismes génétiques identifiés dans la transformation du Hg(II) retrouvés chez tous les microorganismes méthylants. Des études récentes de génomique comparative et, de transcriptomique et protéomique différentielle ont néanmoins apporté des pistes sur d'autres déterminismes génétiques répondant au mercure chez les bactéries méthylantes (Qian et al. 2016, 2018; Goñi-Urriza et al. 2020). La stratégie globale de ma thèse a ainsi été de générer des souches mutantes de délétion des gènes codant ces déterminismes génétiques afin de déterminer leur rôle dans la réponse au mercure et sa méthylation. Pour ce faire, la première étape a été de mettre au point un protocole de génération de souches mutantes de délétion chez la souche méthylante modèle du laboratoire, *P. hydrargyri* souche BerOc1, pour laquelle les méthodes de génétique n'étaient pas développées.

Dans ce chapitre, les procédures mises en place pour générer des mutants de délétion sont détaillées. Tout d'abord, une étude physiologique de la souche BerOc1 a été réalisée afin de déterminer les conditions de croissance conduisant à (i) une production de biomasse importante et (ii) une croissance lente, pour favoriser la double recombinaison puis, dans un deuxième temps, (iii) la croissance sur boîte de Petri de la souche BerOc1 ainsi que (iv) le criblage sur antibiotique ont été mis au point. Finalement, les protocoles de (i) génération de cellules compétentes, (ii) de transformation et (iii) les vecteurs non répliatifs utilisés chez d'autres bactéries sulfato-réductrices ont été adaptés pour *P. hydrargyri* BerOc1. La mise au point du protocole a été faite sur le gène *hgcB*, gène intervenant dans la méthylation de mercure, dont la délétion n'est pas létale pour *P. mercurii* ND132, souche proche de BerOc1. De plus, le mutant délété du gène *hgcB*, nous a permis d'obtenir un contrôle non méthylant de la souche BerOc1 sauvage lors des expériences. L'étude physiologique de la souche BerOc1 menée au cours de ce chapitre a de plus permis de déterminer, en tant qu'objectif parallèle à la génération de souches mutantes, des conditions favorables à l'étude de la méthylation du mercure.



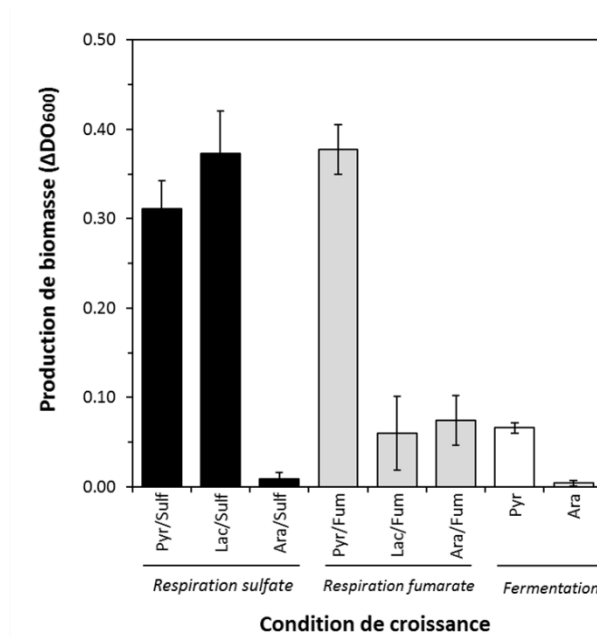
## 2. Résultats

### 2.1. Etude physiologique de la souche BerOc1 en milieu liquide

#### 2.1.1. Impact du métabolisme sur la croissance de la souche BerOc1

Les bactéries sont capables de croître selon divers métabolismes afin de produire l'énergie nécessaire à leurs activités (croissance, motilité, etc.) sous forme d'ATP. Deux types de métabolismes sont possibles : la respiration, impliquant deux substrats (couple donneur-accepteur d'électrons) ou, la fermentation, pour laquelle l'accepteur d'électrons est un produit du métabolisme. Le but de ce travail préliminaire était de déterminer les conditions de croissance donnant lieu à une production de biomasse élevée tout en favorisant une croissance lente, deux pré requis pour la génération de souches mutantes. La souche BerOc1 est capable de croître et de donner lieu à une biomasse élevée en respirant le sulfate ou le fumarate, tous deux servant d'accepteur d'électrons (Goñi-Urriza et al. 2015; Isaure et al. 2020). En revanche, aucune donnée sur la croissance en fermentation ou encore, sur les temps de doublement de cette souche selon les métabolismes n'a été donnée dans ces études. Ce travail a ainsi débuté par l'analyse de la croissance de la souche BerOc1 en supplémentant le milieu de MM<sub>10</sub> avec différents couples donneur-accepteur d'électrons ou uniquement une seule source de carbone pour favoriser la fermentation comme suivant : (i) pyruvate-sulfate (respiration sulfate), (ii), lactate-sulfate (respiration sulfate) (iii) arabinose-sulfate (respiration sulfate) (iv) pyruvate-fumarate (respiration fumarate), (v) lactate-fumarate (respiration fumarate), (vi) arabinose-fumarate (respiration fumarate), (vii) pyruvate seul (fermentation pyruvate) et (viii) arabinose seule (fermentation arabinose) (**Figure III-1**). Tous les substrats métaboliques ont été ajoutés à 20 mM final chacun. Pour les conditions de respiration fumarate et de fermentation, 0.1 mM de thiosulfate a été ajouté en tant que source de soufre. La production de biomasse ainsi que les taux de croissance ont été mesurés après deux repiquages de la souche dans le métabolisme étudié comme présenté dans le chapitre Procédures expérimentales (**Chapitre II Partie 1.2.2.**).

Le métabolisme de respiration avec les couples pyruvate-sulfate, lactate-sulfate et pyruvate-fumarate ont donné lieu aux productions de biomasse les plus élevées (environ 0.35 DO) (**Figure III-1**). Au contraire, les productions de biomasse en présence du couple lactate-fumarate ou en présence d'arabinose (peu importe l'accepteur) sont très faibles. La fermentation du pyruvate conduit également à une production de biomasse très faible, bien que supérieure à celle produit lors de la fermentation de l'arabinose. Dans les conditions étudiées, l'arabinose n'est pas métabolisé par la souche BerOc1.



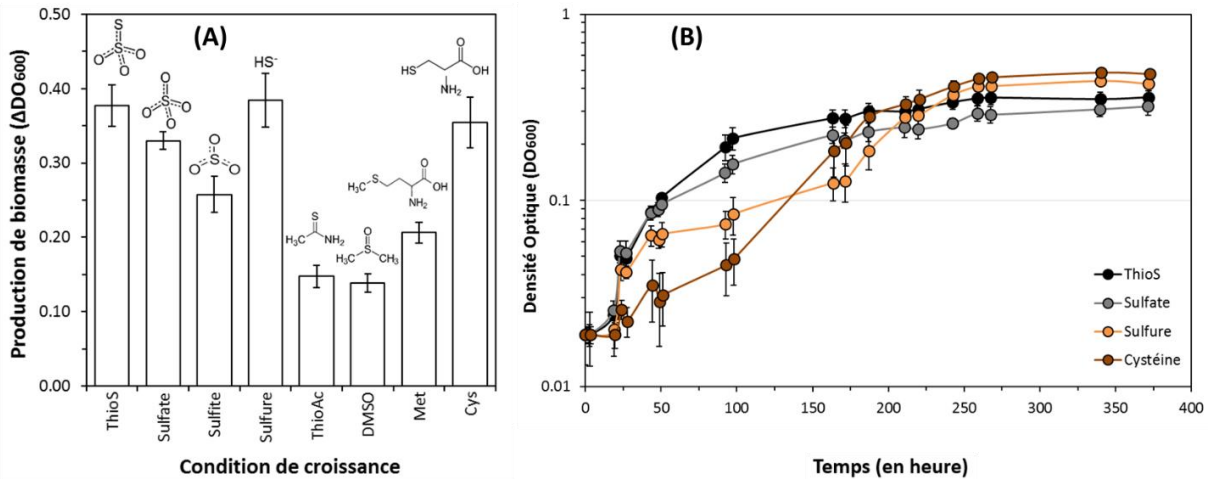
**Figure III-1** : Production de biomasse par la souche BerOc1 en culture avec différents substrats métaboliques. Les substrats ont été ajoutés à 20 mM final chacun. Les métabolismes de respiration fumarate et de fermentation ont été supplémentés avec 0.1 mM de thiosulfate en tant que source de soufre. Sulf: Sulfate. Fum: Fumarate. Pyr : Pyruvate. Lac: Lactate. Ara: Arabinose. Les barres d'erreur représentent l'écart type d'au minimum trois cultures indépendantes.

### 2.1.2. Effet des sources de soufre sur la croissance de la souche BerOc1

La condition de respiration fumarate associée au pyruvate nécessite une source de soufre indispensable physiologiquement pour la souche. Des tests de croissance ont ainsi été réalisés en respiration fumarate avec du pyruvate, en ajoutant différentes sources de soufre pour déterminer celle donnant lieu à la production de biomasse la plus élevée tout en continuant à favoriser une croissance lente. Les sources de soufre testées ont été : le thiosulfate ( $(S_2O_3^{2-})$ , utilisé dans les tests précédents), le sulfate ( $SO_4^{2-}$ ), les sulfites ( $SO_3^{2-}$ ), les sulfures ( $HS^-$ ), la thioacétamide ( $C_2H_5NS$ ), le diméthylsulfoxyde (DMSO,  $C_2H_6OS$ ), la méthionine ( $C_5H_{11}NO_2S$ ) et, la cystéine ( $C_3H_7NO_2S$ ) (**Figure III-2A**). Toutes les sources de soufre ont été préparées en conditions anoxiques (chambre anoxique et eau MilliQ stérile dégazée par bullage au  $N_2$ ) pour éviter leur oxydation et, ont été ajoutées à une concentration finale de 0.1 mM.

L'ajout de thioacétamide, DMSO et méthionine individuellement, a conduit à des productions de biomasse moins élevées comparées aux autres conditions testées (**Figure III-2A**). De plus, les ajouts de thiosulfate, sulfures et cystéine ont mené à des productions de biomasse similaires et élevées. Puisque d'une part, *P. hydrargyri* possède la capacité métabolique de dismutation du thiosulfate (devenir difficilement contrôlable de la molécule), et d'autre part, les croissances en sulfure et cystéine ont été aléatoires (**Figure III-2B**), la condition en présence de sulfate est apparu plus pertinente pour

réaliser le protocole de génération de souches mutantes. En effet, cette condition a conduit à une biomasse élevée (presque similaire à celles obtenues en présence de thiosulfate) et, a présenté une croissance régulière et reproductible facilitant les manipulations et l'organisation des expériences.



**Figure III-2 :** Effet des sources de soufre sur (A) la production de biomasse et (B) la croissance chez la souche BerOc1. Un milieu pyruvate-fumarate (20 mM chacun) a été complété avec différentes sources de soufre, toutes ajoutées à 0.1 mM final. Ce milieu a été inoculé avec une culture de la souche BerOc1 afin de suivre la croissance et mesurer la production de biomasse. Les formules semi développées des molécules ajoutées en tant que source de soufre sont représentées. (A) ThioS : thiosulfate. ThioAc : thioacétamide. DMSO : diméthylsulfoxyde. Met : méthionine. Cys : cystéine. (B) Thiosulfate (ThioS, noir). Sulfate (gris). Sulfures (orange). Cystéine (marron). Les barres d'erreur représentent l'écart type provenant de deux cultures indépendantes au minimum.

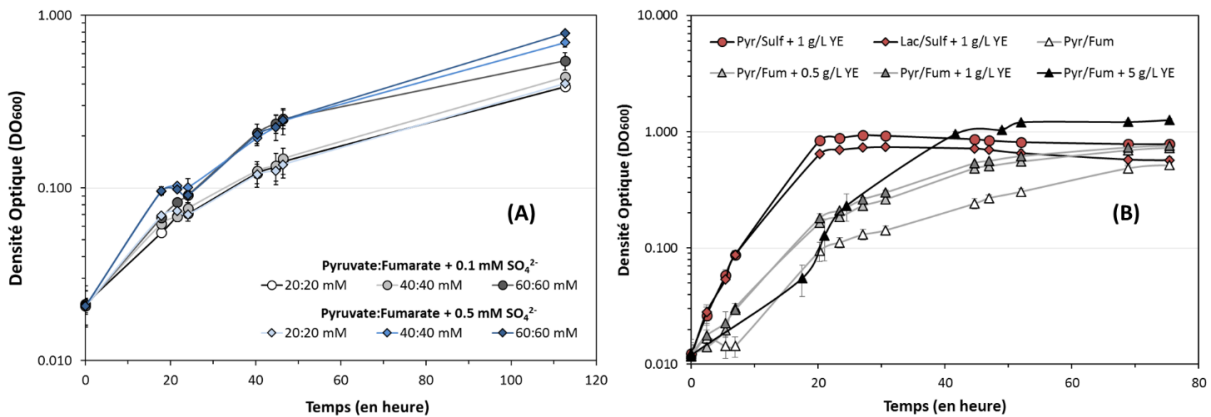
### 2.1.3. Augmentation de la capacité de production de biomasse en respiration fumarate associée au sulfate.

Basé sur les conditions précédemment mises en place et toujours dans l'optique d'augmenter la production de biomasse de nos conditions de croissance, l'effet de l'augmentation de la concentration des substrats métaboliques pyruvate et fumarate (de 20 mM à 60 mM chacun) ainsi que l'effet de l'augmentation de la concentration de la source de soufre, le sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ , de 0.1 à 0.5 mM) ont été testées et, la production de biomasse mesurée en conséquence (**Figure III-3A**). Etant donné que le sulfate peut être utilisé en tant qu'accepteur d'électrons (**Figure III-2**), des concentrations inférieures à l'ordre du milli molaire, c'est-à-dire insuffisantes pour supporter la croissance en sulfato-réduction, ont été testées.

L'ajout des substrats à 60 mM en présence de 0.1 mM de sulfate a augmenté la production de biomasse finale (**Figure III-3A**). Néanmoins, l'ajout de sulfate à 0.5 mM associé à des concentrations en substrats de 40 mM ou 60 mM a d'avantage augmenté cette production. Ainsi, 40 mM de substrats

et 0.5 mM de sulfate est apparue comme la condition favorisant une production de biomasse maximale tout en limitant l'ajout de substrat.

L'ajout d'extrait de levure (YE) à cette condition de croissance, actuellement en milieu minimum, a été testée (**Figure III-3B**). La respiration sulfate étant le métabolisme privilégié par la souche BerOc1, nous avons aussi testé en parallèle l'ajout de 1 g/L d'extrait de levure à cette condition pour comparer les productions de biomasse finales avec celles obtenues en respiration fumarate.



**Figure III-3 :** Effet de (A) la concentration en substrats métaboliques et en sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) et (B) la concentration en extrait de levure (YE) sur la croissance de la souche BerOc1. (A) Le couple pyruvate-fumarate (respiration fumarate) a été ajouté à des concentrations finales de 20, 40 ou 60 mM chacun. Le sulfate en tant que source de soufre a été ajouté à 0.1 mM final (gris) et à 0.5 mM final (bleu). (B) Les souches ont été cultivées selon plusieurs métabolismes, la respiration du sulfate (Sulf, rouge) ou du fumarate (Fum, triangles). Les couples donneur-accepteur ont été ajoutés à 40 mM chacun. Le couple pyruvate-fumarate a été complété avec 0.5 mM de sulfate en tant que source de soufre. Donneur d'électrons: Pyr. Pyruvate. Lac. Lactate. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois cultures indépendantes.

L'ajout d'extrait de levure dès 0.5 g/L a considérablement augmenté la production de biomasse en respiration fumarate comparé à la croissance sans extrait de levure (respectivement 0.517 et 0.728) (**Figure III-3B**). L'augmentation de la production de biomasse en respiration fumarate est proportionnelle à la concentration en extrait de levure (de 0.5 à 5 g/L). Néanmoins, l'ajout de 5g/L d'extrait de levure semble affecter la croissance de la souche. En effet, alors que les croissances en respiration sulfate se déroulent selon une seule phase rapide qui est de plus exponentielle, les croissances en respiration fumarate semblent favoriser une croissance en deux temps, avec une phase exponentielle rapide et une deuxième phase de croissance plus lente. L'ajout de 5 g/L d'extrait de levure en respiration fumarate semble alors restaurer une croissance en une seule phase de croissance comparée aux autres conditions en respiration fumarate. Ainsi la concentration de 1 g/L d'extrait de levure nous a semblé la plus pertinente puisque la biomasse est considérablement augmentée tout en

se déroulant selon une croissance lente et régulière, essentielle au protocole de génération de souches mutantes. De plus, il est intéressant d'observer que la production dans cette condition est équivalente à celles obtenues lors des croissances en respiration sulfate avec 1 g/L d'extrait de levure tout en présentant, comparé à la respiration sulfate, l'avantage de ne produire que de faibles concentration de sulfures pouvant interférer lors de la transformation de la souche et ainsi défavoriser le processus de génération de souches mutantes.

Cette étude physiologique de la souche BerOc1 en milieu liquide a permis de sélectionner la respiration fumarate en présence 0.5 mM de sulfate et 1 g/L d'extrait de levure en tant que condition favorable pour l'optimisation de la croissance de la souche BerOc1 en milieu solide. Ce milieu est noté MM<sub>10</sub>PFYE dans la suite du manuscrit.

## 2.2. Mise au point du protocole de sélection et de criblage sur la souche BerOc1

### 2.2.1. Croissance de la souche BerOc1 sur milieu solide

Un protocole de génération de souches mutantes fait appel à une étape de sélection et de criblage sur milieu solide. Etant donné que la souche BerOc1 n'a jamais été cultivée sur boîte de Petri, il est essentiel de s'assurer que les conditions de croissance précédemment sélectionnées puissent promouvoir une croissance en milieu solide. Ainsi, un milieu MM<sub>10</sub>PFYE supplémenté avec de l'agar à 15 g/L a été préparé. Le milieu MM<sub>10</sub>PFYE a de plus été complémenté avec de 0.5 mL/L d'une solution de citrate de titane (III), utilisé comme réducteur fort. Les boîtes de Petri ont été coulées dans une chambre anoxique 48 heures avant d'étaler la souche afin que les boîtes soient en condition réduite optimale lors de l'étalement de la souche.

Pour effectuer ce test de croissance en milieu solide, une culture fraîche de la souche BerOc1 a été cultivée en milieu MM<sub>10</sub>PFYE jusqu'à DO 0.750 correspondant à  $8.05 \times 10^8$  cellules/mL (voir corrélation nombre de cellules-DO **Chapitre II Partie 2.2.**). Dans une chambre anoxique, des dilutions séquentielles de 10 en 10 dans du milieu MM<sub>10</sub>PFYE ont été effectuées pour ainsi réaliser une gamme allant de  $8.05 \times 10^8$  à  $8.05 \times 10^3$  cellule/mL. 100  $\mu$ L de chaque dilution ont été étalés en surface à l'aide d'un râteau sur le milieu solide. Les boîtes ont été ensuite incubées dans une boîte hermétique dégazée à l'azote, à 37°C couvercle vers le haut, durant une nuit puis retournées et incubées de nouveau à 37°C. Les résultats de croissance après 5 jours d'incubation sont répertoriés dans le tableau suivant (**Tableau III-1**) : un tapis cellulaire ou des colonies de couleur marron ont poussé sur boîte, selon la dilution. Afin de vérifier que les colonies obtenues correspondent à la souche BerOc1, deux PCR, une sur le gène codant la sous unité ribosomique 16S et une sur le gène *hgcA* ont été réalisées grâce aux amorces listées précédemment dans le **Tableau II-8**. Les résultats ont montré que les tailles des amplicons pour

ces deux gènes correspondaient à la taille de l'amplicon obtenu sur l'ADN génomique de BerOc1 (contrôle positif).

**Tableau III-1** : Croissance de la souche BerOc1 sur milieu solide. Le milieu de culture a été le milieu MM<sub>10</sub>PFYE en présence de 0.5 mL/L d'une solution de citrate de titane (III). Des dilutions séquentielles de 10 en 10 ont été réalisées. Tapis cellulaire: croissance sur l'ensemble de la boîte de Petri sans colonies isolées.

Nombre de cellules en culture (cellules/mL)	8.05 x 10 <sup>8</sup>	8.05 x 10 <sup>7</sup>	8.05 x 10 <sup>6</sup>	8.05 x 10 <sup>5</sup>	8.05 x 10 <sup>4</sup>	8.05 x 10 <sup>3</sup>
Nombre de colonies sur boîte (colonies/mL étalé)	Tapis cellulaire	Tapis cellulaire	Tapis cellulaire (colonies non isolées)	Environ 1.8 x 10 <sup>4</sup>	Environ 2.4 x 10 <sup>3</sup>	2.2 x 10 <sup>2</sup>

En conclusion, la souche BerOc1 est capable de croître sur le milieu MM<sub>10</sub>PFYE solide complétement avec 0.5 mL/L d'une solution de citrate de titane (III) et phénotypiquement cette souche produit des colonies de couleur marron sur ce milieu. De plus, la croissance sur boîte est efficace puisqu'environ 1 cellule croît sur boîte pour 40 cellules étalées.

### 2.2.2. Résistance de la souche BerOc1 aux antibiotiques

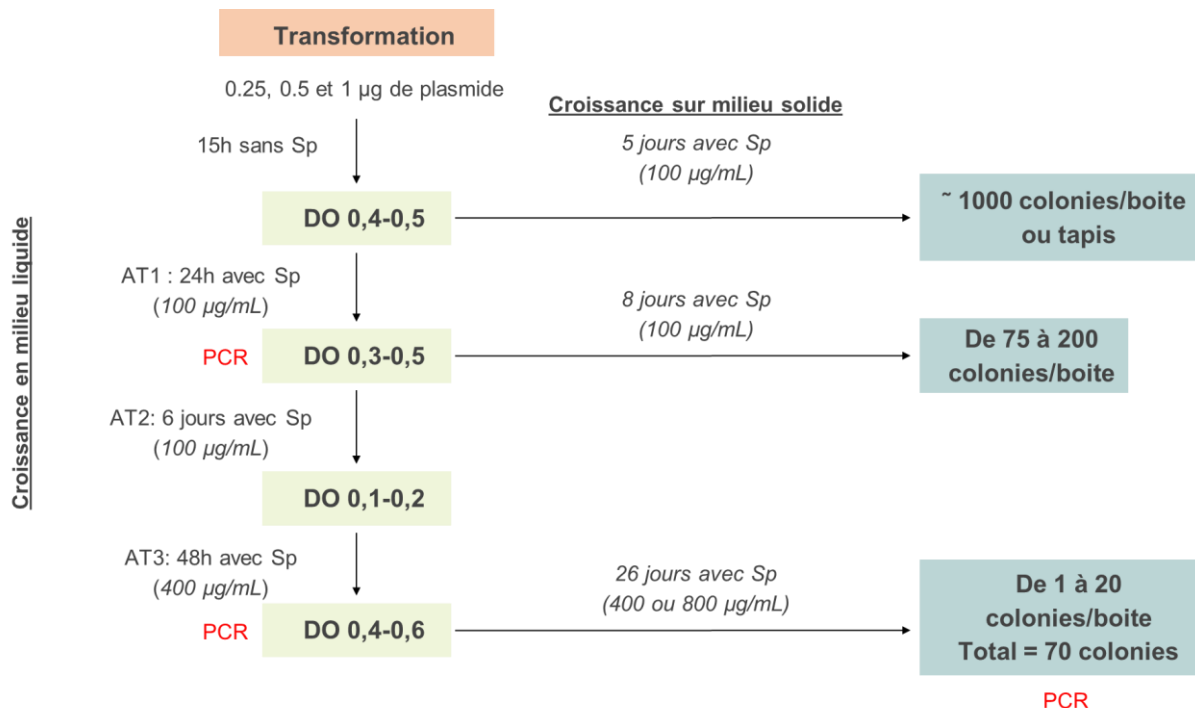
Des études préalables au laboratoire ont permis de faire une première sélection d'antibiotiques qui pourraient être utilisés pour la sélection de mutants recombinants. Notre choix s'est porté sur la spectinomycine et l'ampicilline. Ainsi, une cassette de résistance à la spectinomycine a été rajoutée à la place de la cassette de résistance au chloramphénicol dans le plasmide pNot19ΔPCM, vecteur qui sera utilisé pour la génération de mutant chez la souche BerOc1. La cassette codant pour la résistance à la spectinomycine remplacera les gènes à déléter chez la souche BerOc1 ; la sélection des cellules transformées se fera donc en présence de spectinomycine. De plus, le plasmide pNot19ΔPCM possède un gène codant la résistance à l'ampicilline. Lors d'une simple recombinaison homologue, pour laquelle l'ensemble du plasmide est intégré dans le génome, la cellule portera alors la résistance à l'ampicilline et celle à la spectinomycine. Ainsi, les cellules pour lesquelles l'échange d'allèle a eu lieu, devront être résistantes à la spectinomycine mais sensibles à l'ampicilline.

Des tests de croissance de la souche BerOc1 sauvage en milieu solide MM<sub>10</sub>PFYE en présence (i) de 100, 400 et 800 µg/mL de spectinomycine et, (ii) de 50, 100, 200, 400 et 800 µg/mL d'ampicilline ont été réalisés. Aucune croissance de la souche BerOc1 sauvage n'a été observée quel que soit l'antibiotique et quel que soit la concentration utilisée de ces derniers. Ainsi, une première sélection sur spectinomycine à 100 µg/mL permettra de sélectionner les cellules transformées, puis, un repiquage des clones sur ampicilline à 50 µg/mL informera sur la présence d'une simple (clones résistantes) ou une double (clones sensibles) recombinaison.

## 2.3. Mise au point du protocole de sélection et de criblage sur les souches transformées : génération de la souche $\Delta hgcB$

### 2.3.1. Etapes et paramètres clés dans le protocole de la sélection et du criblage

La délétion du gène *hgcB* a déjà été réalisée chez d'autres souches méthylantes (Parks *et al.* 2013). Nous savons ainsi que la perte de ce gène, même si elle entraîne une absence de méthylation du mercure chez ces souches, n'est pas létale. Afin de tester si notre protocole de génération de souches mutantes chez la souche BerOc1 est optimal, nous avons donc décidé de débiter par la délétion du gène *hgcB*. Tout d'abord, un procédé permettant de rendre les cellules compétentes a été réalisé. Deux lavages d'une culture fraîche en milieu de phase exponentielle ont été réalisés avec de l'eau MilliQ dégazée stérile (décrits dans le **Chapitre II**) et ont permis d'éliminer les composés du milieu de culture pouvant interférer lors de l'électroporation du plasmide, un des critères limitants à cette étape du protocole. Les cellules ont été récupérées dans 300  $\mu\text{L}$  d'eau MilliQ dégazée stérile. 50  $\mu\text{L}$  de cellules ont été transformés avec des quantités de plasmide différentes (0.25, 0.5 et 1  $\mu\text{g}$ ), selon les recommandations de Keller et ses collaborateurs (Keller *et al.* 2011) pour la transformation chez les *Desulfovibrio*. Après transformation, les cellules ont été récupérées dans un milieu MM<sub>10</sub>PFYE frais et l'étape de sélection et de criblage s'est déroulée comme schématisée sur la **Figure III-4** :



**Figure III-4** : Etapes de sélection et de criblage pour déléter le gène *hgcB* chez la souche BerOc1. Sp: spectinomycine (antibiotique de sélection des cellules transformées).

Pour vérifier la double recombinaison, l'approche par résistance à l'ampicilline a été abandonnée du fait de la croissance lente de colonies sur boîte. Une approche par PCR a été choisie. Pour cela, 3 couples d'amorces (**Tableau II-7**) ont été utilisés pour observer les différentes possibilités dans l'organisation génomique de la souche BerOc1 après transformation à savoir, une double recombinaison (génotype délété), aucune recombinaison (génotype sauvage) et des simples recombinaisons à partir soit de la région amont du gène *hgcB* soit de la région aval du gène *hgcB* (**Figure II-6**). Le premier couple d'amorces (Vérification 1) donne une amplification de 988 pb si une double recombinaison homologue ou une simple recombinaison au niveau de la région amont du gène *hgcB* est survenue et, ne donne lieu à aucune amplification si le génotype est resté sauvage ou si une simple recombinaison au niveau de la région aval du gène *hgcB* est survenue (**Tableau II-7**). Le second couple (Vérification 2) donne une amplification de 2308 pb si une double recombinaison homologue est survenue, de 656 pb si le génotype est resté sauvage et, de 2308 et 656 pb si des simples recombinaisons sont survenues. Finalement, le troisième couple (Vérification 3) donne une amplification de 699 pb si une double recombinaison homologue ou une simple recombinaison au niveau de la région aval du gène *hgcB* est survenue et, ne donne lieu à aucune amplification si le génotype est resté sauvage ou si une simple recombinaison au niveau de la région amont du gène *hgcB* est survenue.

#### 2.3.1.1. Effet de la concentration en plasmide sur l'obtention de doubles recombinants

Les résultats des vérifications de l'organisation génomique des cultures en milieu liquide (**Figure III-5**) et des colonies en milieu solide ainsi que le nombre de colonies obtenues ont permis d'évaluer les rendements de double recombinaison (et donc de souches mutantes délétées obtenues, **Tableau III-2**). Sur les trois quantités de plasmide différentes testées lors de la transformation, la condition ayant mis en jeu 0.25 µg de plasmide n'a abouti à aucun processus de recombinaison (simple ou double), alors que les conditions de transformation ayant mis en jeu 0.5 et 1 µg de plasmide ont affiché des profils *a minima* de simple recombinaison (**Figure III-5**). De plus, tandis que globalement la transformation avec 0.5 µg de plasmide n'a donné que 8% de double recombinants, celle avec 1 µg de plasmide aboutit à 55% de double recombinaison (**Tableau III-2**).

#### 2.3.1.2. Effet de la concentration en antibiotique : milieu liquide

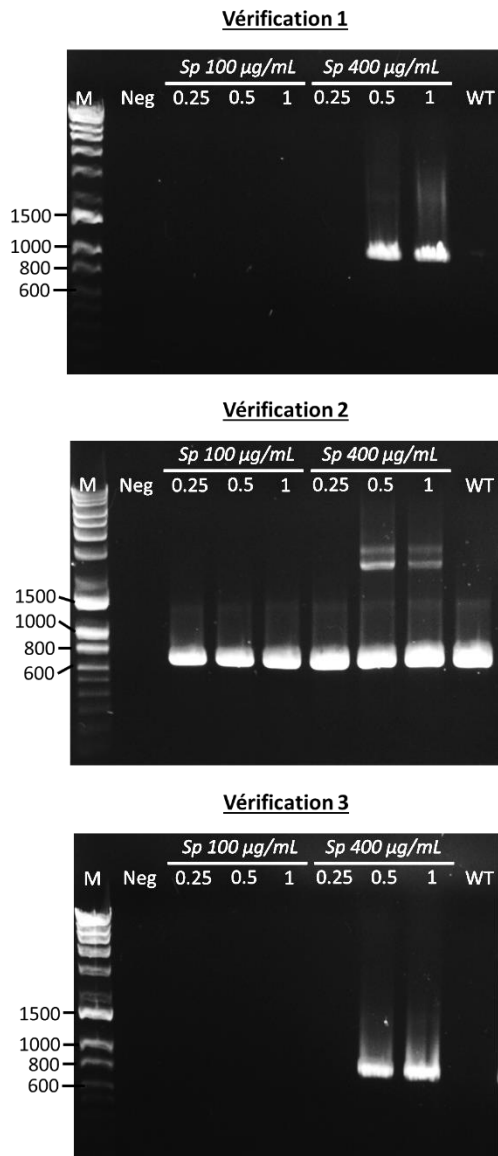
Deux aliquotes des cultures provenant des transformations avec respectivement 0.25, 0.5 et 1 µg de plasmide ont été prélevés ; le premier après croissance avec 100 µg/mL de spectinomycine, et le second après croissance avec 400 µg/mL de spectinomycine (**Figure III-5**).

Quelle que soit la concentration en plasmide utilisée pour la transformation, la double recombinaison homologue n'a pas eu lieu après croissance avec 100 µg/mL de spectinomycine (profil



d'amplification correspondant au génotype sauvage pour les trois vérifications) (**Figure III-5**). Le même constat a été fait sur la condition transformée avec 0.25 µg de plasmide et croissance avec 400 µg/mL de spectinomycine. En revanche, les cultures après transformation avec 0.5 et 1 µg de plasmide et sélectionnées avec 400 µg/mL de spectinomycine ont affiché un profil d'amplification correspondant à une simple ou double recombinaison. En effet, l'hétérogénéité de la culture ne nous permet pas de conclure sur le génotype de ces cultures et de déterminer si des simples recombinaisons sont survenues en amont du gène *hgcB* pour une partie de la population et en aval du gène *hgcB* pour l'autre partie de la population ou si, des doubles recombinaisons sont survenues dans une partie de la population et que le reste de la population est resté de génotype sauvage.

D'autre part, le nombre de colonies comptabilisées sur boîte nous a aussi informés sur l'effet de la concentration en antibiotique en milieu liquide pour l'obtention de cellules transformées (**Figure III-4**). En effet, les étalements provenant de la culture avec 400 µg/mL de spectinomycine sont beaucoup plus sélectifs que ceux provenant de 100 µg/ml, laissant espérer un nombre de simple ou double recombinants plus important.



**Figure III-5** : Vérification de l'organisation génomique des cultures transformées dans le but de déléter le gène *hgcB* du génome de BerOc1. Les vérifications 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux PCR permettant d'amplifier les fragments (i) amont *hgcB*- cassette spectinomycine, (ii) amont *hgcB*- aval *hgcB* et, (iii) cassette spectinomycine- aval *hgcB*. Sp: spectinomycine. 0.25, 0.5 et 1 : quantité en µg de plasmide utilisée lors de la transformation de la souche BerOc1. Neg: contrôle négative de PCR (l'eau remplace l'ADN dans la réaction de PCR). WT: ADN de la souche BerOc1 sauvage. M : Marqueur de taille (2log Ladder, Ozyme®).

### 2.3.1.3. Effet de la concentration en antibiotique : milieu solide

Lors du dernier repiquage en milieu liquide avec 400 µg/mL de spectinomycine (noté AT3), les cultures ont été étalées sur milieu solide MM<sub>10</sub>PFYE complémenté soit avec 400 µg/mL soit avec 800 µg/mL de spectinomycine. Le nombre de colonies obtenu par boîte est répertorié dans le **Tableau III-2** ainsi que les pourcentages de colonies selon leur organisation génomique. Les différentes concentrations en spectinomycine (400 et 800 µg/mL) ajoutées en milieu solide n'ont pas modifié de façon importante le nombre de clones obtenus, ni le taux de double recombinaison, quelle que soit la quantité de plasmide utilisée pour la transformation.

**Tableau III-2** : Caractéristiques des colonies de la souche BerOc1 obtenues suite à la transformation pour déléter le gène *hgcB*. DR: double recombinaison homologue (génotype délété). SR: Simple recombinaison homologue. WT : pas de recombinaison observée (génotype sauvage).

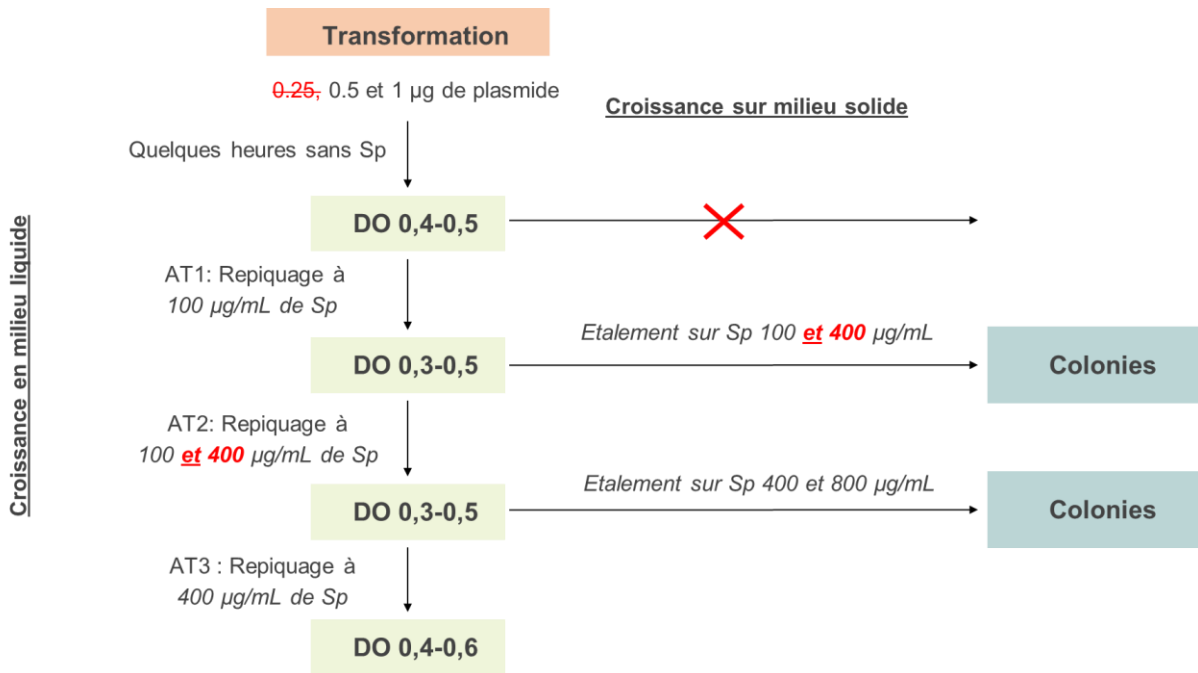
Quantité plasmide (en µg)	Concentration Spectinomycine en milieu liquide (en µg/mL)	Concentration Spectinomycine en milieu solide (en µg/mL)	Volume étalé de la culture (en µL)	Nombre de colonies	Rendement
0.25	400	400	100	0	- - -
0.25	400	400	250	1	DR : 0 % SR : 0 % WT : 100 %
0.25	400	800	250	0	- - -
0.5	400	400	100	2	DR : 0 % SR : 0 % WT : 100 %
0.5	400	400	250	12	DR : 0 % SR : 25 % WT : 75 %
0.5	400	800	250	13	DR : 15 % SR : 23 % WT : 62 %
1	400	400	100	0	- - -
1	400	400	250	15	DR : 60 % SR : 40 % WT : 0 %
1	400	800	250	23	DR : 52 % SR : 44 % WT : 4 %

### 2.3.2. Bilan des conditions de transformations retenues

Les tests visant à déterminer des conditions optimales pour l'obtention de souches mutantes délétées chez la souche BerOc1 ont révélés que :

- (i) La croissance sur milieu solide avec antibiotique ne sélectionne pas les cellules transformées si une sélection par l'antibiotique n'a pas précédemment été faite en milieu liquide.
- (ii) L'augmentation de la concentration en antibiotique lors des repiquages des conditions transformées favorise la sélection de cellules réalisant un processus de recombinaison homologue.
- (iii) L'augmentation de la concentration en antibiotique lors de l'étalement des conditions transformées favorise la sélection de cellules réalisant un processus de recombinaison homologue.
- (iv) Une quantité de plasmide importante est nécessaire pour obtenir des clones délétés (du moins pour le gène *hgcB*).

Ainsi, le protocole de génération de souches mutantes a été adapté suite à ces conclusions. Il est détaillé dans la **Figure II-5** et représenté dans la **Figure III-6** :



**Figure III-6** : Etapes de sélection et de criblage optimisées afin de délétér des gènes cibles chez la souche BerOc1. Sp: spectinomycine (antibiotique de sélection des cellules transformées).

### 2.3.3. Validation de la qualité du protocole optimisé : génération de nouvelles souches mutantes de délétion

Durant ma thèse, un protocole adapté a ainsi été réalisé pour générer deux autres souches délétées chez BerOc1 : une délétée pour le gène *arsR* (**Chapitre V**) et une délétée pour le cluster de gènes 470-467 (**Chapitre VI**). Les résultats sont présentés dans le **Tableau III-3** et indiquent que ce nouveau protocole a permis de générer les souches mutantes désirées.

De plus, trois tentatives ont été menées pour délétér le gène *arsR* avec la cassette spectinomycine inversée, ce qui permettrait au gène *hgcA* de ne pas être sous le contrôle du promoteur de la spectinomycine (**voir Chapitre V**). Malgré l'expérience acquise lors de génération des autres mutants et les modifications de protocole, aucun recombinant (simple ou double) n'a pu être obtenu à partir de clones ou de cultures durant ces tentatives suggérant fortement que la croissance de la cellule est affectée par cette structure génomique. La raison nous est inconnue.

**Tableau III-3** : Caractéristiques des colonies de la souche BerOc1 obtenues suite au protocole de génération de souche mutante optimisé. Les gènes cibles ont été le gène *arsR* et le locus de gènes 470-467. DR: double recombinaison homologue (génotype délété). SR: Simple recombinaison homologue. WT : pas de recombinaison observée (génotype sauvage).

Gène(s) cible(s)	Quantité plasmide (en µg)	Numéro du repiquage	Concentration Spectinomycine en milieu liquide (en µg/mL)	Concentration Spectinomycine en milieu solide (en µg/mL)	Volume étalé de la culture (en µL)	Nombre de colonies testées	Rendement
<i>arsR</i>	0.5	1	100	100	250 ou 750	12	DR : 50 % SR : 0 % WT : 50 %
	0.5	1	100	400	250 ou 750	12	DR : 42 % SR : 42 % WT : 16 %
	0.5	2	100	400	250 ou 750	12	DR : 100 % SR : 0 % WT : 0 %
	0.5	2	100	800	250 ou 750	12	DR : 100 % SR : 0 % WT : 0 %
	0.5	2	400	400	250 ou 750	12	DR : 100 % SR : 0 % WT : 0 %
	0.5	2	400	800	250 ou 750	12	DR : 100 % SR : 0 % WT : 0 %
	1	1	100	100	250 ou 750	6	DR : 17 % SR : 0 % WT : 83 %
	1	1	100	400	250 ou 750	12	DR : 50 % SR : 0 % WT : 50 %
Locus 470-467	0.5	3	400	400	250 ou 750	19	DR : 0 % SR : 0 % WT : 100 %
	0.5	3	400	800	250 ou 750	0	- - -
	0.5	3	400	400	250 ou 750	10	DR : 50 % SR : 20 % WT : 30 %
	0.5	3	400	800	250 ou 750	0	- - -
	1	3	400	400	250 ou 750	4	DR : 0 % SR : 0 % WT : 100 %
	1	3	400	800	250 ou 750	0	- - -
	1	3	400	400	250 ou 750	5	DR : 0 % SR : 0 % WT : 100 %
	1	3	400	800	250 ou 750	0	- - -

### 3. Conclusion

Ce chapitre a permis de mettre au point le premier protocole de génération de souches mutantes de délétion chez la bactérie méthylante *P. hydrargyri* souche BerOc1. Les modifications apportées lors des différentes expériences ont permis une optimisation. En effet, les rendements obtenus lors de la réalisation du protocole « test » (réalisé pour déléter le gène *hgcB*) ont été de 35% de double recombinaison pour 33% de simple recombinaison et 32 % de génotype resté sauvage alors que, grâce au protocole « optimisé » (réalisé pour déléter le gène *arsR*), 73% de double recombinaison pour 6% de simple recombinaison et 21 % de génotype resté sauvage ont été obtenues. Cependant, le même protocole « optimisé » n'a donné lieu qu'à 13 % de double recombinaison et, 5% de simple recombinaison et 82% de génotype resté sauvage pour réaliser la délétion du cluster de gènes 470-467. Ce changement drastique dans les rendements de souches délétées pourrait venir de la taille du cluster de gènes ciblé au cours de cette transformation. Il semblerait alors idéal de limiter la taille du gène/cluster cible à déléter.

L'obtention de trois souches délétées, à savoir une souche BerOc1  $\Delta hgcB$ , une souche BerOc1  $\Delta arsR$  et une souche BerOc1  $\Delta 470-467$ , a permis de mener des études sur le rôle de ces déterminismes génétiques dans la réponse au mercure par les bactéries méthylantes (**Chapitre V et Chapitre VI**).

D'autre part, dans ce volet, l'étude physiologique sur la bactérie modèle *P. hydrargyri* souche BerOc1 a permis de mettre en évidence des conditions de croissance favorables à l'étude de la méthylation du mercure. En effet, une production de biomasse similaire a été obtenue sous des conditions de croissances variables en matière de métabolismes et de source de soufre ajoutées. Une étude consacrée à déterminer le lien entre ces conditions et la méthylation du mercure est présentée dans le **chapitre IV**.



# CHAPITRE IV - Effet des sulfures exogènes et endogènes sur la production et l'export du méthylmercure chez les bactéries sulfato réductrices

## Préambule

Le soufre réduit présent dans les environnements anoxiques impacte la disponibilité du mercure et donc sa méthylation. Le chapitre III nous a permis de déterminer que différents métabolismes et différentes sources de soufre peuvent aboutir à une production de biomasse équivalente chez la bactérie sulfato réductrice *P. hydrargyri* BerOc1. Dans ce chapitre, l'objectif est de déterminer, pour des conditions de croissance conduisant à une production de biomasse similaires, l'impact des sulfures qu'ils soient produits au cours du métabolisme cellulaire (endogènes) ou qu'ils proviennent directement du milieu (exogènes) sur la méthylation et la distribution cellulaire du mercure ainsi que sur l'expression du gène *hgcA*. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article qui a été soumis dans le journal Environmental Science and Pollution Research (ESPR).





## Effect of exogenous and endogenous sulfide on the production and the export of methylmercury by sulfate reducing bacteria

Sophie Barrouilhet<sup>1</sup>, Mathilde Monperrus<sup>2</sup>, Emmanuel Tessier<sup>1</sup>, Bahia Khalfaoui-Hassani<sup>1</sup>, Rémy Guyoneaud<sup>1</sup>, Marie-Pierre Isaure<sup>1</sup>, Marisol Goñi-Urriza<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IPREM UMR 5254, Pau, France.

<sup>2</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IPREM UMR 5254, Anglet, France.

### Résumé

Le mercure (Hg) est un polluant préoccupant à la fois pour l'environnement et la santé ; sa forme méthylée, le méthylmercure (MeHg), étant une neurotoxine puissante. Les molécules soufrées jouent un rôle dans la production de MeHg par les microorganismes. Alors que les sulfures sont considérés comme limitant la méthylation du Hg, il a été démontré que le sulfate et la cystéine favorisent ce processus. Cependant, ces deux formes peuvent être converties de manière endogène par les microorganismes en sulfure. Dans cette étude, nous avons exploré l'effet du sulfure (produit par la cellule ou fourni de manière exogène) sur la méthylation du Hg. Pour cela, la bactérie *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* BerOc1 a été cultivée dans des conditions non-sulfidogènes avec ajout de cystéine et de sulfure ainsi que dans des conditions sulfidogènes. Ainsi nous avons démontré que la méthylation de Hg dépend de la concentration de sulfure dans la culture plutôt que de la forme initiale de soufre (cystéine, sulfure ou sulfate) ajoutée, et était indépendante de l'expression de *hgcA*. De manière intéressante, la production de MeHg a été maximale à 0.1-0.5 mM de sulfures. De plus, une corrélation positive entre le MeHg dans le milieu extracellulaire et la concentration de sulfure a été observée, suggérant un export facilité du MeHg par les sulfures et/ou une désorption plus importante de la cellule. Nous avons démontré que les sulfures (exogènes ou endogènes) jouent un rôle clé dans le contrôle de la méthylation du mercure, et devraient être pris en considération lors de l'étude sur l'impact du Hg dans les environnements naturels.

## 1. Introduction

Mercury (Hg) is of high concern due to its toxicity even at low concentration. It is persistent, highly volatile and is able to convert into highly toxic methylmercury (CH<sub>3</sub>Hg or MeHg), a strong neurotoxin, that is bioaccumulated and biomagnified across the aquatic food web (*Atchison and Hare 1994; Boudou and Ribeyre 1997; Farina et al. 2011; Rice et al. 2014*). Biotic methylation of Hg(II) by microorganisms is the primary source of MeHg (*Jensen and Jernelöv 1969*). The environmental and health risk associated to Hg contamination is highly dependent on environmental parameters that can either promote or limit the production of MeHg by microorganisms at the bottom of the food web. Current knowledge on Hg methylation is based on anaerobic microorganisms such as sulfate-reducing (SRB) (*Compeau and Bartha*) and iron-reducing bacteria (*Bravo et al. 2018; Kerin et al. 2006*) although other microbial groups (*Gilmour et al. 2013*), like methanogens, are also known to methylate Hg. Two genes encoding HgcA (a putative methyl transferase involved in methyl transfer to Hg(II)) and HgcB (a Fe-S cluster protein involved in HgcA electron recycling) are required for Hg methylation in these microorganisms (*Parks et al. 2013*). However, no link between the expression of these genes and the presence of Hg(II) has been so far observed (*Goñi-Urriza et al. 2015; Qian et al. 2018*).

In SRB, Hg methylation was shown to be higher under non-sulfide producing growth metabolism (non-sulfidogenic growth: fumarate respiration or fermentation) compared to sulfide producing condition (sulfidogenic growth: sulfate respiration) (*Bridou et al. 2011; Gilmour et al. 2011; Goñi-Urriza et al. 2015*). A negative linear correlation between sulfide and Hg methylation was also observed in a millimolar range of sulfide (*Benoit et al. 2001a*). The decrease of Hg methylation was attributed to a variation in predicted Hg-S complexes, specifically to a decrease of the dissolved neutral Hg-S species (HgS<sup>0</sup> and Hg(SH)<sub>2</sub><sup>0</sup>) (*Benoit et al. 1999a, b, 2001b; Drott et al. 2007*). These neutral forms are suspected to be more available for the cell than the charged species and their decrease negatively affect the Hg methylation. While, it is accepted that in SRB sulfides inhibit Hg methylation, it was observed recently in methanogens that sulfides at low concentration may promote mercury methylation (*Gilmour et al. 2018*), questioning the effect of sulfides concentration as variable on Hg methylation.

The effect of thiols on Hg methylation has been also investigated (*Adediran et al. 2019; Liu et al. 2016; Schaefer and Morel 2009; Thomas et al. 2020*), although they are present at much lower concentrations in aquatic environments compared to sulfate/sulfide (*Bouchet et al. 2018; Liem-Nguyen et al. 2017*). Among these thiols, cysteine (at concentrations between 1 and 100 µM) increased the production of MeHg (*Schaefer and Morel 2009*). However, cysteine degradation by microbes produces sulfides (*Graham et al. 2012a, b; Thomas and Gaillard 2017; Thomas et al. 2018*). These

produced sulfides are expected to limit Hg methylation, although they can form Hg-S complexes that favor Hg bio-uptake (Thomas and Gaillard 2017; Thomas et al. 2018). The effect of cysteine on Hg methylation is not yet fully understood. The sulfides produced by SRB from cysteine degradation (and not cysteine *per se*) could be responsible for the observed increase in Hg methylation.

Our hypothesis is that Hg(II) methylation is modulated by sulfide regardless of its origin; environmental or produced by the bacteria from cysteine or sulfate. However, whether sulfides enhance or inhibit Hg methylation may depend on the concentration of these molecules present in the cell environment. To support this hypothesis, in this work, (i) the potentials and rates of Hg methylation (ii) the partitioning between extracellular and cell-associated fractions of Hg species (to distinguish exported from the adsorbed/intracellular MeHg and Hg(II)) and, (iii) the *hgcA* expression were measured in the SRB *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* BerOc1 grown with different concentrations of added (exogenous) or produced (endogenous) sulfides along with various Hg concentrations. For this purpose, we used *P. hydrargyri* BerOc1 under three different conditions regarding sulfide contents: grown i) under fumarate respiration (non sulfidogenic metabolism) in the presence of a wide range of exogenous sulfide concentrations, ii) under fumarate respiration in the presence of cysteine and, iii) under sulfate reduction (sulfidogenic metabolism). Because Hg methylation depends on Hg(II) concentration (Gilmour et al. 2011; Isaure et al. 2020), the effect of sulfides (added or produced) was also examined at three different Hg(II) concentrations (from nM to  $\mu$ M). Our study provides new insights into the major role of sulfides on Hg methylation process at sulfide concentrations of environmental relevance, which is important to address the risks of Hg regarding the environmental and the health standpoints on this issue.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Culture medium composition and growth conditions

The SRB *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* strain BerOc1 was isolated from the Berre Lagoon sediments and it has been investigated for more than one decade for its capacity to methylate Hg (*Ranchou-Peyruse et al. 2004, 2009, 2018*). To perform all the experiments, the strain was grown anaerobically in the dark, at 37°C and pH 7.0 in the Brackish Multipurpose Medium (*Widdel and Bak 1992*) containing (per liter): 10 g NaCl, 1.2 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.25 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g KCl, 1 mL trace metal elements SL12B (*Overmann et al. 2004*), 1 mL Selenite-Tungstate, 2.38 g HEPES, 1 mL V7 vitamins solution (*Trüper and Pfennig 1992*) and 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Selenite-Tungstate solution is composed of 0.5 g NaOH, 2 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and 4 mg Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O per liter and SL12B solution is composed of 300 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1.1 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 190 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 50 mg MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 42 mg ZnCl<sub>2</sub>; 24 mg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 18 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O and 2 mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O per liter. The final concentration on sulfur compounds in the basal medium is 3.6 μM.

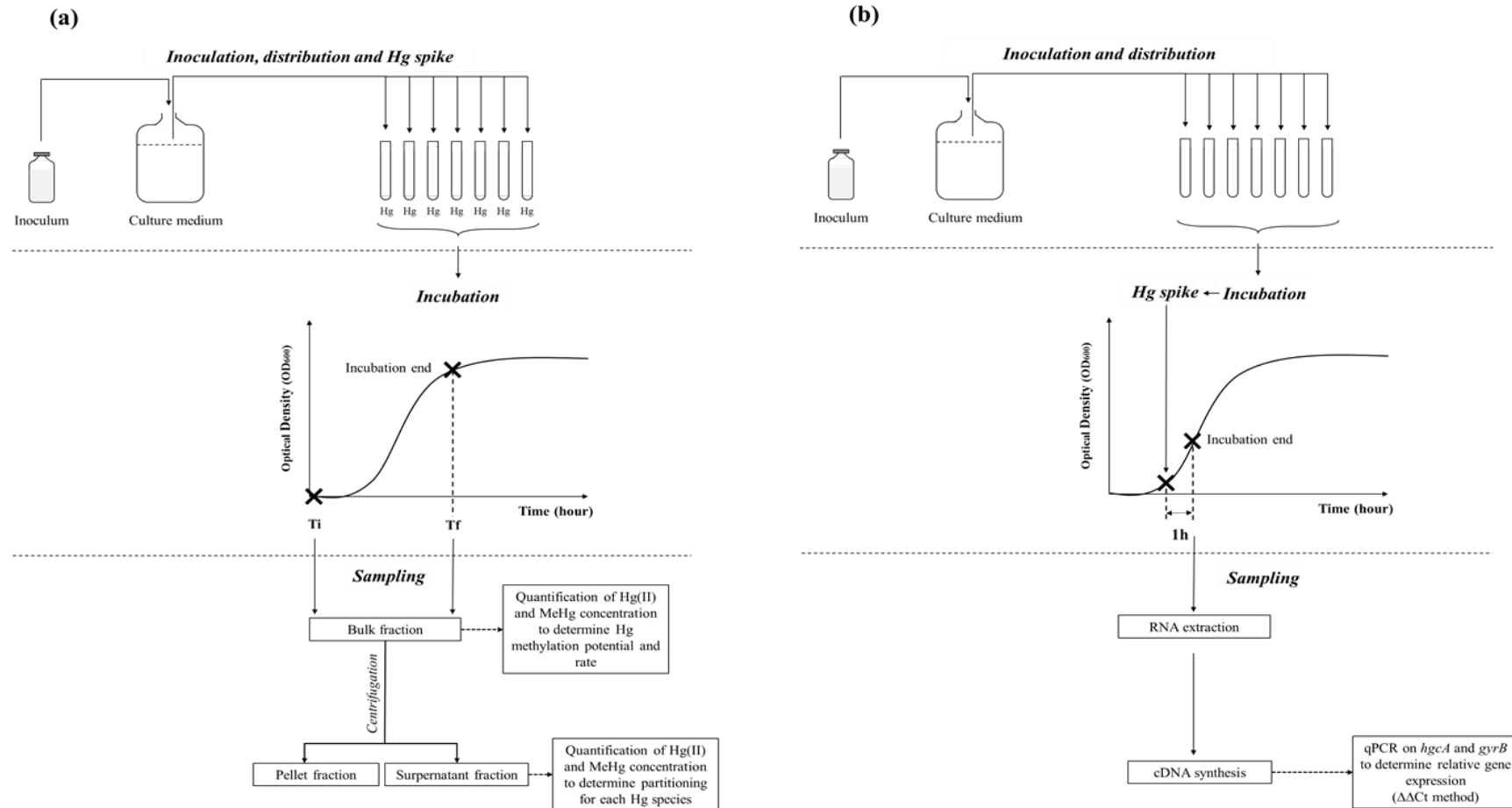
Cultures were performed with 40 mM pyruvate as carbon source and either with 40 mM sulfate (sulfidogenic condition) or with 40 mM fumarate (non-sulfidogenic metabolism). Under non-sulfidogenic growth, 0.1 mM cysteine, or a wide range of sulfide (Na<sub>2</sub>S) concentration (from 0.0005 to 5 mM) was added as sulfur source. In growth conditions requiring sulfides addition, sulfides were supplemented 24 hours before the inoculation enabling equilibration with the culture medium maintained in anoxic/reduced condition. Cultures were inoculated at 0.03 optical density (OD) measured with a spectrophotometer at 600 nm, from pre-cultures under the same growth condition. Growth was then monitored by OD, and biomass production ( $\Delta OD_{600}$ ) was calculated as [OD (Tf) – OD (Ti)], where Tf corresponds to the end of the exponential phase and Ti to the time of the inoculation of the strain. Growth rate ( $\mu$  (h<sup>-1</sup>)) was obtained by dividing the produced biomass during the exponential phase ( $\ln(\text{biomass production})$ ) by time of the exponential growth phase.

Cells numbering was performed by flow cytometry (BD Accuri C6 analyser, TBMCORE). Aliquots of 1.6 mL of cultures were stored at -80°C in 5 % (v/v) filtered formaldehyde until cells counting. Samples were tagged with 10X SYBR® (Invitrogen) for 15 minutes in the dark, and immediately counted using TruCounts beads (BD). Sulfide quantification was performed by Cline (*Cline 1969*) method using a spectrophotometer at 670 nm and adapted to growth conditions and sulfide concentrations expected. The detection limit was 0.92 μM.

## 2.2. Hg methylation assays and Hg species partitioning

All methylation assays were conducted in autoclaved Hungate tubes pre-washed by ultrasonication in 10 % HNO<sub>3</sub> and HCl baths, and rinsed with ultrapure Milli-Q water. Hg(II) stock solution (5 mM HgCl<sub>2</sub> in 1% HCl) was used to yield final concentrations of 0.05 μM, 2 μM or 5 μM.

In order to avoid heterogeneity, media flushed with N<sub>2</sub> were inoculated with BerOc1 strain and distributed in tubes containing 100 μL of Hg(II) at the appropriate concentration. The fully filled tubes were closed with PTFE coated butyl stoppers, mixed and incubated in the dark at 37°C. Inoculation and Hg addition were thus performed simultaneously (**Online Resource IV-1a**). Quantification of Hg species (i.e. Hg(II) and, methylmercury, MeHg), sulfide concentration and cell numbering in the bulk culture were determined at both Ti (just after inoculation and Hg addition) and Tf (at the end of the exponential growth phase). For Hg(II) and MeHg quantification (bulk fraction), an aliquot of 500 μL of the cell culture was collected and digested in 50 % (v/v) of 6N nitric acid (HNO<sub>3</sub>). The remaining part of the cultures was centrifuged (30 min, 6000 g at 4°C) to separate supernatant and pellet fractions (**Online Resource IV-1a**). 500 μL of the supernatant was collected and digested in 50 % (v/v) 6N HNO<sub>3</sub> (extracellular fraction). Samples were stored at 4°C before the analyses. Abiotic controls without cells were performed under the same experimental conditions for the three different culture media.



**Online Resource IV-1** : Graphical illustration of key steps of **(a)** both Hg methylation and partitioning and **(b)** *hgcA* gene expression. **(a)** Cultures were inoculated and spiked with mercury Hg simultaneously. Immediately after inoculation and Hg spike (Ti) and at the end of the exponential growth phase (Tf), samples were harvested to measure Hg(II) and MeHg concentration. After sampling to measure Hg(II) and MeHg in the bulk fractions, cultures were centrifuged to separate pellet and supernatant fractions. **(b)** For *hgcA* expression assays, Hg was spiked in growing cells, at mid exponential growth phase. Hg incubation were performed for one hour. Cells were harvested in a solution to protect against RNA degradation. RNA was extracted and cDNA synthesized to consecutively perform qRT-PCR. Ti: Initial sampling time. Tf: final sampling time.

Hg(II) and MeHg concentrations were measured by capillary gas chromatography (GC TriPlus™ RSH™, Thermo Scientific) connected to an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICPMS, X2-series, Thermo Electron) (Bridou *et al.* 2011; Pedrero *et al.* 2012). Quantification of each Hg species concentration was performed by isotopic dilution (Monperrus *et al.* 2005). Briefly, a known amount of fractions (bulk or supernatant fractions) was buffered at pH 3.9 using a 0.1 M acetic acid/acetate buffer and then spiked with a known quantity of isotopically enriched Hg species (<sup>199</sup>Hg(II) and <sup>201</sup>MeHg). Hg(II) and MeHg were ethylated using 5% (v/v) NaBEt<sub>4</sub> and extracted in iso-octane by shaking vigorously during 20 min. Organic phase containing Hg species was collected and analyzed by GC-ICPMS. Each fraction was measured two times.

Hg methylation potential and Hg species partitioning were determined in the same batch culture. Methylation potentials were calculated in the bulk cultures by dividing MeHg concentration produced (Ti -Tf) by total Hg concentration measured at Ti. Partitioning of each Hg species (Hg(II) and MeHg) between cell-associated and extracellular fractions was calculated by dividing concentrations of Hg species measured in the supernatant (extracellular fraction) by concentrations of Hg species measured in the bulk fraction x100. Percentage of Hg species in the pellet (i.e. cell-associated fraction (sorbed and intracellular)), were determined by subtracting the percentage of Hg species in the supernatant fraction to 100%.

Spearman's correlation between the percentage of MeHg in extracellular fraction and sulfide concentrations was calculated with R software.

### 2.3. *hgcA* expression assays and analyses

*hgcA* expression assays were performed under various Hg(II) concentration exposures in non sulfidogenic condition with either cysteine or sulfide (0.1 mM). Growth was performed as previously described except that (i) Hg(II) was added at mid-exponential growth phase in the anaerobic chamber and, (ii) Hg incubation was carried out for one hour (**Online Resource IV-1b**). Based on Hg methylation results, *hgcA* expression level was measured at Hg(II) concentrations of 0.05 μM, 2 μM and 5 μM with sulfide and, 0.005 μM, 0.05 μM, 0.5 μM, 2 μM with cysteine. Controls without Hg(II) were conducted to determine the basal *hgcA* expression.

After 1 hour of incubation with Hg(II), cultures were stopped with 3% (v/v) of RNA protect solution (5 % phenol saturated with Na acetate 1M pH 5.5 into 95 % ethanol). Five mL of the culture were centrifuged (10 min, 5000 g) and total RNA was extracted using EXTRACT-ALL® Kit (eurobio) according to the kit protocol guidelines. RNA fraction was purified by removing DNA contamination with TURBO DNase RNase-free™ Kit (Ambion) and quantified with Quant-iT RNA Assay Kit



(Invitrogen™) and Synergy HTX multi-mode reader (BioTek). Purified RNA was diluted at 20 ng/μL and cDNA was synthesized using M-MLV-RT (Invitrogen).

*hgcA* transcripts were quantified by qRT-PCR (quantitative Reverse-transcription PCR) in a Light Cycler 480 (Roche) using the DyNAmo™ ColorFlash SYBR® Green qPCR Kit (Finnzyme), in a final volume of 20 μL with 1 μL of cDNA and the appropriate primers (Goñi-Urriza et al. 2015). *gyrB* gene expression was used as housekeeping gene expression for normalization (Goñi-Urriza et al. 2015). *hgcA* and *gyrB* primers were specifically designed to amplified *hgcA* and *gyrB* genes in *P. hydrargyri* strain BerOc1 in a previous study (Goñi-Urriza et al. 2015). Real time PCR was carried out with an initial denaturation of 7 min at 95°C followed by 45 cycles of 10 sec at 95°C and 20 sec at 60 °C. Melt characteristics of amplicons were checked at the end of the amplification. Assays were performed in three independent cultures (biological replicates) each one measured three times (technical replicates). A reaction mixture with DNA-free RNA was run as a control for detection of DNA contamination. Amplification efficiencies of *hgcA* and *gyrB* primers were determined with standard curves as previously described (Goñi-Urriza et al. 2015), and were of 1.90 and 1.95, respectively.

*hgcA* induction level was determined following double delta Ct (Cycle Threshold) procedure using *gyrB* expression as reference. Briefly it consists of: (i) a first normalization of the target gene expression (*hgcA*) with a reference gene expression (*gyrB*) and (ii) a second normalization of the Ct in the induced condition (growth with Hg(II)) with the Ct of the non-induced condition (growth without Hg(II)).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Hg methylation is driven by sulfides

The SRB *P. hydrargyri* strain BerOc1, able to use sulfate or fumarate as electron acceptors, was used in this study to determine the link between MeHg production and sulfide. The production of MeHg was assessed at three different Hg(II) concentrations (0.05, 2 and 5  $\mu\text{M}$  of Hg(II)) under non-sulfidogenic growth (Pyruvate (Pyr)/Fumarate) with cysteine or sulfide added exogenously (0.1 mM) and under sulfidogenic growth (Pyr/Sulfate). The chosen cysteine and sulfide concentrations correspond to the minimal sulfur concentration needed for optimal growth without Hg(II) (**Online Resource IV-2a**). The Hg(II) concentrations were chosen from a previous study that showed a maximum of mercury methylation rate at 5  $\mu\text{M}$  of Hg(II) (*Isaure et al. 2020*). Sulfide concentrations measured at the end of the growth in the presence of cysteine ( $0.010 \pm 0.003$  -  $0.020 \pm 0.005$  mM, **Table IV-1**) are consistent with previous sulfide concentrations reported for degradation of cysteine by bacteria, including the well-known Hg methylators *Geobacter sulfurreducens* PCA and *Pseudodesulfovibrio mercurii* ND132 (*Graham et al. 2012a, b; Thomas and Gaillard 2017; Thomas et al. 2018*). Moreover, for a given growth condition, addition of Hg(II) did not impact neither bacterial growth nor sulfide concentration (**Table IV-1, Online Resource IV-2d-f**).

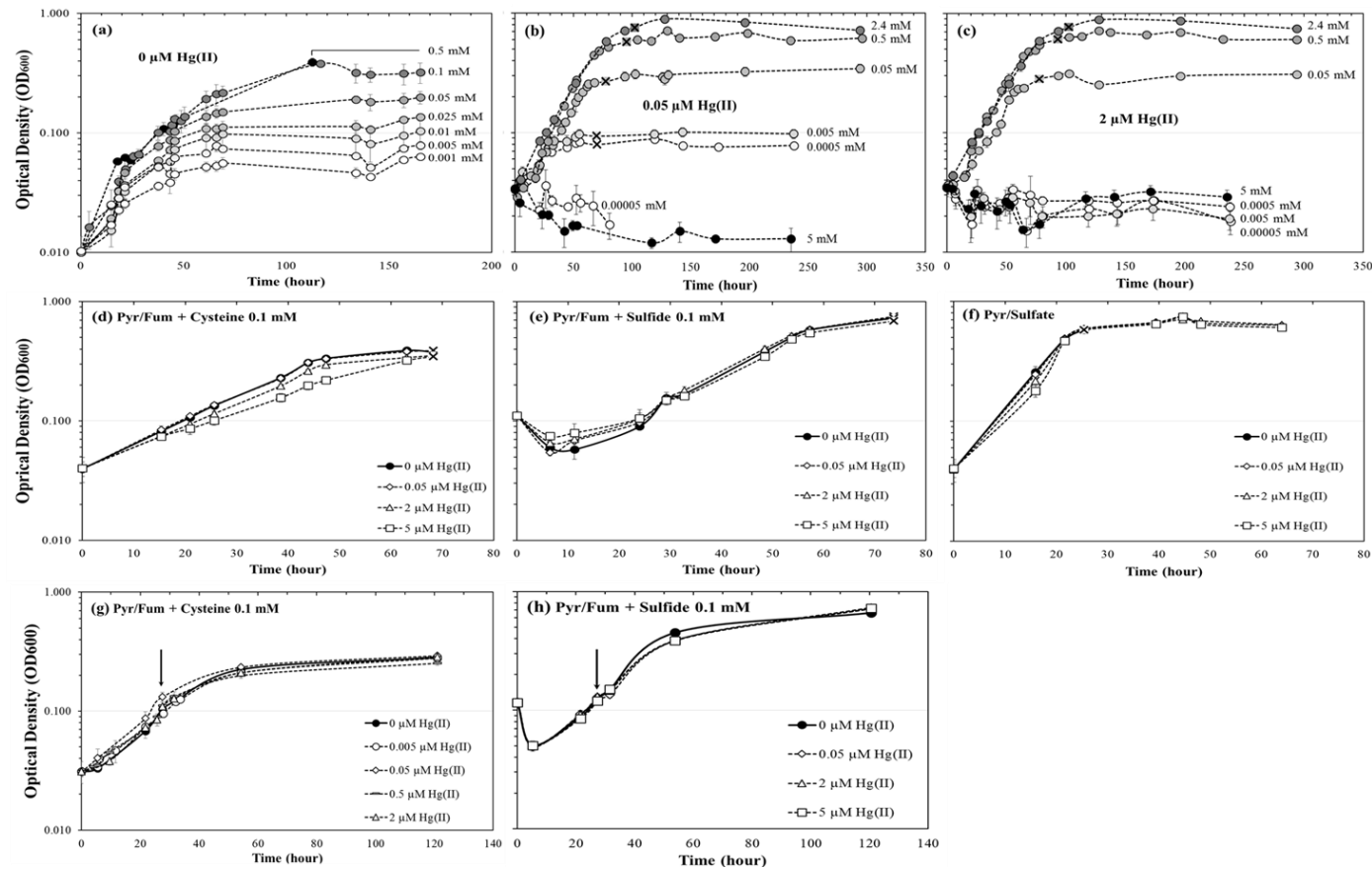
Interestingly, the Hg(II) methylation potential under non-sulfidogenic growth with 0.1 mM sulfide was higher than in the other tested conditions, regardless of the Hg(II) concentration (**Figure IV-1a, Online Resource Table IV-1**). While a progressive decrease of Hg methylation potential over an increase of Hg(II) concentrations was detected under sulfidogenic growth, a drastic decline over 0.05  $\mu\text{M}$  was noticed under non-sulfidogenic growth with cysteine (from 15% to < 1%) (**Figure IV-1a**). However, under non-sulfidogenic growth with sulfide only a moderate decline was observed above 2  $\mu\text{M}$  Hg(II). Furthermore, the maximal rate of production of MeHg per cell ( $\tau_{\text{max}}$  calculation) is between 50 and 100 fold higher (**Table IV-1**) in presence of sulfide. The saturation of MeHg production (from  $K_{\text{Michaelis}}$  calculation) of BerOc1 grown with sulfide is reached at higher Hg(II) concentrations than when grown with sulfate (10 times lower than sulfide) or cysteine (1000 times lower than sulfide). These results indicated that the Hg methylation mechanism is saturable in the various cell growth conditions tested as previously described under a different growth condition than tested here (*Isaure et al. 2020*). Abiotic controls confirmed that measured Hg methylation was a fully biotic process and that the observed differences between growth conditions were not related to differences in abiotic Hg methylation (**Online Resource IV-3**). Furthermore, our study reported for the first time that the concentration at which this saturation is reached and the capacity of a single cell to produce MeHg depends on growth conditions.

Importantly, Hg methylation potentials were higher with 0.1 mM of sulfide, compared to cysteine condition (expected to favor Hg methylation (Schaefer and Morel 2009)) regardless of the Hg(II) concentration added (**Figure IV-1a**). However, in presence of cysteine around 10  $\mu$ M of sulfides were measured (**Table IV-1**). We thus hypothesized that the variation observed in Hg methylation depends on sulfide concentration (added or produced) rather than directly on the added cysteine. Therefore, we investigated Hg(II) methylation at varying concentration of sulfides (from 0.0005 to 5 mM). The range of sulfide concentrations were chosen following the measured sulfide production under cysteine and sulfate reduction growth (**Table IV-1**). Two Hg(II) concentrations, 0.05 and 2  $\mu$ M Hg(II) (where the differences between Hg(II) potential are the most prominent (**Figure IV-1a**)), were used to test the effect of sulfide concentration on Hg(II) methylation potentials. Addition of low exogenous sulfide concentrations (< 0.05 mM) limited BerOc1 growth only at 2  $\mu$ M of Hg (II) while sulfide above 2 mM was toxic for the growth, regardless of the Hg(II) concentration added (**Table IV-1, Online Resource IV-2b-c**). At 0.05  $\mu$ M of Hg(II), Hg methylation potentials increased with the increase of sulfide concentrations up to 0.5 mM, and then decreased at higher sulfide concentrations (**Figure IV-1b**). The same pattern was observed with 2  $\mu$ M of Hg(II) with a maximal Hg methylation reached at 0.1 mM of sulfides (**Figure IV-1c**). Overall, our data showed that sulfide at concentration ranged from 0.1 to 0.5 mM favors Hg methylation in *P. hydrargyri* BerOc1 and that lower sulfide concentration (< 0.1 mM) and higher sulfide concentration (> 0.5 mM) from that range are disadvantageous to the process. Several previous studies concluded that the presence of sulfide has an inhibitory effect on Hg methylation (Benoit *et al.* 1999a, 2001a). The inhibitory effect on Hg methylation at high sulfide concentration was for instance observed in *Desulfobulbus propionicus* (1pr3) by testing sulfide concentration from 0.05 to 2 mM (Benoit *et al.* 2001a). However, because only one concentration of sulfide below 0.1 mM was tested in this study, the beneficial effect of sulfide on Hg methylation was not noticed on the plot. Additionally, an optimum of sulfide concentration (between 0.01 and 0.1 mM) favoring Hg methylation has been observed in methanogens (Gilmour *et al.* 2018). The modeling linking sulfate concentration to MeHg production in natural ecosystems also identified a similar pattern, with an optimum of Hg methylation ranging from 0.2 to 0.5 mM of sulfate (Gilmour and Henry 1991). Since the optimal concentration of sulfide favoring Hg methylation in our study is close to the optimal concentration of sulfate favoring Hg methylation in Gilmour and Henry study (Gilmour and Henry 1991), we can suggest that sulfide is the main parameter here favoring Hg methylation, since sulfate can be reduced to sulfide.

The mechanism by which S containing molecules favors Hg methylation is far from being understood. Thomas *et al* (Thomas *et al.* 2020), identified Hg-S complexes in non-growing *Geobacter sulfurreducens* PCA (a Hg(II) methylating bacterium) incubated with cysteine. In this study, the addition

of cysteine also increased Hg(II) methylation and the authors suggested that the degradation of cysteine produces sulfide that forms Hg-S complexes and those complexes would favor Hg(II) methylation through a facilitated Hg uptake, as demonstrated in *E. coli* (Thomas et al. 2019). Unfortunately, sulfide production by *G. sulfurreducens* PCA was not provided. Further spectroscopic analysis and characterization of Hg-S complexes under a range of sulfide concentrations would shed light on the role of sulfide at 0.1-0.5 mM in the production of Hg-S forms and the increase of Hg(II) methylation.

Overall, how sulfide, sulfate (Gilmour and Henry 1991) and cysteine (Schaefer and Morel 2009) affect Hg methylation depends mainly on their concentrations. In marine environments, sulfate can be found at concentrations up to 20 mM (Jørgensen et al. 2019) and cysteine at fM to nM concentrations (Joe-Wong et al. 2012; Liem-Nguyen et al. 2017; Bouchet et al. 2018; Adediran et al. 2019). At those concentrations, sulfate and cysteine are not expected to play a major role in MeHg production (Gilmour and Henry 1991; Schaefer and Morel 2009). However, other S-containing molecules, especially those involved in the sulfur biogeochemical cycle (sulfide, sulfite, thiosulfate, and polysulfide), reach concentrations between 0.1 and 1 mM in marine and freshwater sediments (Findlay 2016; Findlay and Kamysny 2017; Gentès et al. 2017) and can all be transformed into sulfide by reduction or degradation. Here, we reported an increase of Hg methylation at sulfide concentration encountered in the environment. We hypothesize that in natural environments, sulfate will enhance Hg methylation because it favors SRB metabolism but sulfide (regardless of its origin, exogenous or endogenous) will govern the extent of Hg methylation potentials.



**Online Resource IV-2** : Growth ( $OD_{600}$ ) of batch cultures used to determine, **(a)** minimal sulfur concentration to provide optimal growth under non sulfidogenic growth condition, **(b-f)** Hg methylation and partitioning of Hg species and, **(g-h)** *hgcA* gene expression under different growth conditions and Hg(II) concentrations. For all the growths, pyruvate (Pyr) was used as carbon source. Fumarate (Fum) was used as electron acceptor to provide non-sulfidogenic (Pyr/Fum) metabolisms **(a-e, g-h)** and sulfate **(f)** was used as electron acceptor to provide sulfidogenic growth (Pyr/Sulfate). Substrates were used at 40 mM except for panel **(a)** for which pyruvate and fumarate were used at 20 mM. Hg spike was performed at the beginning of the growth, otherwise, an arrow indicates Hg addition. Initial sampling ( $T_i$ ) was carried out just after Hg spike ( $< 1$  min). Final sampling ( $T_f$ ) is indicated as crossing points (end of the exponential growth phase) except for panels **(g)** and **(h)** for which the samples were taken 1 hour after the addition of Hg.

**Table IV-1** : Sulfide concentration, biomass production, growth rate, Hg methylation rate ( $\tau$ ), maximal Hg methylation rate ( $\tau_{\max}$ ) and, Hg(II) concentrations to reach half of the maximal methylation rates ( $K_{\text{Mic}}$ ) measured/calculated in *P. hydrargyri* strain BerOc1 grown under non-sulfidogenic (Pyr/Fum) conditions (with cysteine or sulfide) or under sulfidogenic (Pyr/Sulfate) condition

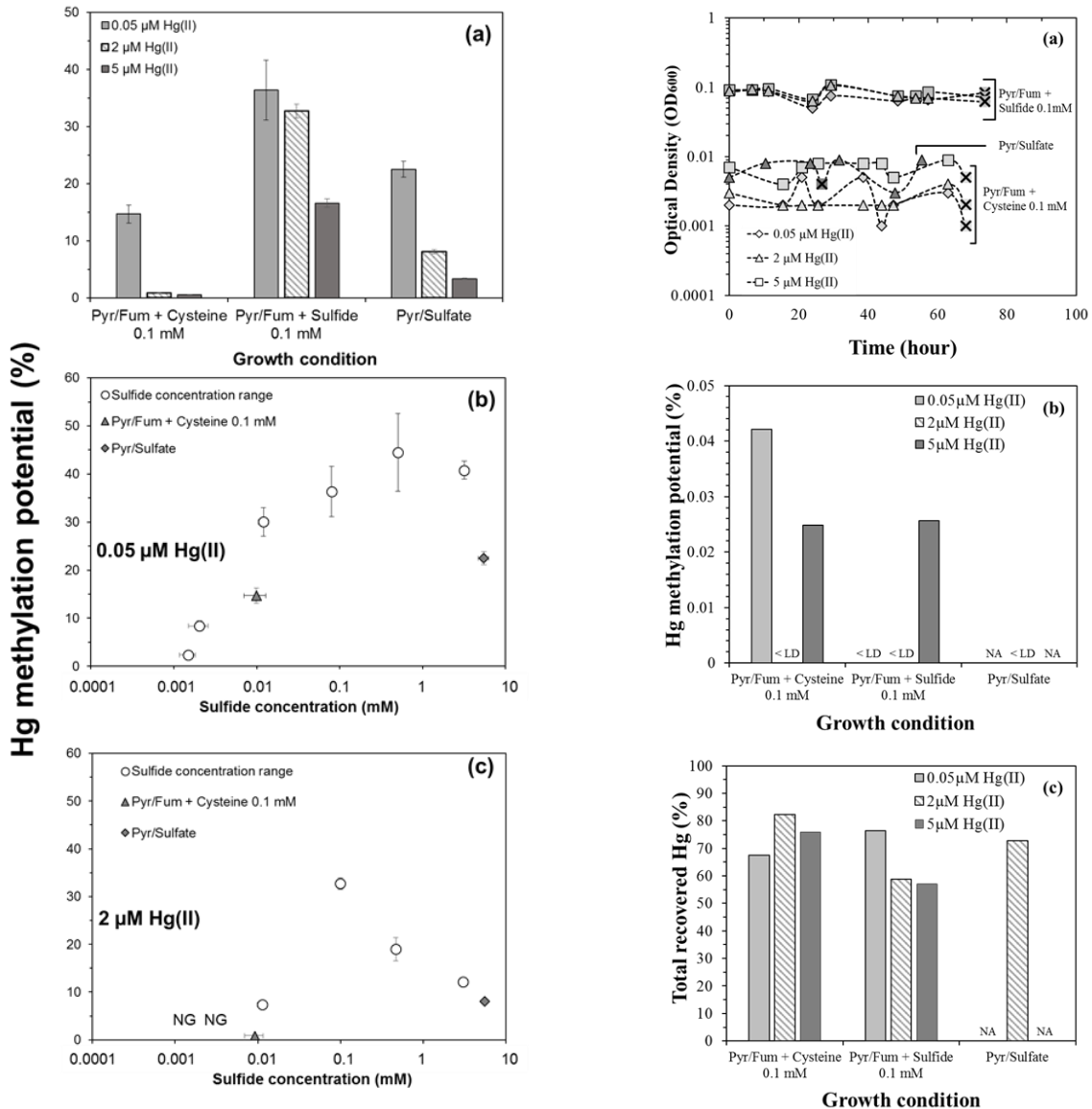
Growth condition	Total added Hg ( $\mu\text{M}$ )	Exogenously added sulfide (mM)	Total measured sulfide <sup>a</sup> (mM)	Biomass production <sup>a</sup> ( $\Delta\text{OD}_{600}$ )	Growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )	Hg methylation rate <sup>a</sup> $\cdot 10^{-21}$ ( $\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) $\tau$ <sup>b</sup>	$\tau_{\max}$ <sup>a</sup> $\cdot 10^{-21}$ <sup>c</sup> ( $\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	$K_{\text{Mic}}$ <sup>d</sup> ( $\mu\text{M}$ )
Pyr/Fum + Cysteine 0.1 mM (Non sulfidogenic)	0	0	0.02 $\pm$ 0.005	0.35 $\pm$ 0.014	0.05 $\pm$ 0.002	-		
	0.05	0	0.01 $\pm$ 0.003	0.35 $\pm$ 0.014	0.05 $\pm$ 0.000	0.41 $\pm$ 0.044	1.11	0.1
	2	0	0.01 $\pm$ 0.002	0.31 $\pm$ 0.011	0.04 $\pm$ 0.001	0.96 $\pm$ 0.119		
	5	0	0.02 $\pm$ 0	0.31 $\pm$ 0.013	0.04 $\pm$ 0.003	1.16 $\pm$ 0.019		
Pyr/Fum + Sulfide 0.1 mM (Non sulfidogenic)	0	0.1	0.11 $\pm$ 0.018	0.47 $\pm$ 0.014	0.05 $\pm$ 0.003	-		
	0.05	0.1	0.08 $\pm$ 0.008	0.47 $\pm$ 0.030	0.05 $\pm$ 0.003	0.06 $\pm$ 0.009	111.11	89
	2	0.1	0.10 $\pm$ 0.002	0.48 $\pm$ 0.016	0.05 $\pm$ 0.003	2.93 $\pm$ 0.109		
	5	0.1	0.09 $\pm$ 0.013	0.44 $\pm$ 0.002	0.04 $\pm$ 0.005	4.48 $\pm$ 0.204		
Pyr/Sulfate (Sulfidogenic)	0	0	5.15 $\pm$ 0.563	0.44 $\pm$ 0.019	0.12 $\pm$ 0.002	-		
	0.05	0	5.49 $\pm$ 0.817	0.45 $\pm$ 0.022	0.12 $\pm$ 0.002	0.09 $\pm$ 0.005	2.00	1
	2	0	5.53 $\pm$ 0.081	0.45 $\pm$ 0.016	0.12 $\pm$ 0.004	1.33 $\pm$ 0.062		
	5	0	5.34 $\pm$ 0.445	0.43 $\pm$ 0.014	0.11 $\pm$ 0.001	1.45 $\pm$ 0.040		
Pyr/Fum + Sulfide (Range of sulfide)	0.05	0.0005	0.0015 $\pm$ 0.0003	0.05 $\pm$ 0.003	0.02 $\pm$ 0.000	0.46 $\pm$ 0.049		
	0.05	0.005	0.002 $\pm$ 0.0005	0.06 $\pm$ 0.006	0.03 $\pm$ 0.003	1.16 $\pm$ 0.144		
	0.05	0.05	0.012 $\pm$ 0.002	0.25 $\pm$ 0.042	0.04 $\pm$ 0.007	2.17 $\pm$ 0.213		
	0.05	0.5	0.50 $\pm$ 0.051	0.51 $\pm$ 0.067	0.04 $\pm$ 0.004	0.27 $\pm$ 0.040	-	-
	0.05	2.4	3.19 $\pm$ 0.050	0.70 $\pm$ 0.012	0.06 $\pm$ 0.001	0.06 $\pm$ 0.003		
	0.05	4.9	10.05 $\pm$ 0.598	0	0	0		
	2	0.0005	< LD	0	0	0		
	2	0.005	< LD	0	0	0		
	2	0.05	0.011 $\pm$ 0.0015	0.23 $\pm$ 0.046	0.04 $\pm$ 0.010	13.18 $\pm$ 1.302	-	-
	2	0.5	0.47 $\pm$ 0.054	0.52 $\pm$ 0.088	0.04 $\pm$ 0.004	5.98 $\pm$ 0.767		
2	2.4	3.02 $\pm$ 0.291	0.72 $\pm$ 0.027	0.03 $\pm$ 0.005	1.08 $\pm$ 0.027			
2	4.9	9.67 $\pm$ 0	0	0	0			

<sup>a</sup> Sulfide concentration in cultures was measured at the end of the exponential growth phase (Tf). Limit of Detection (LD). Biomass production ( $\Delta\text{OD}_{600}$ ) was determined by subtracting optical density measured at the end of the exponential growth phase (Tf) from OD measured at the time of strain inoculation (Ti). Standard deviations were calculated from at least three independent replicates.

<sup>b</sup> : Hg(II) Methylation rates ( $\tau$ )  $\tau = \frac{([\text{MeHg}]_{Tf}) - [\text{MeHg}]_{Ti}}{\zeta_{Tf} * \text{Incubation time}}$  where the MeHg concentration produced (Tf - Ti) was divided by  $\zeta$  (concentration of cells produced during growth (Tf-Ti)) and the incubation time with Hg(II).

<sup>c</sup>  $\tau_{\max}$  : Maximal Hg methylation rate was calculated based on a Double-Reciprocal or *Lineweaver-Burk* Plot  $\frac{1}{\tau} = f\left(\frac{1}{\text{Hg(II) concentration}}\right)$

<sup>d</sup>  $K_{\text{Mic}}$  : Michaelis-Menten constant represents the Hg(II) concentration to reach half of the maximal methylation rate determined by the *Lineweaver-Burk* Plot.



**Figure IV-1:** Hg methylation potential (%) of *P. hydrogyri* BerOc1. **(a)** Hg methylation at 0.05, 2 and 5 μM Hg(II) under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with either 0.1 mM cysteine or 0.1 mM sulfide or under sulfidogenic condition (Pyr/Sulfate). Hg methylation at either **(b)** 0.05 μM or **(c)** 2 μM of Hg(II) under Pyr/Fum with a range of sulfide concentrations (○ added exogenously or measured in the cultures). Inoculation and Hg(II) addition were performed at the same time. Pyruvate (Pyr) was used as carbon source at 40 mM for all the growth conditions and, sulfate and fumarate (Fum) were added at 40 mM as electron acceptor to promote sulfidogenic (Pyr/Sulfate) or non-sulfidogenic (Pyr/Fum) metabolisms, respectively. MeHg potentials (% of total recovered Hg converted to MeHg) were measured at the end of the exponential phase (Tf). Error bars represent the standard deviations of three independent replicates. NG: No growth.

**Online Resource IV-3:** Abiotic controls **(a)** growth curves (OD<sub>600</sub>), **(b)** Hg methylation potentials (%) and, **(c)** total recovered Hg (%) for each type of medium used with Hg (0.05, 2, 5 μM Hg(II)). Methylation potentials were calculated by dividing measured MeHg by total measured Hg. Total recovered Hg were calculated by dividing total measured Hg by total added Hg. < LD: below the limit of detection. NA: Not available.



**Online Resource Table IV-1** : Raw data of Hg methylation assays.

Growth condition	Total added Hg ( $\mu\text{M}$ )	Sampling time	Total recovered Hg ( $\mu\text{M}$ )	Total measured MeHg ( $\mu\text{M}$ )
<b>Pyr/Fum + Cysteine 0.1 mM (Non sulfidogenic)</b>	0.05	Initial	$0.047 \pm 0.001$	$0.0000 \pm 0.0000$
	0.05	Final	$0.021 \pm 0.003$	$0.0064 \pm 0.0007$
	2	Initial	$1.85 \pm 0.11$	$0.003 \pm 0.000$
	2	Final	$1.03 \pm 0.06$	$0.018 \pm 0.002$
	5	Initial	$4.81 \pm 0.24$	$0.005 \pm 0.000$
	5	Final	$3.08 \pm 0.19$	$0.031 \pm 0.000$
<b>Pyr/Fum + Sulfide 0.1 mM (Non sulfidogenic)</b>	0.05	Initial	$0.035 \pm 0.006$	$0.0000 \pm 0.0000$
	0.05	Final	$0.027 \pm 0.000$	$0.0120 \pm 0.0017$
	2	Initial	$1.56 \pm 0.02$	$0.001 \pm 0.000$
	2	Final	$1.45 \pm 0.17$	$0.477 \pm 0.018$
	5	Initial	$3.79 \pm 0.15$	$0.003 \pm 0.000$
	5	Final	$2.90 \pm 0.13$	$0.590 \pm 0.027$
<b>Pyr/Sulfate (Sulfidogenic)</b>	0.05	Initial	$0.026 \pm 0.002$	$0.0001 \pm 0.0000$
	0.05	Final	$0.024 \pm 0.002$	$0.0055 \pm 0.0003$
	2	Initial	$1.15 \pm 0.18$	$0.004 \pm 0.000$
	2	Final	$1.02 \pm 0.25$	$0.090 \pm 0.004$
	5	Initial	$2.89 \pm 0.18$	$0.007 \pm 0.001$
	5	Final	$2.40 \pm 0.64$	$0.098 \pm 0.003$
<b>Pyr/Fum + Sulfide 0.0005 mM</b>	0.05	Initial	$0.043 \pm 0.003$	$0.0001 \pm 0.0001$
	0.05	Final	$0.036 \pm 0.007$	$0.0010 \pm 0.0002$
<b>Pyr/Fum + Sulfide 0.005 mM</b>	0.05	Initial	$0.047 \pm 0.007$	$0.0001 \pm 0.0000$
	0.05	Final	$0.022 \pm 0.005$	$0.0038 \pm 0.0005$
<b>Pyr/Fum + Sulfide 0.05 mM</b>	0.05	Initial	$0.035 \pm 0.003$	$0.0002 \pm 0.0000$
	0.05	Final	$0.025 \pm 0.005$	$0.0101 \pm 0.0020$
	2	Initial	$1.59 \pm 0.52$	$0.002 \pm 0.001$
	2	Final	$1.216 \pm 0.53$	$0.112 \pm 0.012$
<b>Pyr/Fum + Sulfide 0.5 mM</b>	0.05	Initial	$0.026 \pm 0.002$	$0.0002 \pm 0.0001$
	0.05	Final	$0.035 \pm 0.005$	$0.0110 \pm 0.0020$
	2	Initial	$1.62 \pm 0.27$	$0.001 \pm 0.000$
	2	Final	$0.92 \pm 0.02$	$0.288 \pm 0.037$
<b>Pyr/Fum + Sulfide 2.4 mM</b>	0.05	Initial	$0.025 \pm 0.002$	$0.0001 \pm 0.0000$
	0.05	Final	$0.023 \pm 0.001$	$0.0096 \pm 0.0004$
	2	Initial	$1.42 \pm 0.02$	$0.003 \pm 0.000$
	2	Final	$1.21 \pm 0.07$	$0.164 \pm 0.004$



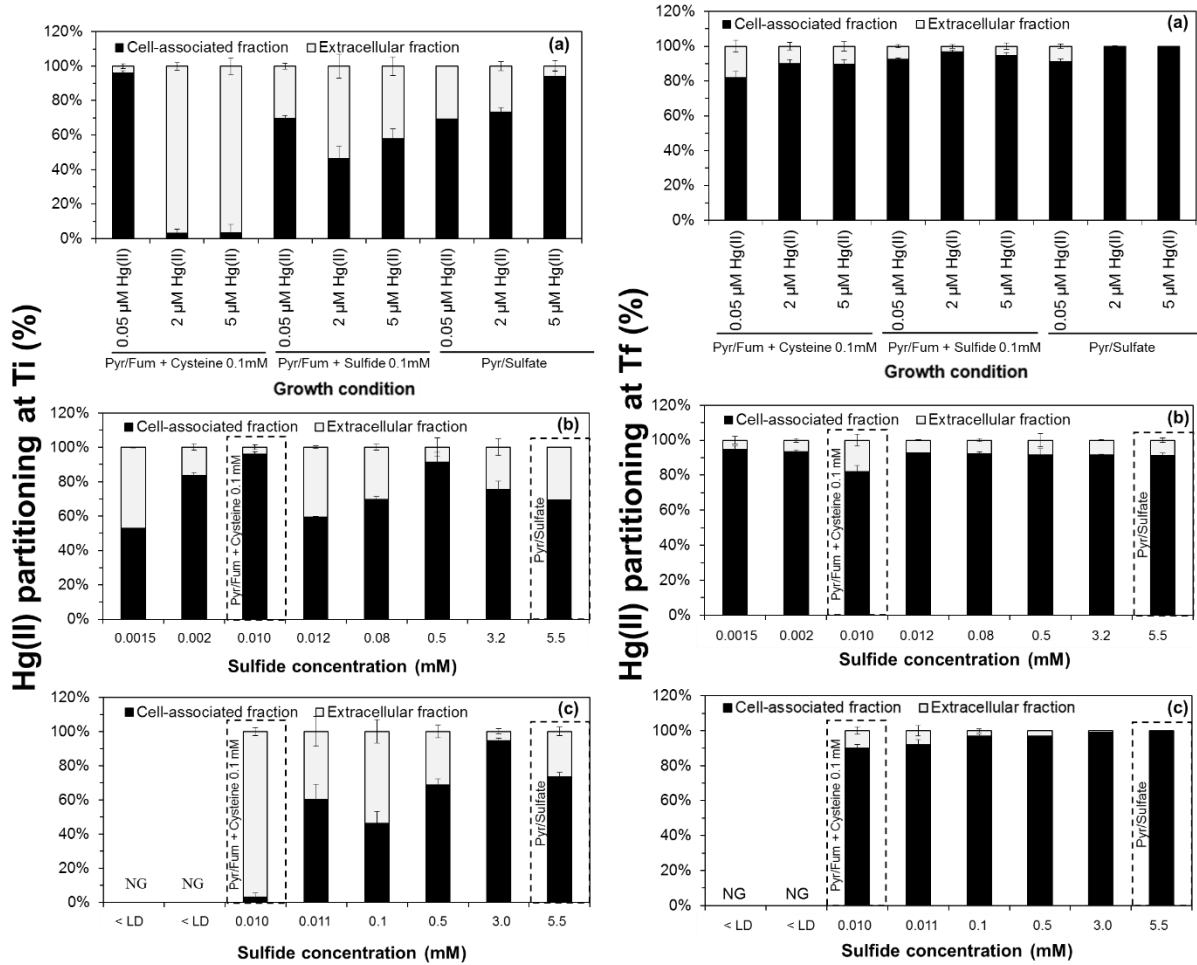
### 3.2. Sulfides influence methylmercury partitioning

In a previous study, a link between Hg species partitioning and Hg methylation was observed with various thiols molecules (Schaefer and Morel 2009). Thus, to further understand differences on Hg methylation observed with various S containing molecules and sulfide concentration in our study, we investigated the Hg species (Hg(II) and MeHg) partitioning between the extracellular and the cell-associated (cell-sorbed and intracellular) fractions in BerOc1 grown under the three growth conditions (Pyr/Fumarate with cysteine or sulfide and, Pyr/Sulfate) and with sulfide gradient under Pyr/Fumarate condition. Distribution of Hg species was measured at the beginning of the growth (Ti, Hg(II), [Online Resource IV-4](#)) and at the end of exponential phase (Tf, Hg(II) and MeHg produced) at increasing Hg(II) concentrations ([Figure IV-2](#), [Figure IV-3](#)). For a given growth condition, increasing Hg(II) concentrations did not affect neither Hg(II) ([Figure IV-2a](#)) nor MeHg ([Figure IV-3a](#)) partitioning. Hg(II) became more associated with the cells over time ([Online Resource IV-4a](#), [Figure IV-2a](#)) and, was mostly associated with cells at the end of the exponential growth phase (80-100%) regardless of the growth condition ([Figure IV-2a](#)). On the contrary, MeHg distribution between extracellular and the cell fractions depends on the growth condition ([Figure IV-3a](#)): while most of the MeHg was detected in the extracellular fraction under sulfidogenic growth ( $96 \pm 2\%$ ), the proportion in the extracellular fraction reached only  $30 \pm 4\%$  under non-sulfidogenic condition with cysteine. An intermediate distribution ( $50 \pm 5\%$ ) of MeHg was observed in non-sulfidogenic growth with sulfide. Thus, the proportion of extracellular MeHg increased with the increasing sulfide concentrations measured in the cultures ([Figure IV-3a](#), [Table IV-1](#)). The dominance of produced MeHg in the extracellular medium has been already observed and was interpreted as an export of MeHg by the bacteria or desorption from the cells (Graham et al. 2012b; Liu et al. 2016; Pedrero et al. 2012). We thus infer that the export/desorption of MeHg from the bacterial cells can be favored by sulfide.

In order to test this hypothesis, we measured the distribution of Hg species in the extracellular and the cell-associated fractions in BerOc1 cells grown with increasing exogenous sulfide concentrations. At both 0.05 and 2  $\mu\text{M}$  of Hg(II), Hg(II) became more associated to the cell fraction over time for all of the sulfide concentrations tested ([Online Resource IV-4b-c](#), [Figure IV-2b-c](#)), as observed for BerOc1 under Pyr/Fumarate with cysteine and Pyr/Sulfate conditions ([Online Resource IV-4a](#), [Figure IV-2a](#)). Thus, Hg(II) partitioning appear not to be influenced by sulfide concentration. Remarkably, the extracellular MeHg increased with the increase of sulfide concentrations regardless of the Hg(II) concentration added ([Figure IV-3b](#), [Figure IV-3c](#)). A strong positive correlation was observed (Spearman correlation  $\rho = 0.89$ ,  $p$  value  $< 0.001$ ). Previous studies showed an increase of the extracellular MeHg in presence of thiols (Ndu et al. 2016). More specifically, cysteine strongly enhanced the extracellular MeHg produced by *G. sulfurreducens* PCA and more slightly by

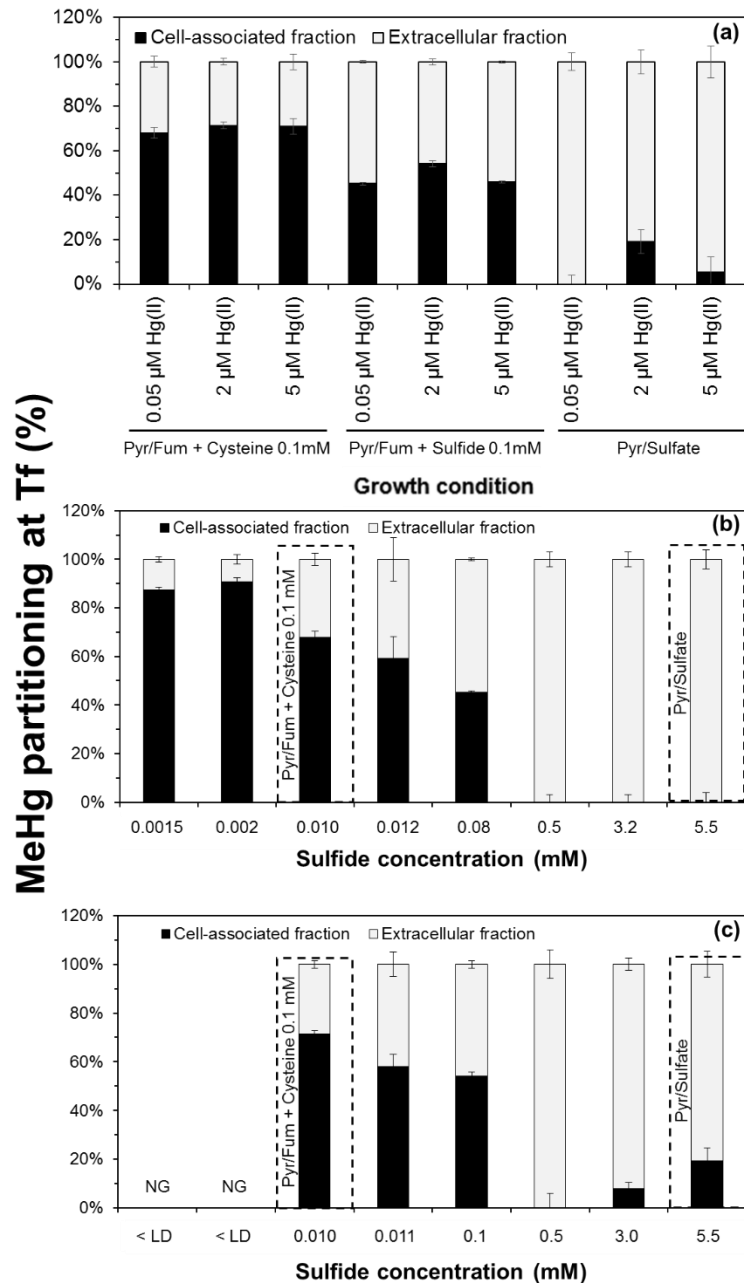
*Pseudodesulfovibrio mercurii* ND132. Accordingly, a facilitated MeHg cell export and desorption from the cells was proposed via the cysteine (Lin et al. 2015a). However, no data of sulfide contents was provided (Lin et al. 2015a) and, in the light of the recent papers (Thomas et al. 2019), it may be possible that the facilitated export/desorption was the consequence of sulfide production due to cysteine degradation. Our results show that sulfide, either exogenous or endogenous (produced by the cell via cysteine degradation or sulfate reduction), could be a strong parameter involved in MeHg export and/or desorption from the cell.

A recent study on abiotic interaction of MeHg and sulfide predicted the formation of dimethylmercury sulfide as the dominant MeHg species in sulfidic solutions (Kanzler et al. 2018). In mammalian cells, the dimethylmercury sulfide formation from MeHg has been proposed as a mechanism of cell detoxification (Yoshida et al. 2011). In this study, sulfide (exogenous or produced via cysteine and homocysteine degradation) form dimethylmercury sulfide in the presence of MeHg, avoiding MeHg binding to cellular proteins (Yoshida et al. 2011). In our study, the progressive decrease of cell associated MeHg observed when sulfide concentration increased could be explained by the formation of dimethylmercury sulfide that avoid the binding of MeHg to cellular proteins. However, it is difficult to speculate on the combined role of Hg methylation and MeHg export for Hg cell detoxification since no link between both Hg methylation potentials and MeHg export could be found. MeHg export probably protects BerOc1 cells against MeHg toxicity. In the other hand, the decrease of Hg methylation potential observed at high sulfide concentrations may be the consequence of a lower availability of Hg because of Hg-S complexes, limiting Hg toxicity.



**Online Resource IV-4 :** Partitioning of inorganic mercury (Hg(II)) between extracellular (grey) and cell-associated (black) fractions at the beginning of the growth (Ti) (a) 0.05, 2 and 5 μM Hg(II) under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with either 0.1 mM cysteine or 0.1 mM sulfide or under sulfidogenic condition (Pyr/Sulfate) and, at either (b) 0.05 μM or (c) 2 μM of Hg(II) under Pyr/Fum with a range of sulfide concentrations (added as exogenous sulfide or measured in the cultures). The same cultures were used to determine Hg species at Ti in the bulk fraction and Hg species partitioning. After sampling for Hg species determination, the cultures were centrifuged (less than one minute after Hg spike (Ti)) and extracellular Hg(II) and MeHg were measured in the supernatant fraction. Error bars represent the standard deviations of three independent replicates, each one measured three times.

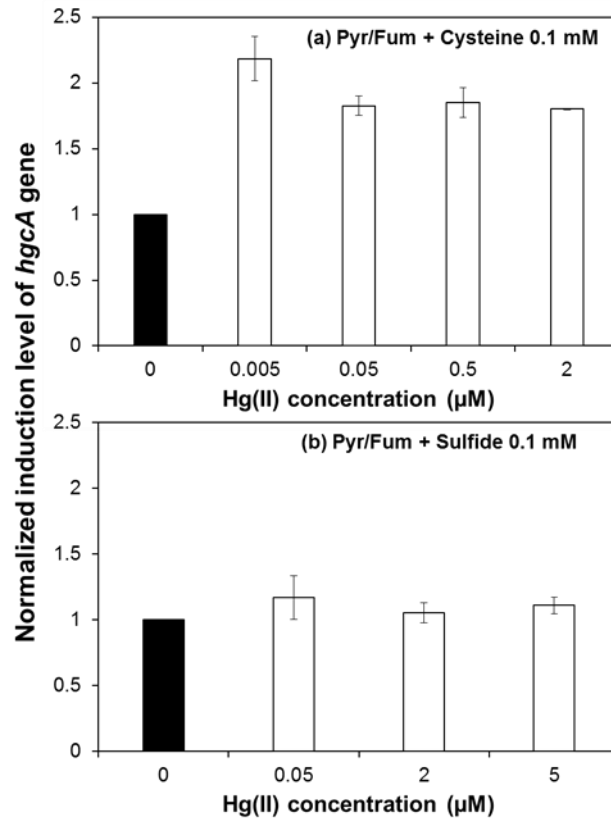
**Figure IV-2 :** Partitioning of inorganic mercury (Hg(II)) between extracellular (grey) and cell-associated (black) fractions at the end of the exponential growth phase (Tf). (a) The partitioning of Hg(II) at 0.05, 2 and 5 μM Hg(II) under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with either 0.1 mM cysteine or 0.1 mM sulfide or under sulfidogenic condition (Pyr/Sulfate). The partitioning of Hg(II) at either (b) 0.05 μM or (c) 2 μM of Hg(II) under Pyr/Fum with a range of sulfide concentrations (added as exogenous sulfide or measured in the cultures). The same cultures were used to determine Hg species in the bulk fraction at the end of the exponential growth phase and Hg species partitioning. After sampling for Hg species determination, cultures were centrifuged and the extracellular Hg(II) and MeHg were measured in the supernatant. Error bars represent the standard deviations of three independent replicates, each one measured three times.



**Figure IV-3** : Partitioning of MeHg between extracellular (grey) and cell-associated (black) fractions at the end of the exponential growth phase (Tf). (a) The partitioning of MeHg at 0.05, 2 and 5 μM Hg(II) under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with either 0.1 mM cysteine or 0.1 mM sulfide or under sulfidogenic condition (Pyr/Sulfate). The partitioning of MeHg at either (b) 0.05 μM or (c) 2 μM of Hg(II) under Pyr/Fum with a range of sulfide concentrations (added as exogenous sulfide or measured in the cultures). The same cultures were used to determine Hg species in the bulk fraction at the end of the exponential growth phase and Hg species partitioning. After sampling for Hg species determination, cultures were centrifuged and the extracellular Hg(II) and MeHg were measured in the supernatant fraction. Error bars represent the standard deviations of three independent replicates, each one measured three times

### 3.3. The increase of Hg methylation in presence of sulfide is not associated to *hgcA* overexpression

*hgcAB* are the only genetic determinisms identified as necessary for Hg methylation (Parks *et al.* 2013). To investigate if the increase of Hg methylation observed with 0.1 mM of sulfide was related to the overexpression of the enzymatic mechanism of Hg methylation, the expression of *hgcA* gene (involved in the methyl transfer to Hg) was measured in BerOc1. We selected cells growing under non-sulfidogenic growth with 0.1 mM sulfide and 0.1 mM cysteine, where Hg methylation was lower (**Figure IV-1a**). Low *hgcA* overexpression (from 1.8 to 2.2) was observed for cysteine for all the Hg(II) concentrations tested (**Figure IV-4a**). In contrast, no overexpression could be detected for 0.1 mM sulfide, where the methylation potentials were higher (**Figure IV-1a and Figure IV-4b**). Thus, no direct link could be established between *hgcA* expression and Hg methylation potentials. The high Hg methylation potential observed is likely linked to the cellular environment, such as sulfides reported here or substrates used for bacterial growth as previously reported (Goñi-Urriza *et al.* 2015). In addition, our results revealed that *hgcA* gene is expressed at basal level even at increasing Hg(II) concentrations. Hg(II) seems not control *hgcA* expression, unlike other metals (Zn, Cu, As, Fe) which regulate the expression of genes encoding enzymes controlling their transformation (Andrei *et al.* 2020; Andrews *et al.* 2003; Pederick *et al.* 2015; Silver 1996; Silver and Phung 2005). Nevertheless, the available data regarding the expression of *hgcAB* gene are so far insufficient to ascertain that *hgcAB* genes are not regulated. A transcriptional regulator, *arsR*, located upstream *hgcAB* genes and cotranscribed with *hgcA* clearly suggests a regulated process (Goñi-Urriza *et al.* 2020). Its implication in the regulation of *hgcAB* genes expression and the factors that trigger the ArsR response are still unknown and should be addressed in future studies.



**Figure IV-4** : Expression level of *hgcA* gene in *P. hydrargyri* strain BerOc1 under non-sulfidogenic growth (Pyr/Fum) with cysteine (a) and sulfide (b) at various Hg(II) concentrations. Hg(II) was spiked at the beginning of the exponential growth phase and incubated for 1 hour. A control condition was performed without Hg(II) (0 μM). Expression levels of *hgcA* gene were normalized using *gyrB* gene expression levels in the same condition, following double delta Ct method. Error bars represent the standard deviations of three independent replicates, each one measured three times.

## 4. Conclusion

In this work, the influence of sulfide regardless of its origin (added exogenously or produced endogenously from cysteine or sulfate) on mercury methylation and Hg species partitioning was investigated using the model strain *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* BerOc1. The mercury methylation assays showed that there is a range of sulfide concentration (0.1 to 0.5 mM) that enhance mercury methylation. Remarkably, no matter the S containing molecules used, the driven parameter is the sulfide concentration, whatever if the molecule is added exogenously or produced by the cells (via cysteine degradation or sulfate reduction).

Importantly, partitioning assays also demonstrated that MeHg export increases with increasing sulfide concentration. A drastic shift was observed: low sulfide concentrations lead to MeHg being associated to the cells while high sulfide concentrations results in extracellular MeHg, likely exported from the cells. Despite the lack of correlation between MeHg export and Hg methylation in this study, such a shift in partitioning of MeHg, was never observed. Sulfide has a central role in determining MeHg production and export. The evaluation of the concentration of sulfide in natural environments is thus important and should provide information on the possibility of the neurotoxic methylmercury spread in the aquatic environment, in order to better evaluate the risks of environmental Hg contamination and its impact on public health.

# CHAPITRE V - Cluster *arsRhgcAhgcB* et méthylation du mercure : focus sur la protéine ArsR

## Préambule

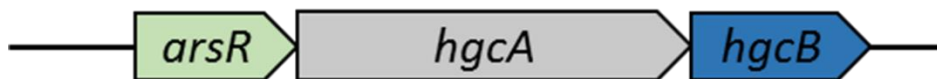
Alors que le Chapitre IV a permis de mettre en évidence des taux de méthylation significativement variables selon la concentration en sulfure et la concentration en Hg(II), aucun impact sur l'expression du gène *hgcA* n'a été observé. En accord avec les précédentes études, notre étude confirme que les gènes essentiels pour la méthylation du mercure ne sont pas inductibles par ce dernier. Cependant, un régulateur transcriptionnel a été identifié en synténie avec les gènes *hgcA* et *hgcB* chez certaines souches capables de méthyler le mercure suggérant qu'une régulation pourrait s'opérer sur le mécanisme de la méthylation du mercure. Le Chapitre V s'intéresse ainsi à l'étude du régulateur ArsR et son rôle dans le mécanisme de méthylation du mercure.





## 1. Introduction

Chez les procaryotes, les mécanismes impliqués dans l'homéostasie des métaux, qu'ils soient essentiels ou toxiques, font majoritairement appel à un ou des régulateurs transcriptionnels capables de lier le métal et de réguler l'expression des gènes impliqués dans la gestion de ce métal (Capdevila et al. 2017; Baksh and Zamble 2020). Les protéines ArsR appartiennent à une grande famille de régulateur transcriptionnel, la famille ArsR-SmtB, régulant essentiellement des gènes impliqués dans la gestion des métaux toxiques (Osman and Cavet 2010; Saha et al. 2017; Roy et al. 2018). Même si l'expression de la protéine HgcA, l'enzyme clé de la méthylation du mercure, n'est pas induite par le Hg, l'organisation génomique en cluster d'un gène *arsR* annoté comme appartenant à la famille de ArsR-SmtB (E value =  $1.12e^{-13}$ ) avec les gènes *hgcA* et *hgcB* (Figure V-1) et, la co transcription de *arsR* et d'*hgcA* (Goñi-Urriza et al. 2020) font que le rôle de la protéine ArsR dans la réponse au Hg et dans la méthylation du mercure doivent être clarifiés. D'autre part, il a été suggéré que la fonction première des protéines HgcAB ne semble pas être la méthylation du mercure (Smith et al. 2015). Ainsi, l'identification des gènes régulés par la protéine ArsR pourrait renseigner sur le rôle premier de ces protéines.



**Figure V-1** : Organisation génomique des gènes *arsR*, *hgcA* et *hgcB* chez *P. hydrargyri* souche BerOc1. La direction des ORF est indiquée par les encadrés fléchés (selon Goñi-Urriza et al. 2020).

L'objectif de ce chapitre a donc été de clarifier l'implication d'ArsR dans la méthylation du mercure chez une bactérie méthylante, la souche *P. hydrargyri* BerOc1. Pour cela, cette étude a voulu évaluer :

- (i) Les caractéristiques de la protéine ArsR en réalisant des analyses *in silico* et des expériences d'induction du gène *arsR* au Hg afin de mieux comprendre son mode d'action.
- (ii) Le phénotype du mutant délété pour le gène *arsR* en le comparant à celui du mutant délété pour le gène *hgcB* pour déterminer si un rôle commun existe entre les protéines du cluster de gènes *arsRhgcAhgcB*.
- (iii) Les conséquences de la suppression du gène codant pour ArsR sur la sensibilité au Hg(II) et au MeHg, et sur la méthylation du mercure et la déméthylation du méthylmercure.
- (iv) Les conséquences sur la méthylation du mercure de l'expression hétérologue du cluster de gènes *arsRhgcAhgcB* chez la bactérie non méthylante *Desulfovibrio alaskensis* souche G20.

## 2. Résultats

### 2.1. Caractéristiques de la protéine ArsR chez *P. hydrargyri* souche BerOc1

#### 2.1.1. Analyses *in silico* de la protéine ArsR

Les protéines de la famille ArsR-SmtB sont classées en groupes, classes et sous classes selon leurs motifs de liaison aux métaux (**voir Chapitre I Partie 3.2.2.**). Pour rappel, les motifs de liaison aux métaux sont principalement constitués de cystéines (C) et d’histidines (H). Afin de déterminer le site de liaison du métal de la protéine ArsR faisant partie du cluster *arsRhgcAhgcB* chez la souche BerOc1 et ainsi mieux comprendre le mode d’action qui pourrait être associé à cette protéine, des analyses *in silico* ont été réalisées sur la protéine ArsR. Ces analyses ont de plus visé à prédire le site de liaison à l’ADN de la protéine ArsR afin de déterminer les gènes de la souche BerOc1 pouvant être régulés par cette protéine.

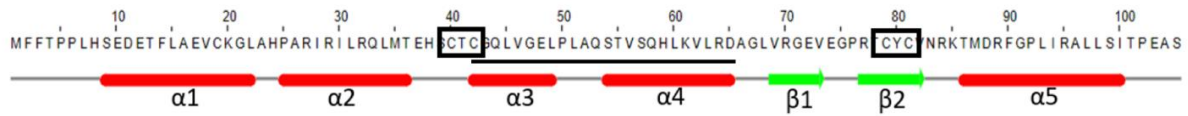
##### 2.1.1.1. Caractéristiques générales et structure secondaire de ArsR de BerOc1

La traduction du gène annoté *arsR* appartenant au cluster *arsRhgcAhgcB* chez la souche BerOc1 (N° accession NCBI/RefSeq : OIQ52129.1 et WP\_071544226.1) a permis d’obtenir la séquence protéique issue de ce gène (**Figure V-2**).

MFFTPPLHSEDETFLAEVCKGLAHPARIRILRQLMTEHSCTCGQLVGELPLAQSTVSQHLKVLRDAG  
LVRGEVEGPRTCYCVNRKTMDRFGPLIRALLSITPEAS

**Figure V-2** : Séquence protéique d’ArsR de *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1. Les cystéines (vert) et les histidines (rouge) pouvant participer à la liaison au métal sont mises en évidence.

L’analyse de la séquence protéique montre que la protéine ArsR est une petite protéine de 105 aa (11,63 kDa) possédant un point isoélectrique de 7,89 ; cette protéine ne sera donc que faiblement chargée positivement à pH neutre. La structure secondaire de la protéine ArsR déterminée par le logiciel Jpred4 présente la structure caractéristique des régulateurs transcriptionnels de la famille ArsR-SmtB :  $\alpha$ 1-  $\alpha$ 2-  $\alpha$ 3-  $\alpha$ 4-  $\beta$ 1-  $\beta$ 2- $\alpha$ 5 (**Figure V-3**). De plus, les analyses réalisées sur Prosite (Expasy) montrent que ArsR contient un domaine conservé de type Helix-Turn-Helix (HTH) la classant parmi les métallorégulateurs (**Figure V-3**). Ce domaine permet la fixation de la protéine à une séquence spécifique de l’ADN nécessaire pour exercer son activité de régulateur de la transcription et est retrouvé classiquement au niveau des hélices  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 4 chez les membres de la famille ArsR-SmtB. Ces résultats confirment que la protéine ArsR de la souche BerOc1 appartient donc à une famille de régulateurs de la transcription et plus précisément à la famille ArsR-SmtB.



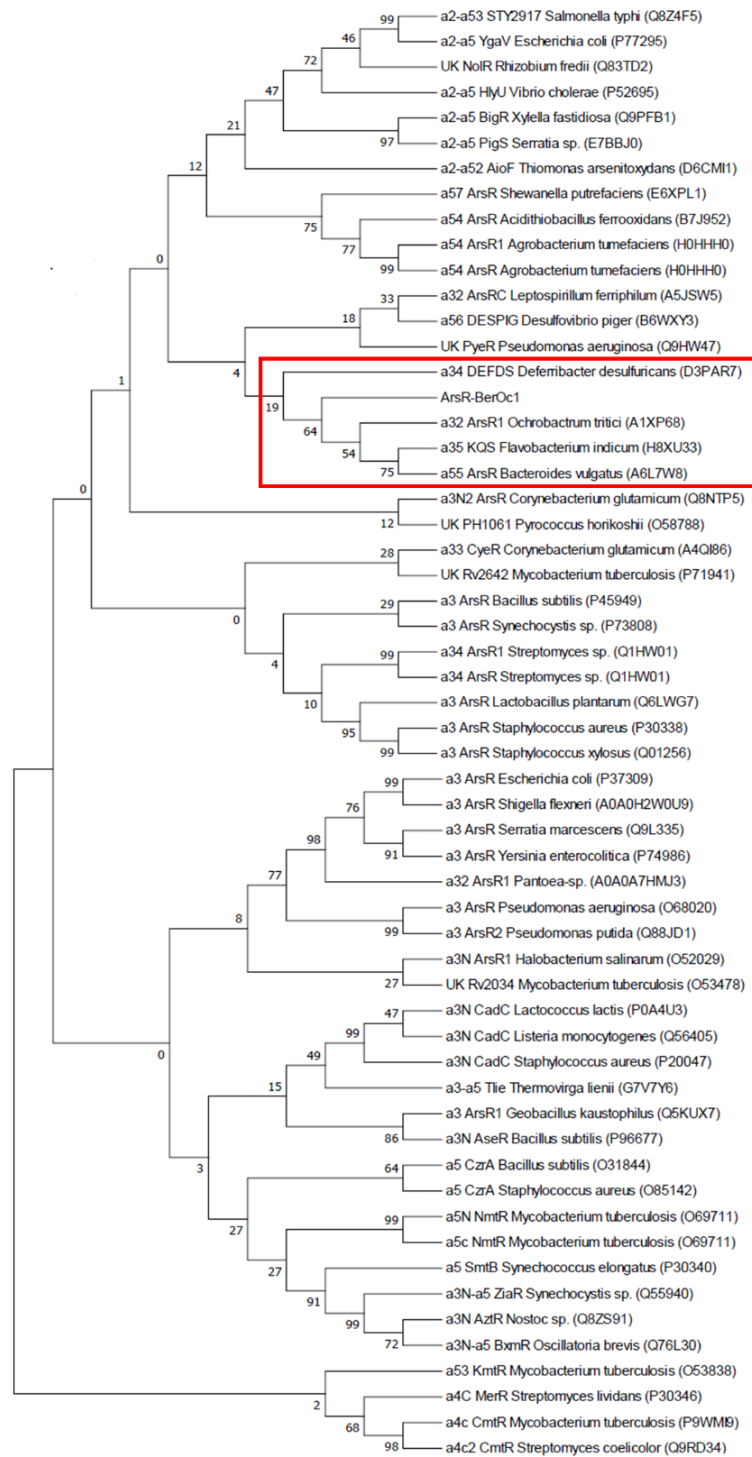
**Figure V-3** : Structure secondaire prédite d'ArsR de BerOc1. La structure secondaire est représentée avec les hélices  $\alpha$  en rouge et les feuillets  $\beta$  en vert. La protéine présente la structure caractéristique des membres de la famille ArsR-SmtB avec :  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 5$ . Les motifs de liaison des métaux sont encadrés (CTC en  $\alpha 3$  et CYC en  $\beta 2$ ) et le domaine de liaison à l'ADN (domaine de type HTH) est souligné.

### 2.1.1.2. Positionnement de la protéine ArsR de la souche BerOc1 au sein de la famille ArsR-SmtB

#### 2.1.1.2.1. Site de fixation du métal : groupe et classe

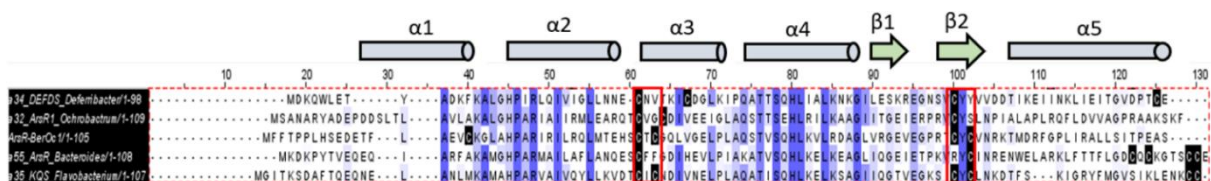
La protéine ArsR possède cinq cystéines et trois histidines, mises en évidence sur la **Figure V-2**. Ces acides aminés sont essentiels pour la fixation du métal chez les membres de la famille ArsR-SmtB et permettent de classer les membres de cette famille en groupe et classe.

La protéine ArsR de la souche BerOc1 présente un motif CxCx au sein de l'hélice  $\alpha 3$  (avec x pour n'importe quel acide aminé), la classant dans le groupe  $\alpha 3$ . Ce groupe incluant actuellement 33% des 2833 séquences protéiques bactériennes appartenant à la famille ArsR-SmtB, a été divisé en classes (Roy *et al.* 2018). Du fait de la présence du motif CxC en  $\beta 2$ , ArsR de BerOc1 appartient probablement à la classe  $\alpha 35$  (Roy *et al.* 2018). Un arbre donnant les relations évolutives au sein de la famille ArsR-SmtB a été réalisé en incluant la protéine ArsR de la souche BerOc1. Cet arbre présente les relations évolutives entre les membres les plus caractéristiques de la famille ArsR-SmtB, tous groupes confondus (**Figure V-4** (Saha *et al.* 2017; Roy *et al.* 2018)) et permet de situer la protéine ArsR de BerOc1 dans la famille. Cet arbre met en évidence que la protéine ArsR de BerOc1 semble très proche d'ArsR1 d'*Ochrobactrum tritici* appartenant à la classe  $\alpha 32$ , d'ArsR de *Bacteroides vulgatus* appartenant à la classe  $\alpha 55$ , de KQS de *Flavobacterium indicum* appartenant à la classe  $\alpha 35$  et enfin, de DEFDS de *Deferribacter desulfuricans* de la classe  $\alpha 34$ .



**Figure V-4** : Arbre montrant les relations évolutives au sein de la famille ArsR-SmtB. L'arbre a été créé à partir des membres représentatifs de la famille. La classe, le nom de la protéine, le nom de l'organisme et le numéro d'accèsion pour Uniprot sont indiqués. UK = unknown. L'encadré rouge indique la branche contenant la protéine ArsR de BerOc1. Méthode évolutive : Neighbor-Joining. Analyse de robustesse : Bootstrap (n = 500).

Pour étudier plus en détail la proximité entre les différentes protéines les plus proches d'ArsR de BerOc1, une comparaison des séquences protéiques est proposée dans la **Figure V-5**. Premièrement, cette comparaison permet de mieux comprendre la proximité de l'ensemble des protéines : elles possèdent toutes une cystéine en  $\alpha 3$  et une cystéine en  $\beta 2$ . Néanmoins, les motifs caractéristiques CxC en  $\alpha 3$  et CxC en  $\beta 2$  de la protéine ArsR de BerOc1 ne sont retrouvés que chez la protéine KQS de *Flavobacterium indicum* appartenant à la classe  $\alpha 35$ . Cette protéine présente 71% de similarité dont 46 % d'identité avec la protéine ArsR de BerOc1 (E value =  $7e^{-31}$ ). La protéine ArsR de *Bacteroides vulgatus* appartenant à la classe  $\alpha 55$  apparaît différente des autres puisqu'elle est la seule à ne pas posséder de motif Cx<sub>n</sub>C en  $\alpha 3$  ne la classant donc pas au sein du groupe  $\alpha 3$  et de plus, à ne pas posséder la première cystéine du motif en  $\beta 2$  (65% de similarité dont 45% d'identité avec ArsR de BerOc1, E value =  $4e^{-24}$ ). Les autres protéines, à savoir DEFS de *Deferribacter desulfuricans* et ArsR1 d'*Ochrobactrum tritici*, conservent à la fois la première cystéine des motifs en  $\alpha 3$  et  $\beta 2$  mais pas la seconde cystéine de ces motifs (53% de similarité dont 33% d'identité (E value =  $7e^{-14}$ ) et, 66% de similarité dont 47% d'identité (E value =  $3e^{-24}$ ) avec ArsR de BerOc1 respectivement).

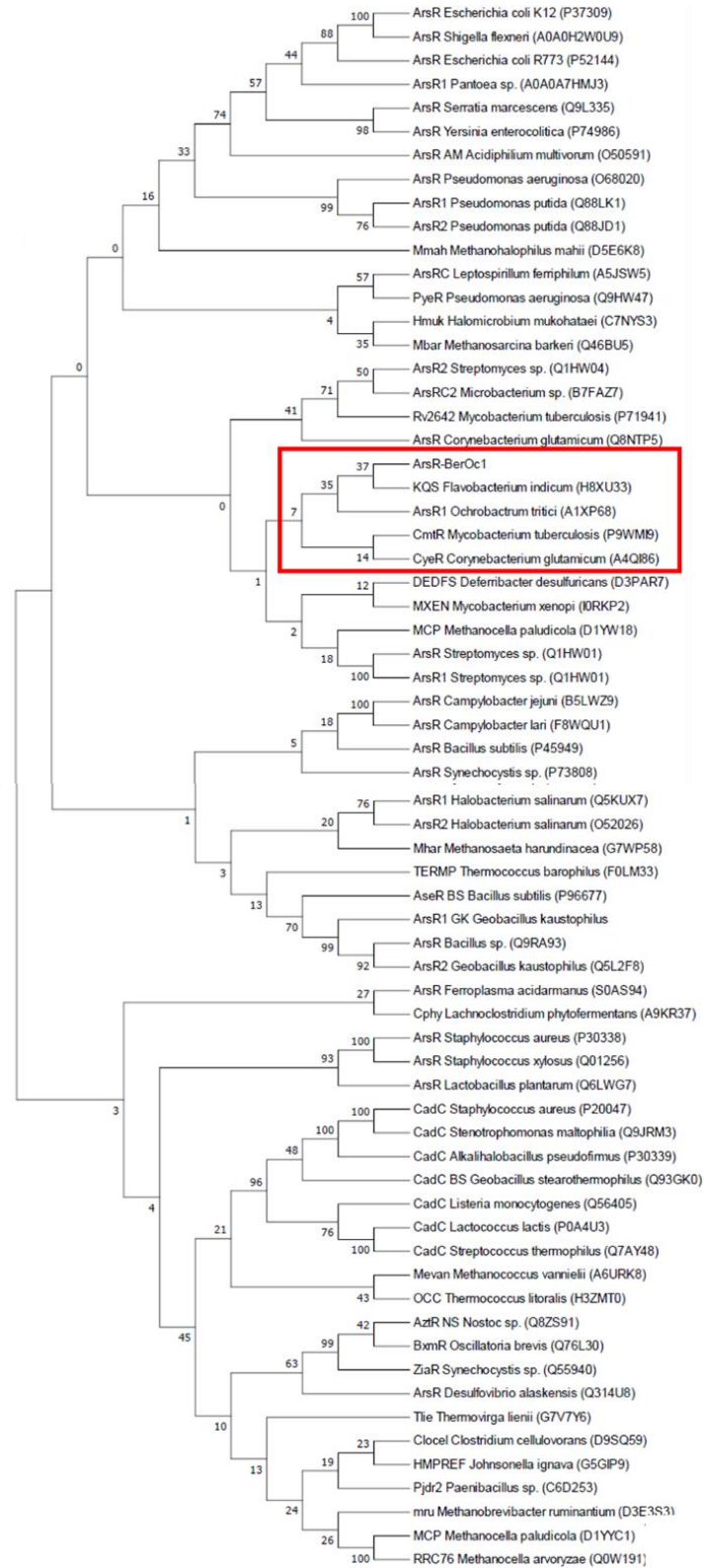


**Figure V-5** : Alignement multiple des protéines les plus proches d'ArsR dans la famille ArsR-SmtB. Les acides aminés les plus conservés sont représentés en violet, les cystéines sont surlignées en noir et les motifs caractéristiques d'ArsR (CxC en  $\alpha 3$  et CxC en  $\beta 2$ ) sont encadrés en rouge. La structure secondaire est également présentée avec les hélices  $\alpha$  représentées par un cylindre gris les feuillets  $\beta$  par une flèche verte.

Ensemble, les résultats donnés par l'arbre phylogénique (**Figure V-4**) et la comparaison de séquences protéiques (**Figure V-5**) confirment les hypothèses précédemment proposées, à savoir l'appartenance de la protéine ArsR de BerOc1 au groupe  $\alpha 3$  et plus précisément à la classe  $\alpha 35$ .

Un arbre présentant les relations évolutives uniquement des membres du groupe  $\alpha 3$  (extraites d'après Saha et al. 2017; Roy et al. 2018) a été réalisé (**Figure V-6**). Cet arbre permet de confirmer la proximité avec la protéine KQS de *Flavobacterium indicum* et ArsR1 d'*Ochrobactrum tritici*. Les protéines KQS et ArsR1 sont deux petites protéines, de 107 aa et 109 aa respectivement, dont la fonction moléculaire est la régulation de la transcription par liaison à l'ADN. KQS, a été décrite chez *Flavobacterium indicum* appartenant aux Bactéroïdes. Cette protéine possède les motifs caractéristiques CxC en hélice  $\alpha 3$  et CxC en feuillet  $\beta 2$  la plaçant au sein de la classe  $\alpha 35$ . Cependant, les métaux reconnus par cette protéine n'ont pas encore été identifiés puisqu'aucune étude

expérimentale n'a été menée sur cette protéine. ArsR1 d'*Ochrobactrum tritici* appartenant aux Alphaprotéobactéries, possède le motif caractéristique Cx<sub>2</sub>Cx en  $\alpha$ 3 qui la place dans la classe  $\alpha$ 32. Cette protéine est capable de lier As(III) et Sb(III). ArsR de BerOc1 est donc proche de ces deux protéines, toutefois, si on compare les structures secondaires (**Figure V-5**) et les relations évolutives au sein du groupe  $\alpha$ 3 (**Figure V-6**), ArsR est beaucoup plus proche de KQS que d'ArsR1 puisque cette fois, la protéine ArsR de BerOc1 et la protéine KQS de *Flavobacterium indicum* sont placées au sein d'une même branche. La protéine ArsR de BerOc1 peut ainsi être classée parmi la classe  $\alpha$ 35. La classe  $\alpha$ 35 est complètement absente chez les archées et représente 5 % des membres du groupe  $\alpha$ 3 chez les bactéries (Roy et al. 2018). Elle est à 76% représentée par des Bacteroidetes bien que des Firmicutes, des Planctomycetes, des Proteobacteria, une Cyanobacteria et un Chloroflexi soient en plus identifiés comme membres de cette classe. Les membres de cette classe ont uniquement été identifiés *in silico* grâce aux motifs CxCx en hélice  $\alpha$ 3 et CxC en feuillet  $\beta$ 2. Ainsi, aucune étude expérimentale sur le mode de fonctionnement de cette classe de régulateurs et les métaux qu'elle fixe n'est disponible, ne permettant actuellement pas d'émettre des hypothèses sur le fonctionnement et la réponse aux métaux de la protéine ArsR de BerOc1.



**Figure V-6** : Arbre montrant les relations évolutives au sein du groupe  $\alpha 3$ . L'arbre a été créé à partir des membres du groupe  $\alpha 3$  recensés dans Roy *et al.* 2018. Le nom de la protéine, le nom de l'organisme et le numéro d'accès pour Uniprot sont indiqués. L'encadré rouge indique la branche contenant la protéine ArsR de BerOc1. Méthode évolutive : Neighbor-Joining. Analyse de robustesse : Bootstrap (n = 500).

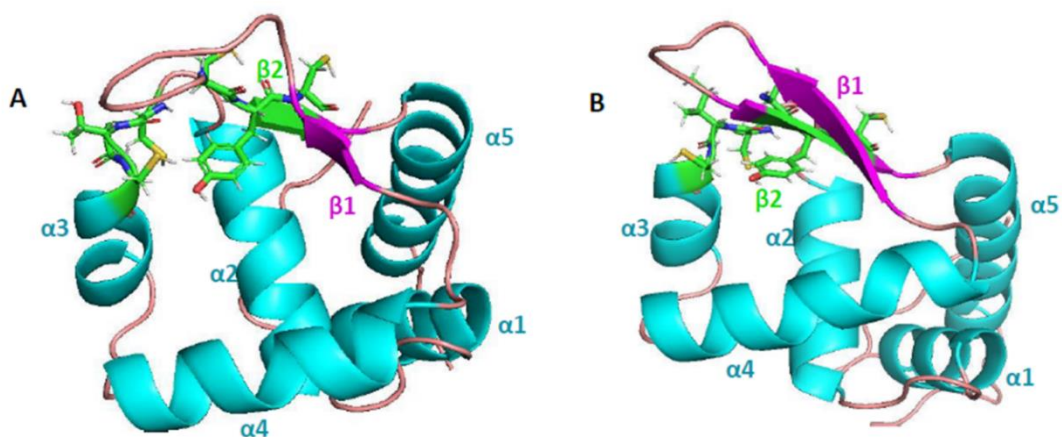


### 2.1.1.2.2. Structure tertiaire de ArsR de BerOc1

Les protéines de la famille ArsR-SmtB sont actives sous forme de dimères. La fixation du métal pour les membres de la classe  $\alpha 35$  a été prédite comme se faisant en intra, c'est-à-dire au sein de chaque monomère (implication de la structure tertiaire de la protéine) et non en inter, c'est-à-dire à l'interface dimérique (implication de la structure quaternaire de la protéine) (Roy *et al.* 2018). En accord avec le lieu de la fixation du métal, la suite de l'étude s'est focalisée sur la visualisation de la structure tertiaire de la protéine ArsR de la souche BerOc1 afin de modéliser le site de fixation du métal.

Cette modélisation permet, d'une part d'observer la structure d'ArsR de BerOc1 et d'autre part de la comparer à celle de KQS de *Flavobacterium indicum* (Figure V-7). La structure  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 5$  de la protéine est bien visible, avec les cystéines conservées formant a priori le site de liaison aux métaux grâce à leurs groupes sulfhydriles. Au niveau de ce site, les études se questionnent sur le rôle des cystéines, et surtout si elles sont toutes impliquées (Roy *et al.* 2018). Deux modèles ont d'ailleurs été proposés, un premier dans lequel les deux cystéines en  $\alpha 3$  sont impliquées et une seule en  $\beta 2$  et un où les deux cystéines en  $\beta 2$  sont impliquées et une seule en  $\alpha 3$ . Il est peu probable en revanche, que les quatre cystéines soient impliquées, notamment à cause de l'encombrement stérique.

La proximité de la protéine ArsR de BerOc1 avec la protéine KQS est mise en valeur : la structure  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 5$  est également retrouvée, avec exactement les mêmes motifs et une grande proximité est observable entre les deux protéines. La protéine KQS présente également les cystéines qui forment a priori le site de liaison aux métaux.

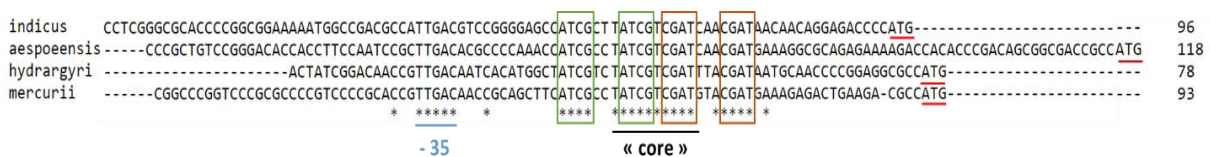


**Figure V-7** : Modélisation de la structure tertiaire d'ArsR (A) et KQS (B). La modélisation a été réalisée avec RaptorX, et la visualisation avec PyMOL. Les hélices  $\alpha$  sont représentées en **bleu**, les feuillets  $\beta$  en **violet** et les boucles en **rose**. Les acides aminés impliqués dans les motifs de liaison (CxCx en  $\alpha 3$  et CxC en  $\beta 2$ ) sont mis en évidence avec le carbone en **vert**, l'hydrogène en **blanc**, l'azote en **bleu**, l'oxygène en **rouge** et le soufre en **jaune**.

### 2.1.1.3. Cibles de la protéine ArsR dans le génome de la souche BerOc1

La protéine ArsR de la souche BerOc1 appartient donc à une famille de régulateur de la transcription pouvant fixer les métaux. Les régulateurs de la transcription agissent en reconnaissant et se fixant sur des séquences consensus au niveau de la région promotrice des gènes qu'ils régulent, ces derniers étant appelés gènes cibles. Pour déterminer des séquences putatives de fixation de la protéine ArsR sur son propre promoteur, un alignement de la région intergénique entre l'ORF du gène *arsR* et l'ORF du gène situé en amont du gène *arsR* retrouvés chez les bactéries méthylantes du genre *Pseudodesulfovibrio* a été réalisé. Il inclut les régions intergéniques des bactéries *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1, *Pseudodesulfovibrio mercurii* souche ND132, *Pseudodesulfovibrio indicus* souche J2 et *Pseudodesulfovibrio aespoensis* souche Aspo2 pour lesquelles une structure génomique constituée du cluster de gènes *arsRhgcAhgCB* a été mise en évidence (Goñi-Urriza et al. 2020).

Les résultats montrent deux séquences conservées par l'ensemble des régions promotrices d'*arsR* chez les souches analysées (Figure V-8). La première séquence est le motif TTGAC correspondant à la boîte -35 des promoteurs alors que la seconde séquence révèle une suite de 23 nucléotides. Cette séquence est composée d'un motif ATCG répété quatre fois : deux fois consécutivement dans le sens direct (ATCG) et deux fois consécutivement dans le sens inverse (CGAT). Cet enchaînement pourrait favoriser la formation d'une boucle de l'ADN par hybridation entre les deux motifs dans le sens direct avec ceux dans le sens inverse. Classiquement, les séquences de fixation à l'ADN de la famille ArsR-SmtB sont des séquences répétées inversées imparfaites de 24 nucléotides organisées en 12-2-12 qui permettent la formation d'une boucle au niveau de la région promotrice du gène régulé et ainsi bloquer sa transcription (Saha et al. 2017). Dans notre étude, nous supposons être en présence d'une séquence répétées inversée imparfaites de 23 nucléotides organisée comme suit : 12-1-12. Parmi les 23 nucléotides, une séquence dite « core » de 10 nucléotides 'TATCGTCGAT' a pu être mise en évidence.



**Figure V-8 :** Alignement multiple des régions intergéniques en amont du gène *arsR* chez des souches méthylantes. Les ATG sont soulignés en rouge. La boîte -35 est conservée et soulignée en bleu. Les identités sont marquées par un astérisque (\*). Les motifs répétés dans le sens direct sont encadrés en vert et ceux répétés dans le sens inverse sont encadrés en orange. La séquence « core » (10 nucléotides) est soulignée en noir.

Suite à l'identification d'une potentielle séquence « core » de fixation de la protéine ArsR de BerOc1, nous avons entrepris une recherche des sites de fixation de cette protéine ArsR au niveau de l'ADN génomique de la souche BerOc1. Grâce à cette recherche, quatre sites de fixation putatifs de la protéine ArsR ont été mis en évidence. La recherche d'ORF en aval de la séquence « core » couplée à la recherche d'homologie des ORF prédits a permis d'identifier deux protéines dont l'expression pourrait être régulée par la protéine ArsR de BerOc1. La première protéine (WP\_071544278.1) est prédite comme appartenant à la famille des protéines de chimiotaxie acceptant le méthyl (MCP ; Methyl accepting Chemotaxis Protein ; Accession : PRK15048 ; E value =  $8.50e^{-59}$ ). Ces protéines sont des récepteurs transmembranaires contrôlant, grâce à une cascade de phosphorylation impliquant d'autres protéines, la réponse chimiotactique bactérienne, c'est-à-dire la motilité cellulaire en réponse à des composés chimiques. La seconde protéine (WP\_071544310.1) est prédite comme étant la sous unité  $\beta$  d'une DMSO réductase (Accession : cd16368 ; E value =  $2.68e^{-108}$ ). Cette protéine contient des domaines capables de lier des clusters Fer-Soufre (motif Cx<sub>2</sub>Cx<sub>2</sub>Cx<sub>3</sub>C) et est impliquée, en association avec sa sous unité  $\alpha$ , dans le transfert d'électrons à des enzymes.

#### 2.1.1.4. La protéine ArsR chez les autres souches méthylantes

La protéine ArsR en amont du cluster de gènes codant les protéines HgcAB de la souche BerOc1 appartient à la classe  $\alpha 35$ . Diverses souches capables de méthyler le mercure possèdent les gènes *arsR*, *hgcA* et *hgcB* en synténie. Afin de déterminer si d'une part, les souches capables de méthyler le mercure codent une protéine ArsR de la même classe que celle de la souche BerOc1 et d'autre part, si l'organisation synténique de ce cluster est en lien avec la classe de la protéine ArsR codée par ce cluster, un alignement multiple des séquences protéiques retrouvées chez les souches méthylantes a été réalisé (**Figure V-9**). Cet alignement a impliqué les protéines ArsR de *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* BerOc1, *Pseudodesulfovibrio mercurii* ND132, *Pseudodesulfovibrio indicus* J2, *Pseudodesulfovibrio aespoeensis* Aspo2, *Desulfovibrio oxyclinae* P1B et *Desulfovibrio* sp. X2. De plus, cet alignement a impliqué la protéine ArsR de la bactérie *Desulfomicrobium baculatum* X qui possède une organisation synténique du cluster *arsRhgcAhgcB* mais n'appartenant pas au genre *Pseudodesulfovibrio* et *Desulfovibrio* et, la bactérie *Desulfovibrio africanus* WB ne possédant pas le gène *arsR* en synténie avec les gènes *hgcAB*.



**Figure V-9** : Alignement multiple des séquences protéiques d’ArsR de souches méthylantes. Les motifs de liaison des métaux sont encadrés en rouge. Acides aminés (\*) identiques et (:) similaires retrouvés pour toutes les séquences. (.) Acides aminés similaires pour toutes les séquences à l’exception d’une.

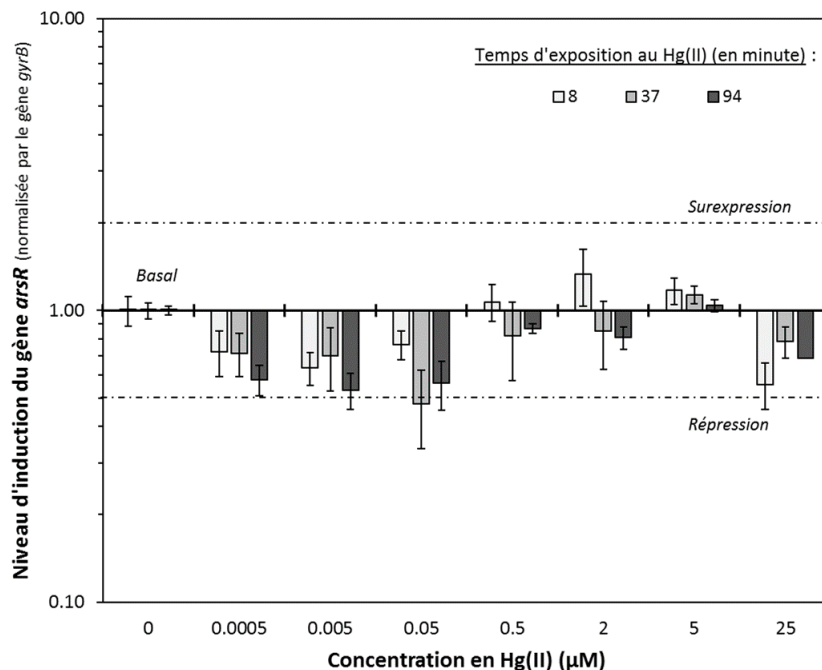
Toutes les souches codent une protéine ArsR possédant un motif CxCx en  $\alpha 3$  et donc appartenant au groupe  $\alpha 3$  par comparaison avec la protéine ArsR de la bactérie *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* BerOc1 (**Figure V-9**). De plus, à l’exception de la bactérie *Desulfovibrio africanus* WB, ces protéines appartiennent à la classe  $\alpha 35$  puisque toutes possèdent un motif CxC en  $\beta 2$ . La bactérie *Desulfovibrio africanus* WB ne possédant pas le gène *arsR* en synténie avec les gènes *hgcA* et *hgcB*, les résultats suggèrent que l’organisation synténique du cluster est déterminante pour la classe de la protéine ArsR. De plus, la détermination de la classe de la protéine ArsR au sein du cluster *arsRhgcAhgcB* ne semble pas être associé à une diversité phylogénétique proche puisque retrouvée chez des souches à la fois du genre *Pseudodesulfovibrio*, *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium*. Ensemble, ces résultats suggèrent fortement que la synténie des gènes *arsRhgcAhgcB* est déterminante pour la classe de la protéine ArsR et ainsi qu’ArsR jouerait un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans la méthylation du mercure, *hgcA* et *hgcB*.

### 2.1.2. Expression du gène *arsR* en réponse au mercure chez la souche BerOc1 sauvage

Pour mieux comprendre le lien moléculaire existant entre le mercure et la protéine ArsR de la souche BerOc1, les niveaux d’induction du gène *arsR* ont été mesurés en réalisant des analyses de RT qPCR. Afin de préciser les conditions contrôlant l’expression de ce gène, l’impact de deux paramètres clés dans l’expression des gènes en réponse aux métaux a été évalué : (i) la présence du métal et sa concentration et (ii) le temps d’exposition au métal. Pour cela, la souche BerOc1 a été exposée à une large gamme de concentration en Hg(II) (allant de 0.0005 à 25  $\mu\text{M}$ ) englobant à la fois de faibles concentrations en Hg(II) retrouvées dans les environnements naturels (0.0005  $\mu\text{M}$  et 0.005  $\mu\text{M}$ ) et, des concentrations très élevées afin de tester si l’induction ne se faisait que dans des conditions de fortes contaminations, comme dans le cas de l’opéron *mer* (Norambuena et al. 2020). D’autre part, différents temps d’exposition au Hg(II) ont été évalués, tous étant relativement courts car la réponse génique est

rapide et transitoire, mais allant de 8 minutes à plus d'une heure et demi (94 minutes). Les expositions au Hg(II) ont été réalisées en milieu de phase exponentielle pour éviter un temps de latence. Un contrôle non exposé (0  $\mu\text{M}$  Hg(II)) a de plus été effectué afin de déterminer le niveau d'expression basal du gène *arsR* et l'utiliser en tant que référence pour ces expériences d'induction au Hg(II). Le gène *gyrB* a été choisi en tant que gène de ménage (voir Chapitre II Partie 4.3.) : pour l'ensemble de nos expériences, c'est-à-dire l'ensemble des concentrations en Hg(II), des temps d'incubation et des répliques, l'expression du gène *gyrB* était en moyenne de  $26.93 \pm 0.83$  Ct. L'ensemble de ces contrôles nous a permis d'appliquer la méthode 'Delta delta Ct' (voir Chapitre II Partie 4.3.).

Les résultats du niveau d'induction du gène *arsR* ont montré un effet de la concentration en Hg(II) et du temps d'exposition (Figure V-10): (i) pour les concentrations testées les plus faibles (de 0.0005  $\mu\text{M}$  à 0.05  $\mu\text{M}$  de Hg(II)), une répression du gène *arsR* a été mesurée augmentant avec le temps d'exposition, (ii) lors de l'augmentation de la concentration en Hg(II) (de 0.5  $\mu\text{M}$  à 5  $\mu\text{M}$ ), les niveaux sont basals et finalement, (iii) en présence de 25  $\mu\text{M}$  de Hg(II), les niveaux d'induction d'*arsR* ont affiché de nouveau une tendance à la répression du gène mais diminuant avec le temps d'exposition.



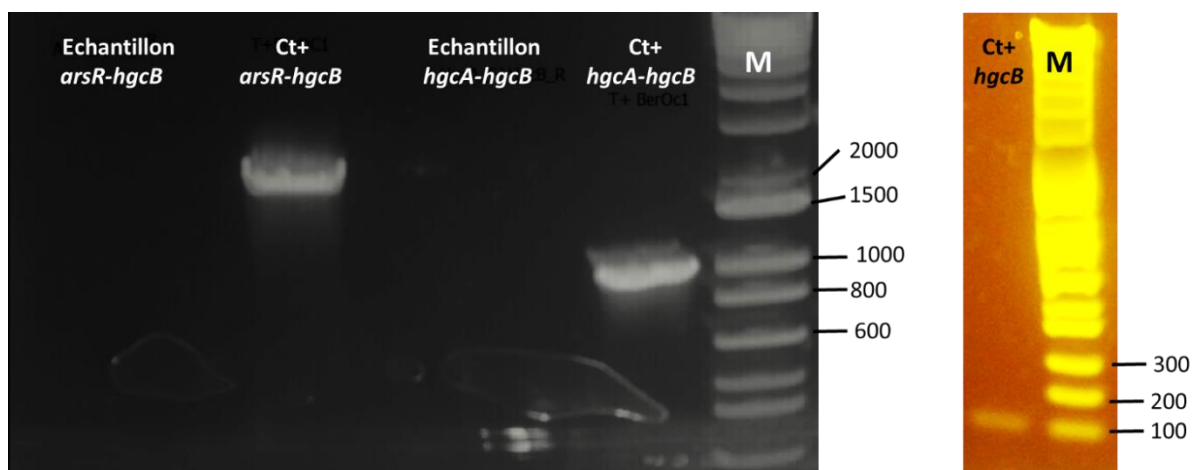
**Figure V-10** : Expression du gène *arsR* chez la souche *P. hydrargyri* souche BerOc1 sauvage. Le Hg(II) a été ajouté suivant une gamme de concentration allant de 0.0005  $\mu\text{M}$  à 25  $\mu\text{M}$  dans une culture de BerOc1 en début de phase exponentielle de croissance et incubée à 37°C durant 8 (blanc), 37 (gris intermédiaire) ou 94 minutes (gris foncé). Un contrôle non exposé au Hg(II) (0  $\mu\text{M}$ ) a été réalisé. L'expression du gène *arsR* a été reportée à l'expression du gène *gyrB* codant une ADN gyrase par la méthode 'Delta delta Ct'. Les barres d'erreur représentent l'écart type issu de trois cultures indépendantes. Les lignes en pointillé représentent une surexpression à 2 (Surexpression) et une répression à 0.5 (Répression).

La présence de Hg(II) semble donc induire la répression du gène *arsR* jusqu'à des concentrations de 0.05  $\mu\text{M}$  de Hg(II). Ces résultats associés au lien génomique existant entre *arsR* et les gènes *hgcA* et *hgcB* suggèrent que cette protéine est un régulateur transcriptionnel répondant au Hg(II) impliqué dans la méthylation du mercure.

### 2.1.3. Coexpression du gène *arsR* au sein du cluster *arsRhgcAhgcB*

Alors qu'un lien entre les gènes *arsR* et *hgcA* a précédemment été mis en évidence (Goñi-Urriza et al. 2020 et **Partie 2.1.1.4.**), cette étude a de plus visé à déterminer si le gène *hgcB* appartenait à la même unité transcriptionnelle.

Dans ce but, des expériences de RT PCR ont été réalisées sur les ARN totaux extraits de cultures de la souche BerOc1 sauvage exposée à 0.05  $\mu\text{M}$  de Hg(II) pendant 1 heure. Ces expériences ont montré que, *arsR* et *hgcB* tout comme *hgcA* et *hgcB* ne sont pas co transcrits alors que le transcrit *hgcB* est bien présents dans ces échantillons (Ct+ *hgcB*, **Figure V-11**). Nos résultats sont en accord avec de précédentes études montrant que chez des souches méthylantes (i) la délétion du gène *hgcA* n'entraîne pas la perte du transcrit *hgcB* (Parks et al. 2013), (ii) un promoteur, différent de celui des gènes *arsR-hgcA*, est prédit en amont du gène *hgcB* (Smith et al. 2015) et, (iii) les gènes *hgcA* et *hgcB* peuvent être retrouvés séparés par plusieurs kb chez certaines souches méthylantes sans affecter la capacité à méthyler le mercure (Goñi-Urriza et al. 2020).



**Figure V-11** : Co expression du gène *hgcB* au sein du cluster *arsRhgcAhgcB*. Couple *arsR-hgcB* : taille attendue 1777 pb. Couple *hgcA-hgcB* : taille attendue 933 pb. Les contrôles positifs (Ct+) pour les couples *arsR-hgcB* et *hgcA-hgcB* ont été réalisés sur l'ADN génomique de la souche BerOc1. Le contrôle positif *hgcB* (Ct+ *hgcB*, taille attendue : 104 pb) a été réalisé sur les ADNc exposés à 0.05  $\mu\text{M}$  de Hg(II) durant 1 heure (échantillon). M : Marqueur de taille (2log Ladder, Ozyme®).

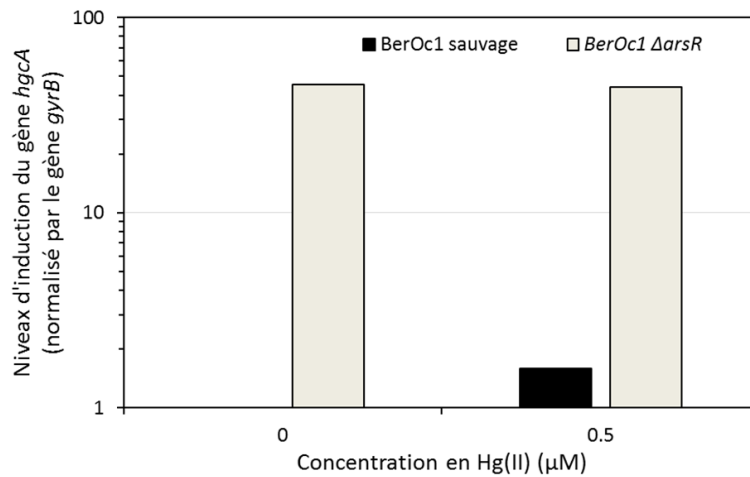


## 2.2. Etude du mutant *arsR*

La délétion du couple de gènes *hgcAhgcB* ou d'un seul de ces deux gènes chez *P. mercurii* ND132 ou chez *G sulfurreducens* PCA n'entraîne pas de diminution de croissance des souches mutantes comparées aux souches sauvages en l'absence de Hg (Parks et al. 2013). Néanmoins, l'effet de la délétion du gène codant ArsR n'est pas connu. Ainsi, une étude physiologique décrivant la croissance, le temps de doublement et la morphologie cellulaire en absence et en présence de mercure a été réalisée sur une souche de BerOc1 délétée pour le gène *arsR*. Etant donné le lien génomique existant entre le gène *arsR* et les gènes *hgcAhgcB* (Goñi-Urriza et al. 2020), les différents paramètres mesurés ont été comparés à la souche BerOc1 délétée pour le gène *hgcB* en plus d'être comparés à la souche BerOc1 sauvage.

### 2.2.1. Expression du gène *hgcA* chez la souche *P. hydrargyri* BerOc1 $\Delta$ *arsR*

Le niveau d'induction du gène *hgcA* a été évalué chez la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR*. Les résultats ont montré une surexpression du gène *hgcA* d'un facteur 45 chez la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* comparée à la souche BerOc1 sauvage quelle que soit l'exposition au Hg(II) (**Figure V-12**). Il est à noter que la construction réalisée dans le but de déléter le gène *arsR* a été réalisée de telle sorte que le promoteur de la spectinomycine se trouve orienté dans le sens de transcription du gène *hgcA* et qu'aucune séquence de terminaison de la transcription n'est présente dans la cassette de recombinaison. Pour rappel, aucun autre promoteur n'a été identifié en amont d'*hgcA* à part celui retrouvé en amont d'*arsR* et de plus, les deux gènes sont co transcrits (Goñi-Urriza et al. 2020). La souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* a donc probablement le gène *hgcA* sous le contrôle du promoteur de la spectinomycine, un promoteur fort, induisant des niveaux de transcription élevés. La souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* est donc délétée pour le gène *arsR* et, en plus de cette délétion, elle surexprime le gène *hgcA* de manière importante.



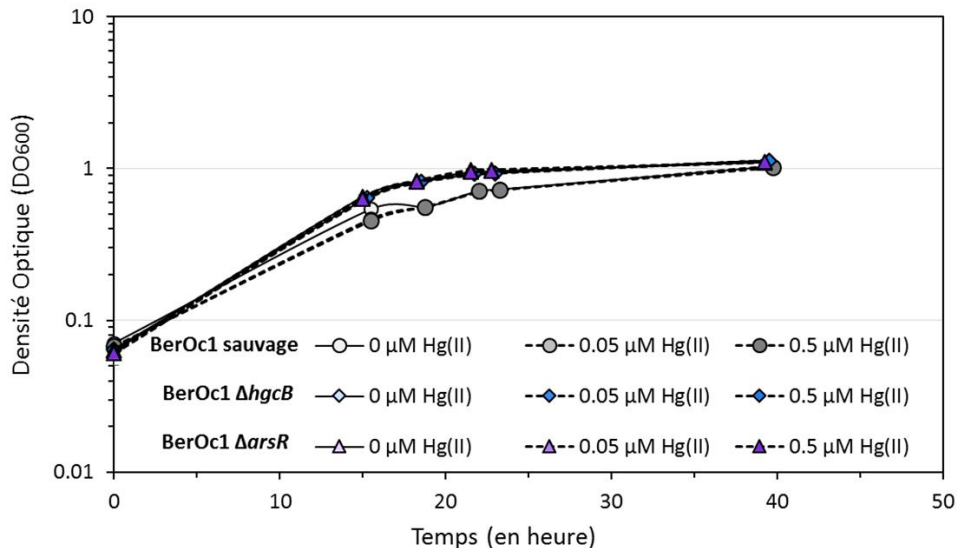
**Figure V-12** : Expression du gène *hgcA* chez les souches BerOc1 sauvage (noir) et BerOc1  $\Delta$ *arsR* (gris). Le Hg(II) a été ajouté à 0.5  $\mu$ M final dans une culture de BerOc1 au moment de l'inoculation de la souche (Ti) incubée à 37°C jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance (16 heures environ). Un contrôle non exposé au Hg(II) (0  $\mu$ M) a été réalisé. L'expression du gène *hgcA* a été reportée à l'expression du gène *gyrB*. L'ensemble des niveaux d'induction ont été calculés par rapport au niveau d'expression du contrôle non exposé obtenu pour la souche BerOc1 sauvage.

### 2.2.2. Physiologie de la souche *P. hydrargyri* BerOc1 $\Delta$ *arsR* : comparaison avec BerOc1 sauvage et BerOc1 $\Delta$ *hgcB*

La caractérisation physiologique des souches BerOc1  $\Delta$ *arsR* et BerOc1  $\Delta$ *hgcB* a été réalisée en absence de mercure ainsi qu'en présence de 0.05 et 0.5  $\mu$ M de Hg(II) afin d'évaluer la sensibilité des souches mutantes au Hg(II). Les résultats ont montré que les deux souches mutantes présentent une croissance sans phase de latence donnant lieu à des productions de biomasse équivalentes à celles de la souche sauvage (1.076  $\pm$  0.03 DO pour les souches mutantes contre 1.013  $\pm$  0.03 pour la souche sauvage) mais, des temps de doublement légèrement inférieurs ont été observés (4h31min  $\pm$  9 min pour les souches mutantes contre 5h34min  $\pm$  10 min pour la souche sauvage, **Figure V-13**). Aucune sensibilité au Hg(II) pour les concentrations testées n'a pu être mise en évidence chez les souches mutantes (**Figure V-13**) : la production de biomasse (1.070  $\pm$  0.02 DO) et le temps de doublement (4h31min  $\pm$  7 min) mesurés suite à l'exposition la plus forte (0.5  $\mu$ M Hg(II)) ne diffèrent pas significativement de ceux mesurés en absence d'exposition (1.053  $\pm$  0.02 DO et 4h32min  $\pm$  7 min). L'observation microscopique a de plus révélé que les souches mutantes ont perdu la capacité de motilité, caractéristique de la souche *P. hydrargyri* BerOc1 sauvage (Ranchou-Peyruse et al. 2018) mais aussi d'autres bactéries du genre *Desulfovibrio* et *Pseudodesulfovibrio* (Feio 2004; Gilmour et al. 2011; Cao et al. 2016).

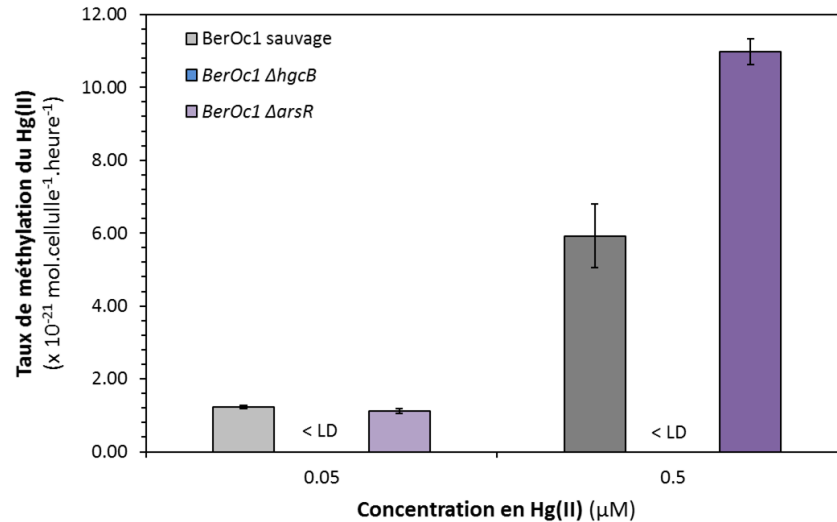


Alors que la souche *BerOc1 ΔarsR* semble se distinguer de la souche *BerOc1* sauvage au niveau des temps de doublement et de la motilité, elle ne semble en revanche pas se distinguer de la souche *BerOc1 ΔhgcB*. En effet, les productions de biomasse, les temps de doublement et la perte de la motilité sont similaires entre les deux souches mutantes. L'homologie physiologique existant entre la souche *BerOc1 ΔarsR* et la souche *BerOc1 ΔhgcB* pourrait suggérer un lien étroit entre le rôle de la protéine *ArsR* et celui de la protéine *HgcB* en accord avec l'importance de l'organisation synténique du cluster *arsRhgcAhgcB*, bien que *hgcB* ne soit pas co transcrit avec les autres gènes du cluster.



**Figure V-13** : Croissance en absence et présence de Hg(II) des souches *BerOc1* sauvage (gris), *BerOc1 ΔhgcB* (bleu) et *BerOc1 ΔarsR* (violet). Les souches ont été cultivées en milieu riche favorisant la respiration fumarate : milieu MM<sub>10</sub> avec 40 mM de Pyruvate et 40 mM de Fumarate en tant que donneur et accepteur d'électrons respectivement, 0.5 mM de sulfate en tant que source de soufre et 1 g/L d'extrait de levure (YE). Les expositions au Hg(II) à 0.05 μM et 0.5 μM ont été faites au moment de l'inoculation (Ti). Les barres d'erreur représentent l'écart type calculé à partir de quatre répliques de cultures indépendantes pour les conditions en présence de 0.05 et 0.5 μM de Hg(II) et sont cachées par la symbolique. Le contrôle non exposé au Hg(II) a été réalisé sur une culture par ajout d'eau au moment de l'inoculation (Ti).

En revanche, la méthylation du mercure résultant de la souche *BerOc1 ΔarsR* diffère drastiquement de celle de la souche *BerOc1 ΔhgcB* (**Figure V-14**). Comme attendu, le mutant *hgcB* a perdu la capacité à méthyler le mercure, tandis que pour la souche *BerOc1 ΔarsR*, les taux de méthylation sont équivalents à ceux de la souche *BerOc1* sauvage lors d'une exposition à 0.05 μM de Hg(II) et environ deux fois plus importants lors d'une exposition à 0.5 μM de Hg(II). Il apparaît que les taux de méthylation chez la souche *BerOc1 ΔarsR* se maintiennent avec l'augmentation de la concentration en Hg(II) ajouté : un facteur 10 dans l'exposition au Hg(II) augmente d'un facteur 10 les taux de méthylation. L'absence de la protéine *ArsR* couplée à la surexpression de *hgcA* conduit donc à une production plus importante de méthylmercure chez la souche *P. hydrargyri BerOc1*, spécifiquement en présence de concentrations de mercure élevées.



**Figure V-14** : Taux de méthylation des souches BerOc1 sauvage (gris), BerOc1  $\Delta hgcB$  (bleu) et BerOc1  $\Delta arsR$  (violet). Les souches ont été cultivées en respiration fumarate en milieu riche : milieu MM<sub>10</sub> avec 40 mM de Pyruvate et 40 mM de Fumarate en tant que donneur et accepteur d'électrons respectivement, 0.5 mM de sulfate en tant que source de soufre et 1 g/L d'extrait de levure (YE). Chacune des souches a été exposée à 0.05 μM (gris intermédiaire, bleu intermédiaire et violet intermédiaire) et à 0.5 μM (gris foncé, bleu foncé et violet foncé) de Hg(II) consécutivement à l'inoculation de la souche (Ti) puis, incubée à 37°C jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance (Tf, environ 24 heures). Les barres d'erreur représentent l'écart type provenant de trois cultures indépendantes. LD : Limite de détection.

Ces résultats, obtenus lors de fortes expositions au mercure, suggèrent qu'une étape limitante de la méthylation du mercure a été supprimée lors de la construction de la souche BerOc1  $\Delta arsR$ . Cependant, la souche BerOc1 sauvage possède la capacité à méthyler et à déméthyle le mercure simultanément. Il est donc important de réaliser une caractérisation plus fine quant à l'effet de la délétion du gène *arsR* couplée à la surexpression de *hgcA* sur la résistance et sur les transformations de mercure (méthylation de Hg(II) mais également déméthylation de MeHg).

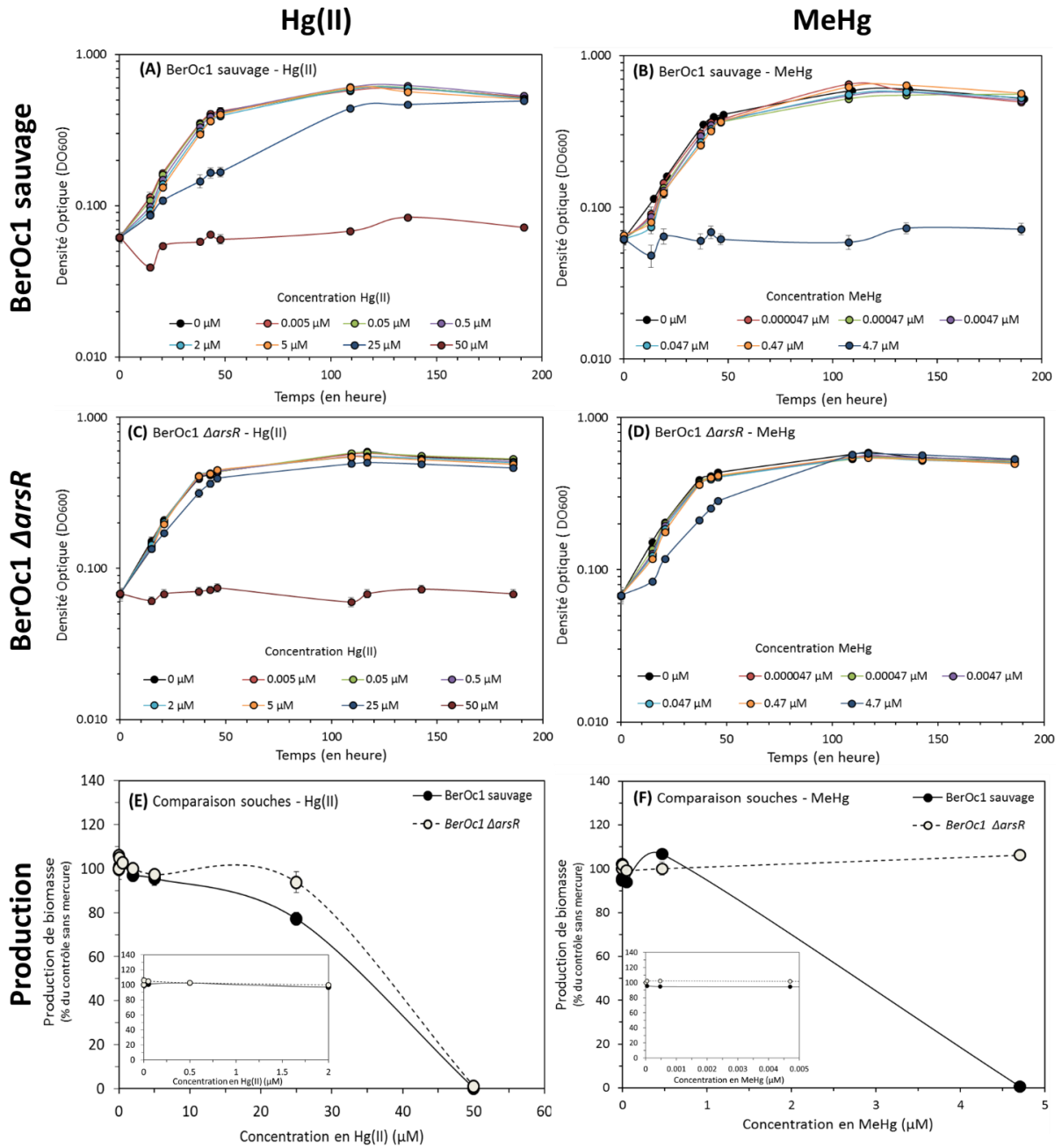
### 2.2.3. Sensibilité au Hg(II) et au MeHg de la souche BerOc1 $\Delta$ arsR

La sensibilité de la souche BerOc1  $\Delta$ arsR au Hg(II) et au MeHg comparée à celle de la souche BerOc1 sauvage a été mesurée. Pour cela, les souches ont été exposées, consécutivement à l'inoculation de la souche, à une large gamme de concentrations de Hg(II) allant de 0.005  $\mu$ M à 50  $\mu$ M ou, une large gamme de concentration de MeHg allant de 0.000047  $\mu$ M à 4.7  $\mu$ M. La gamme de concentration en MeHg choisie est dix fois moins élevée que celle en Hg(II) en accord avec le ratio Hg(II)/MeHg retrouvé dans la plupart des environnements et avec le niveau de toxicité du MeHg comparé au Hg(II) (Isaure et al. 2020).

La croissance de la souche BerOc1 sauvage en milieu minimum (MM<sub>10</sub>PFCys) et en présence de Hg(II) à des concentrations entre 0.005  $\mu$ M à 5  $\mu$ M n'est pas affectée, puisque la production de biomasse (mesurée au bout de 136 heures de croissance) et l'allure de la croissance sont similaires (**Figure V-15A**) L'exposition à 25  $\mu$ M a affecté la production de biomasse de cette souche mais a surtout affecté l'allure de sa croissance. Finalement, l'exposition à 50  $\mu$ M a complètement aboli la croissance de la souche. Ainsi, la souche BerOc1 sauvage est capable de résister complètement jusqu'à 5  $\mu$ M de Hg(II), concentrations déjà largement supérieures à celles retrouvées dans les environnements naturels, mais résistent aussi, plus difficilement, jusqu'à une exposition de 25  $\mu$ M de Hg(II) dans les conditions de croissance étudiées.

La souche BerOc1  $\Delta$ arsR, comme la souche BerOc1 sauvage, n'a pas montré de sensibilité au Hg(II) jusqu'à une exposition de 5  $\mu$ M et a montré une abolition de la croissance suite à une exposition à 50  $\mu$ M de Hg(II) (**Figure V-15C**). Cependant, alors que l'allure de la croissance était différente chez la souche BerOc1 sauvage suite à une exposition à 25  $\mu$ M de Hg(II), cette exposition n'a pas affecté l'allure de la croissance chez la souche BerOc1  $\Delta$ arsR (**Figure V-15C**). Ainsi, la souche BerOc1  $\Delta$ arsR semble présenter une résistance légèrement plus importante au Hg(II) que la souche BerOc1 sauvage (**Figure V-15E**).

D'autre part, l'exposition au MeHg chez la souche BerOc1 sauvage a permis d'observer une résistance de cette souche pour des expositions débutant à 0.000047  $\mu$ M et allant jusqu'à 0.47  $\mu$ M alors que l'exposition à 4.7  $\mu$ M de MeHg abolit complètement la croissance de la souche (**Figure V-15B, Figure V-15F**). Finalement, les mêmes expériences ont montré que la souche BerOc1  $\Delta$ arsR ne présentait pas de sensibilité jusqu'à des expositions de 0.47  $\mu$ M, de manière identique à la souche BerOc1 sauvage, mais pas non plus lors de l'exposition à 4.7  $\mu$ M de MeHg (**Figure V-15D, Figure V-15F**). Cette concentration élevée en MeHg a tout de même affecté l'allure de la croissance comparée aux expositions plus faibles, avec un temps de latence de 17 heures, mais un temps de doublement similaire (**Figure V-15D**).



**Figure V-15** : Croissance de la souche BerOc1 sauvage (**A et B**) et de la souche BerOc1  $\Delta arsR$  (**C et D**) exposées à des concentrations de Hg(II) allant de 0.005  $\mu\text{M}$  à 50  $\mu\text{M}$  (**A et C**) et de MeHg allant de 0.000047  $\mu\text{M}$  à 4.7  $\mu\text{M}$  (**B et D**). L'exposition au mercure a été réalisée consécutivement à l'inoculation de la souche (Ti). Des contrôles sans Hg(II) et sans MeHg ont été menés en remplaçant l'ajout de mercure par de l'eau milliQ dégazée. Production de biomasse par les souches BerOc1 sauvage (**E**) et BerOc1  $\Delta arsR$  (**F**). La production de biomasse en absence de mercure a servi de valeur de référence (100%) pour évaluer la sensibilité/résistance de chaque souche. Les barres d'erreur représentent l'écart type mesuré sur quatre répliques de cultures indépendantes. **E et F** : les inserts en bas à gauche des figures permettent de visualiser la production de biomasse lors des faibles expositions en mercure.

#### 2.2.4. Méthylation du Hg(II) et déméthylation du MeHg chez la souche BerOc1 $\Delta$ *arsR*

Les tests de sensibilité aux Hg(II) et au MeHg des souches BerOc1 sauvage et BerOc1  $\Delta$ *arsR* ont permis de prélever des échantillons afin de mesurer les taux de méthylation (exposition Hg(II)) et de déméthylation (exposition MeHg) pour chaque concentration testées. Les échantillons ont été prélevés à la fin de la première phase de croissance (environ 48 heures, **Figure V-15**). En absence de croissance (exposition à 50  $\mu$ M de Hg(II) pour les deux souches et exposition à 4.7  $\mu$ M de MeHg pour la souche BerOc1 sauvage) les taux de méthylation et de déméthylation n'ont pas été mesurés. De plus, les taux de déméthylation lors de l'exposition à 0.000047  $\mu$ M de MeHg n'ont pas pu être calculés rigoureusement en raison d'une contamination en Hg(II) qui biaise les résultats dans cette condition.

Les taux de méthylation de la souche BerOc1 sauvage ont augmenté avec l'augmentation de la concentration en Hg(II) excepté entre les expositions à 5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M de Hg(II) (**Figure V-16A**). Ainsi, chez la souche BerOc1 sauvage, une corrélation positive et linéaire entre les taux de méthylation et la concentration en Hg(II) ajouté a été mise en évidence jusqu'à 5  $\mu$ M de Hg(II) ajouté (Pearson : cor = 0.9545, p value 3.32e<sup>-08</sup>, R<sup>2</sup> = 0.8343). Un taux de méthylation maximal a ainsi été atteint à partir de 5  $\mu$ M de Hg(II) ajouté et a été estimé à  $6.1 \pm 0.9 \times 10^{-21}$  mol de méthylmercure produits par cellule et par heure. Ce taux maximal est environ 6 fois plus important que celui mesuré dans le **chapitre IV** dans les mêmes conditions de croissance (respiration fumarate supplémentée avec 0.1 mM de cystéine exposé à 5  $\mu$ M de Hg(II)) certainement dû à un temps d'exposition au Hg(II) différent entre les deux expérimentations (temps d'exposition du Chapitre IV de 60 heures comparé à 48 heure ici).

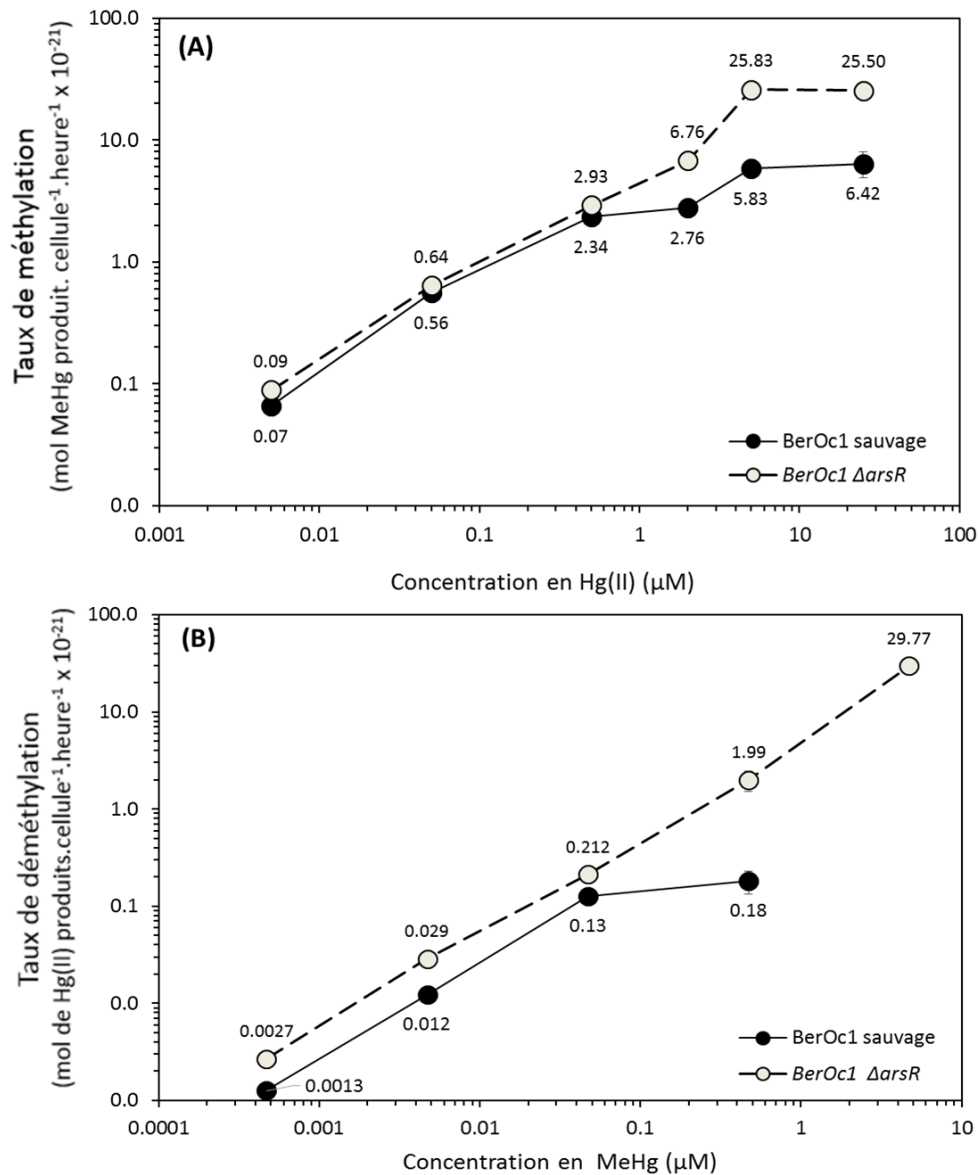
Tout comme la souche BerOc1 sauvage, les taux de méthylation de la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* ont augmenté avec l'augmentation de la concentration en Hg(II) ajouté (Pearson : cor = 0.9864, p value = 1.391e<sup>-11</sup>, R<sup>2</sup> = 0.9753), jusqu'à une exposition à 5  $\mu$ M de Hg(II) (**Figure V-16A**). Un taux de méthylation maximal semble ainsi être atteint à partir de 5  $\mu$ M de Hg(II) ajouté ; ce taux a été estimé à  $25.7 \pm 2.0 \times 10^{-21}$  mol de méthylmercure produits par cellule et par heure. Globalement, les valeurs équivalentes des taux de méthylation entre 5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M de Hg(II) suggèrent une saturation du mécanisme de méthylation du mercure à partir de 5  $\mu$ M de Hg(II) ajouté quelle que soit la souche testée, comme cela a déjà été démontré dans d'autres conditions de croissance pour la souche BerOc1 sauvage (*Isaure et al. 2020*). Cette saturation correspond à la concentration pour laquelle la sensibilité au Hg(II) commence à se manifester chez les deux souches (**Figure V-15A, Figure V-15C, Figure 15-E**).

La comparaison entre les deux souches montrent que les taux de méthylation de la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* sont similaires à ceux de la souche BerOc1 sauvage jusqu'à 0.5  $\mu$ M de Hg(II) ajouté mais deviennent systématiquement supérieurs à ceux réalisés par la souche BerOc1 sauvage pour des

expositions plus élevées (**Figure V-16A**). Ces résultats suggèrent que la surexpression d'*hgcA* chez la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* conduit à l'augmentation des taux de méthylation du mercure chez cette souche au-delà de 0.5  $\mu$ M. Cependant, de manière surprenante, la surexpression d'*hgcA* ne conduit pas à l'augmentation de la méthylation pour des concentrations inférieures à 0.5  $\mu$ M et de plus, une saturation de la méthylation est tout de même observée à partir de 5  $\mu$ M. Ainsi, il semblerait qu'à partir de 0.5  $\mu$ M de Hg(II) un mécanisme différent soit déclenché pour répondre au mercure. De plus, ces résultats mettent en évidence que la saturation du mécanisme du mercure n'est pas dépendante de l'expression d'*hgcA* ou de la présence d'ArsR mais d'un autre mécanisme non élucidé.

D'autre part, les taux de déméthylation de la souche BerOc1 sauvage exposée au MeHg ont aussi augmenté avec l'augmentation de la concentration en MeHg jusqu'à 0.047  $\mu$ M (**Figure V-16B**, Pearson : cor = 0.9920, p value =  $1.498e^{-07}$ ,  $R^2 = 1$ ), concentration au-dessus de laquelle ces taux de déméthylation semblent saturer à hauteur de  $0.15 \pm 0.04 \times 10^{-21}$  mol de Hg(II) produits par cellule et par heure. En revanche, de manière très intéressante, les taux de déméthylation de la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* ne semblent pas saturer avec l'augmentation de la concentration en MeHg ajouté (Pearson : cor = 0.9879, p value =  $2.961e^{-10}$ ,  $R^2 = 0.9986$ ) (**Figure V-16B**). De plus, les taux de déméthylation déterminés pour la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* ont été, quelle que soit la concentration en MeHg ajoutée, supérieurs à ceux mesurés par la souche BerOc1 sauvage.

Alors que des taux de méthylation supérieurs étaient attendus chez la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* en raison de la surexpression de l'enzyme clé de la méthylation du mercure, la capacité accrue de cette souche à déméthylmer le méthylmercure est inattendue et expliquerait de plus la capacité de la souche BerOc1  $\Delta$ *arsR* à résister à de très fortes concentrations en MeHg (**Figure V-15D, Figure V-15F**).



**Figure V-16** : Taux de méthylation (A) et de déméthylation (B) chez la souche *BerOc1 ΔarsR* (gris) et la souche *BerOc1 sauvage* (noir). Les cultures ont été incubées en présence de Hg(II) ou de MeHg dès le moment de l'inoculation de la souche. Les échantillons ont été prélevés à Ti (inoculation) et à la fin de la première phase de croissance (environ 48 heures) afin de mesurer les concentrations en Hg(II) et MeHg par GC-ICP-MS. Les barres d'erreur, calculées à partir de trois cultures indépendantes, sont souvent cachées par les symboles.

### 2.3. Expression hétérologue du cluster *arsRhgcAhgcB* chez une bactérie non méthylante

Dans le but de déterminer si le cluster de gènes *arsRhgcAhgcB* de la souche méthylante *P. hydrargyri* BerOc1 est suffisant pour conférer la capacité à méthyler le mercure, une stratégie d'expression hétérologue dans la bactérie sulfato réductrice non méthylante *Desulfovibrio alaskensis* souche G20 (CP\_000112) a été réalisée. Le cluster *arsRhgcAhgcB* de la souche BerOc1 a été cloné dans le plasmide pBMK7 puis la construction a été transformée dans la souche G20 (**voir Chapitre II Partie 3.3.**). La souche ayant reçu le plasmide a été appelée : G20+pK7.

La capacité à méthyler le mercure chez la souche G20 +pK7 en a été déterminée, et comparée d'une part avec la souche G20 sauvage, utilisée en tant que contrôle négatif de la méthylation du mercure et d'autre part, avec la souche BerOc1 sauvage, utilisée en tant que contrôle positif de la méthylation du mercure. Etant donné que les conditions métaboliques et la production de sulfure jouent un rôle déterminant dans la production de méthylmercure (**Chapitre IV**) toutes les souches (BerOc1 sauvage, G20 sauvage et G20+pK7) ont été cultivées dans les mêmes conditions à savoir en respiration sulfate dans le même milieu : milieu MM supplémenté avec 40 mM de pyruvate et 40 mM de sulfate. Chaque souche a été exposée à différentes concentrations en Hg(II) simultanément à l'inoculation (Ti) et la concentration de méthylmercure a été mesurée en fin de phase exponentielle de croissance (Tf). Les souches G20 sauvage et G20+pK7 ont été exposées à 0.05 µM, 0.5 µM et 2 µM de Hg(II) et la souche BerOc1 sauvage à 0.05 µM et 2 µM de Hg(II).

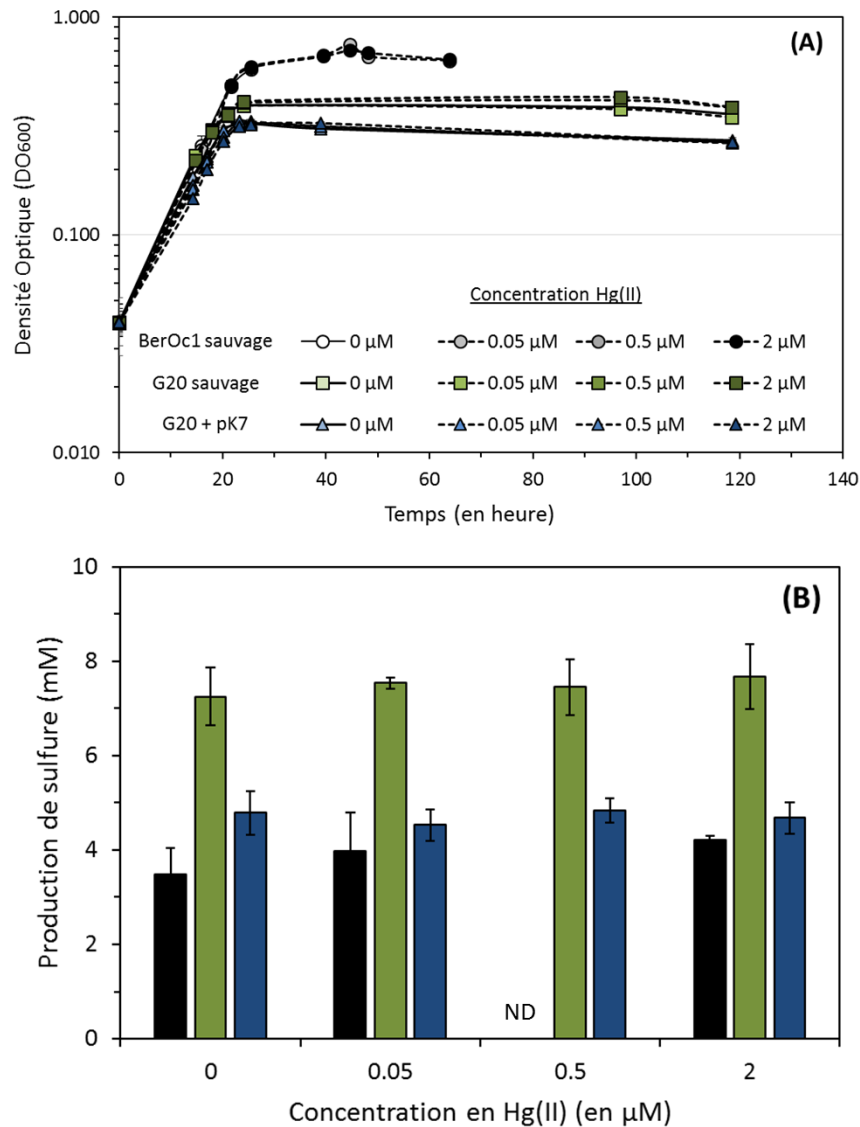
#### 2.3.1. Contrôles physiologiques : croissance et concentration en sulfure

Des études physiologiques sur les souches testées ont tout d'abord été réalisées afin de valider les conditions expérimentales pour l'étude de la méthylation du mercure. Ces études ont consisté à évaluer l'effet de la concentration de Hg(II) sur la production de biomasse et sur la production de sulfure pour chacune des souches.

Tout d'abord, pour l'ensemble des souches testées, les résultats montrent (i) des temps de doublement faibles avec un plateau atteint après environ 24 heures de croissance (**Figure V-17A**) et (ii) une production de sulfure de l'ordre du millimolaire (**Figure V-17B**). Ces caractéristiques physiologiques suggèrent fortement que la croissance de l'ensemble des souches testées s'est déroulée, comme attendue, en respiration sulfate. D'autre part, les résultats de croissance montrent que quelle que soit la souche, la production de biomasse n'est pas impactée par le Hg(II) aux concentrations testées (**Figure V-17A**). Les mêmes conclusions sur l'effet du Hg(II) ont été faites concernant la production de sulfure (**Figure V-17B**). Néanmoins, une différence a été observée dans la production de sulfure entre la souche G20 sauvage ( $7.5 \pm 0.5$  mM) et la souche G20 + pK7 ( $4.7 \pm 0.3$



mM) alors que la production de biomasse était équivalente ( $0.361 \pm 0.009$  et  $0.287 \pm 0.009$  respectivement). Toutefois, la production de sulfure par la souche G20+pK7 similaire à celle de la souche BerOc1 sauvage permet d'avoir des conditions équivalentes en matière de concentration de sulfure pour analyser la méthylation du mercure.

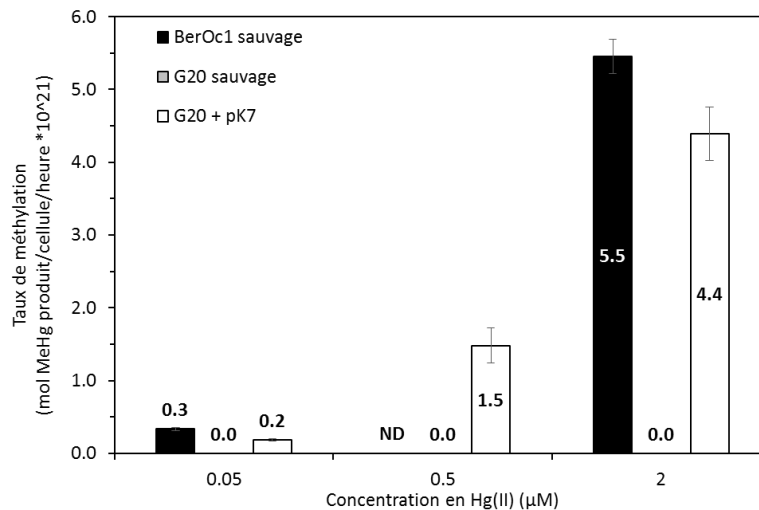


**Figure V-17** : Croissance (A) et production de sulfure (B) des souches BerOc1 sauvage (noir), G20 sauvage (vert) et G20 + pK7 (bleu) selon la concentration d'exposition au Hg(II) (0 μM ; 0.05 μM ; 0.5 μM et 2 μM). Les cultures ont été préparées afin de favoriser un métabolisme de respiration du sulfate (40:40mM Pyruvate-Sulfate). Les barres d'erreur représentent l'écart type calculés à partir de trois répliques indépendants. Sur les courbes de croissance, les barres d'erreur sont représentées mais cachées par les symboles. ND: Valeur non déterminée.

### 2.3.2. Méthylation du mercure par la souche G20+pK7

L'expression des gènes *arsRhgcAhgcB* par la souche G20 ne semble pas affecter la production de biomasse ni sa sensibilité au Hg(II) aux concentrations étudiées, permettant ainsi de réaliser une étude sur la méthylation du mercure. Les concentrations de méthylmercure produit ont été quantifiées pour chacune des souches par différence entre la concentration en MeHg mesurée en fin de phase exponentielle de croissance (Tf) et la concentration en MeHg mesurée au moment de l'exposition au Hg(II) (Ti). Etant donné que toutes les souches ont atteint le plateau de croissance environ 24 heures après l'inoculation, les prélèvements correspondants à la fin de la phase exponentielle de croissance ont été réalisés durant la même fourchette de temps pour toutes les souches (souche BerOc1 sauvage : 25h25min ; souche G20 sauvage : 24h05min et souche G20 + pK7 : 25h25). Au vu des différences de productions de biomasse, les concentrations de méthylation produites ont été normalisées par rapport au nombre de cellules à Tf (déterminé par cytométrie en flux).

Tout d'abord, comme attendu, les résultats confirment que la souche G20 sauvage n'est pas capable de méthyler le mercure contrairement à la souche BerOc1 sauvage (**Figure V-18**). De manière remarquable, la souche G20 transformée avec le plasmide pK7 est capable de méthyler le mercure même si les taux de méthylation sont légèrement inférieurs à ceux de BerOc1 sauvage. Comme pour BerOc1, ces taux augmentent avec l'augmentation de l'exposition au Hg(II). Il apparaît donc que le cluster de gènes *arsRhgcAhgcB* est capable de conférer la capacité à méthyler le mercure chez une souche non méthylophile telle que *D. alaskensis* G20.



**Figure V-18** : Taux de méthylation des souches BerOc1 sauvage, G20 sauvage et G20 + pK7. Les souches ont été inoculées en sulfato réduction (40mM:40mM Sulfate:Pyruvate) et consécutivement exposées à 0.05, 0.5 et 2 μM de Hg(II) (Ti). Afin de quantifier les concentrations de méthylmercure, les échantillons ont été prélevés au moment de l'exposition au Hg(II) (Ti) et en fin de phase exponentielle de croissance (environ 24 heures, Tf). Les barres d'erreur représentent l'écart type calculé à partir de trois cultures indépendantes.

### 3. Conclusions et discussions

#### 3.1. La protéine ArsR : une réponse spécifique au mercure pour réguler la méthylation du Hg(II) ?

Dans ce chapitre, une étude sur la protéine ArsR codée par le gène *arsR* retrouvé au sein du cluster de gènes *arsRhgcAhgcB* et son rôle putatif dans la méthylation du mercure a été réalisée. Premièrement, les analyses *in silico* sur la protéine ArsR de la souche BerOc1 ont permis de déterminer qu'elle présentait toutes les caractéristiques structurales (domaine de liaison à l'ADN, motifs de liaison aux métaux, structures secondaire et tertiaire) permettant de la classer comme membre de la famille de régulateurs transcriptionnels ArsR-SmtB. Ces analyses ont plus précisément permis de la classer au sein du groupe  $\alpha 3$  et de la classe  $\alpha 35$  grâce à deux motifs de liaison des métaux : CxCx en  $\alpha 3$  et CxC en  $\beta 2$ . Aucune étude n'a été réalisée sur les protéines de cette classe afin de caractériser le mode d'action et les métaux pouvant se fixer. Ainsi, cette classification de la protéine ArsR de BerOc1 au sein de la famille ArsR-SmtB ne nous permet pas de faire des hypothèses sur les métaux fixés par cette dernière, caractéristique essentielle pour mieux comprendre son rôle. Cependant, au regard d'une précédente étude ayant montré une cotranscription des gènes *arsR* et *hgcA* (Goñi-Urriza et al. 2020) et de l'implication d'HgcA dans la méthylation du Hg(II) (Parks et al. 2013), nous avons émis l'hypothèse que la protéine ArsR pourrait répondre au Hg(II). Nous avons ainsi pu montrer que l'expression du gène *arsR* chez la souche BerOc1 sauvage répondait effectivement au Hg(II). Cependant, alors que les autres membres de la famille ArsR-SmtB fonctionnent selon un mode d'action dit de « dé-répression » (**voir Chapitre I Partie 3.2.2.1.**), c'est-à-dire une inhibition de l'expression des gènes régulés en absence du métal et, une dé-répression entraînant l'induction de l'expression des gènes régulés en présence du métal, la présence de Hg(II) semble à l'inverse conduire à la répression du gène *arsR* avec un effet dose-réponse. De manière globale, les membres de la famille ArsR-SmtB peuvent fixer différents métaux. Par exemple, le gène *arsR* associé à l'opéron *mer* chez la bactérie *Tenacibaculum discolor* 9A5 est inductible à la fois au Hg(II) mais aussi au l'As(III) et au Cd(II) (Allen et al. 2013). Chez d'autres souches méthylantes, la réponse de la méthylation du mercure sous l'effet de différents métaux a été testée et révèle que le cuivre (jusqu'à 75 nM (Lu et al. 2018)), le cobalt, le nickel et le fer (à 50  $\mu$ M (Schaefer et al. 2014)) favorisent la méthylation du mercure par des bactéries méthylantes alors que le zinc et le cobalt (à 50  $\mu$ M (Schaefer et al. 2014)) inhibent ce processus. Ces résultats suggèrent une régulation différente du mécanisme de méthylation du mercure selon le métal en présence ; cette régulation pourrait être réalisée par la protéine ArsR.

Néanmoins, la protéine ArsR de BerOc1 a clairement été prédite comme étant un régulateur transcriptionnel suggérant qu'elle pourrait réguler divers gènes. Dans ce chapitre, les analyses *in silico*

en amont des gènes *arsR* retrouvés chez plusieurs souches méthylantes ont mis en évidence une séquence consensus de 10 nucléotidiques prédite comme étant la séquence de fixation à l'ADN de la protéine ArsR. Cette séquence consensus a été retrouvée en amont de deux gènes, autres que le gène *arsR* lui-même, suggérant qu'ils pourraient être régulés par la protéine ArsR. Un de ces deux gènes code une protéine à clusters Fer-Soufre, pouvant jouer de multiple rôles dans la cellule, alors que le second gène est prédit pour coder une protéine appartenant à la famille des protéines de chimiotaxie acceptant le méthyle (MCP ; Methyl accepting Chemotaxis Protein). Les MCP sont des récepteurs transmembranaires contrôlant la motilité cellulaire (Salah Ud-Din and Roujeinikova 2017). Ils sont la première composante dans la réponse sensorielle et adaptative à un composé chimique afin de modifier le comportement de motilité chez les bactéries (Parales et al. 2015). De manière intéressante, la délétion du gène *arsR* a entraîné une perte de la motilité de la souche BerOc1. Cette perte de motilité a de plus été observée chez la souche BerOc1  $\Delta hgcB$  au cours de notre étude. L'ensemble des analyses *in silico* et expérimentales suggère donc fortement un lien moléculaire entre motilité cellulaire (possiblement liée à la protéine MCP) et le mécanisme de méthylation du mercure impliquant l'ensemble du cluster *arsRhgcAhgcB*.

### 3.2. La protéine ArsR : méthylation du Hg(II) ou déméthylation du MeHg ?

Cette étude a permis de démontrer que la délétion du gène *arsR* n'abolit pas la méthylation du mercure démontrant que la protéine ArsR n'est pas essentielle dans ce mécanisme contrairement aux protéines HgcA et HgcB. Ceci est cohérent avec la diversité existante chez les souches méthylantes puisque certaines de ces souches telles que *Desulfovibrio longus* SEBR2582 ne possèdent pas le gène *arsR* en synténie avec les gènes *hgcAB* et possède tout de même la capacité à méthyler le Hg(II) (Goñi-Urriza et al. 2020). De plus, la surexpression du gène *hgcA* dans la souche BerOc1  $\Delta arsR$ , en raison de la position du gène sous le promoteur fort de la spectinomycine, complexifie la compréhension du rôle de la protéine ArsR dans la méthylation et la déméthylation du mercure. En effet, l'augmentation des taux de méthylation pourrait être due à la quantité plus importante de HgcA dans la souche  $\Delta arsR$  ou à l'absence d'ArsR, qui, dans la souche BerOc1 sauvage, régulerait négativement la production de protéines HgcA (comme attendu pour un régulateur transcriptionnel de la famille ArsR-SmtB).

Bien que des taux de méthylation supérieurs aient été mesurés chez la souche délétée pour le gène *arsR* comparée à la souche sauvage pour des concentrations de Hg(II) supérieures à 0.5  $\mu\text{M}$ , pour de faibles expositions au Hg(II) (< 0.5  $\mu\text{M}$ ), les taux de méthylation sont équivalents à ceux de la souche sauvage suggérant que le mécanisme de méthylation, et plus précisément l'activité de la protéine HgcA, n'est pas limité chez la souche sauvage jusqu'à 0.5  $\mu\text{M}$  de Hg(II). Une exposition à 0.5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) est alors proposée comme une concentration déclenchant un mécanisme conduisant à limiter la méthylation du mercure. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la production de MeHg par

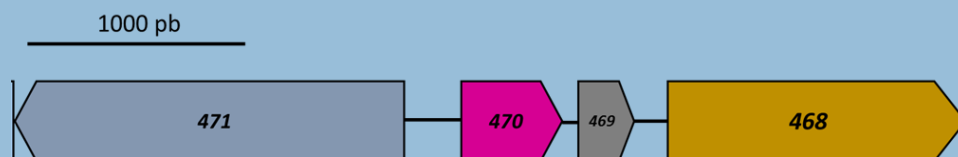
la souche BerOc1  $\Delta arsR$  lors d'exposition au Hg(II), n'a pas eu de conséquence sur sa production de biomasse. En effet, les tests de sensibilité au MeHg ont confirmé une forte capacité de la souche BerOc1  $\Delta arsR$  à résister au MeHg qui semble associée à la forte augmentation de la capacité de cette souche à déméthylmer le méthylmercure alors inattendue. La méthylation et la déméthylation étant réalisées simultanément au sein d'une cellule (Bridou *et al.* 2011; Lu *et al.* 2016; Goñi-Urriza *et al.* 2020), la surexpression de HgcA dans la souche BerOc1  $\Delta arsR$  devrait conduire à une augmentation de la production de MeHg. Ainsi, même lors d'exposition au MeHg, la balance méthylation/déméthylation devrait être favorable à la production de MeHg, et donc une déméthylation plus réduite était attendue, comme observée lors des expositions au Hg(II). A ma connaissance, l'implication des protéines HgcAB dans la déméthylation du MeHg n'a jamais été mise en évidence. Une seule étude montre qu'il n'existe pas de différence entre la souche délétée pour les gènes *hgcAB* et sa souche sauvage (Date *et al.* 2019). Cependant, dans cette étude les taux de déméthylation sont nuls à la fois dans la souche sauvage et dans la souche délétée possiblement en raison du fait que les auteurs mettent en jeu des extraits cellulaires et non pas des cellules entières pour comprendre ce mécanisme. Nos résultats appuient fortement l'hypothèse d'un mécanisme de déméthylation impliquant la fonction du cluster de gènes *arsRhgcAhgcB*, auparavant jamais envisagée. La déméthylation pourrait alors faire appel soit, à l'activité enzymatique de la protéine HgcA qui serait alors une enzyme capable de jouer un rôle dans la méthylation et la déméthylation soit, à la régulation par la protéine ArsR de certains gènes spécifiquement impliqués dans cette réaction de déméthylation.

Finalement, notre étude a démontré que le cluster de gènes *arsRhgcAhgcB* confère à lui seul la capacité à méthyler le mercure lors de son expression chez la bactérie non méthylante *D. alaskensis* G20, capacité jamais mise en évidence auparavant. La diminution de la production de sulfure entraînée par la capacité à méthyler le mercure chez la souche G20+pK7 comparée à la souche G20 sauvage suggère un lien entre le mécanisme de méthylation du mercure et la physiologie cellulaire. D'autre part, même si une des hypothèses serait que l'expression hétérologue des gènes *hgcA* et *hgcB* uniquement pourrait conduire à une souche capable de méthyler le mercure, cette étude a montré que l'organisation synténique du cluster *arsRhgcAhgcB* n'était pas négligeable puisqu'elle conduit à une protéine ArsR spécifiquement de la classe  $\alpha 35$  chez des souches méthylantes. Ainsi, la protéine ArsR retrouvée associée aux protéines HgcA et HgcB apparaît unique pour réguler la réponse aux métaux (potentiellement Hg(II) et MeHg) impactant la méthylation du mercure et pourrait de plus jouer un rôle sur la déméthylation du MeHg.

# CHAPITRE VI - Identification d'un premier système de résistance au mercure chez les bactéries anaérobies : impact sur la localisation et la méthylation du mercure

## Préambule

Bien que *hgcA* ne soit pas inductible au Hg, la présence du gène *arsR* en amont d'*hgcA* et leur co expression suggèrent une régulation transcriptionnelle du mécanisme de méthylation par ce gène (Goñi-Urriza et al. 2020). Le chapitre V a apporté de nouvelles preuves sur le lien existant entre le régulateur transcriptionnel ArsR appartenant à la famille ArsR-SmtB et les gènes *hgcAB* dans la réponse au mercure. Les membres de cette famille de régulateurs sont associés à l'homéostasie et à la résistance aux métaux (Saha et al. 2017). D'autre part, plusieurs études ont démontré un lien étroit entre les gènes *hgcAB* et des systèmes d'homéostasie et de résistance aux métaux (Schaefer et al. 2014; Qian et al. 2016, 2018). En particulier, une étude de transcriptomique différentielle préliminaire menée au laboratoire sur *P. hydrargyri* BerOc1 a permis de mettre en avant des gènes répondant au Hg(II) et au méthylmercure (MeHg). L'étude a comparé le transcriptome de BerOc1 sous trois conditions différentes : une condition contrôle (sans Hg), une condition en présence de 0.05  $\mu\text{M}$  de Hg(II) et une condition en présence de 0.047  $\mu\text{M}$  de méthylmercure. Cette étude a mis notamment en évidence 28 gènes à la fois surexprimés en présence de Hg(II) et réprimés en présence de MeHg. Parmi ces gènes, quatre gènes (n° peg 471 à 468) ont été retrouvés au sein d'un même cluster (**Figure VI-1**) et seraient impliqués dans un système de détection (471/470) des métaux et de leur homéostasie (468).



**Figure VI-1** : Organisation génomique du cluster de gènes 468 à 471 chez la bactérie sulfato-réductrice *P. hydrargyri* souche BerOc1. Ces gènes codent des systèmes reconnus pour participer à la signalisation, l'homéostasie et la résistance aux métaux et sont surexprimés en présence de Hg(II) et réprimés en présence de MeHg (Goñi Urriza et al Données non publiées).

Le chapitre VI présente les travaux s'intéressant spécifiquement au rôle de ce cluster de gènes dans la réponse au Hg chez la bactérie *P. hydrargyri* souche BerOc1. Pour cela, l'implication de ces gènes dans la résistance et la méthylation du mercure et, dans la localisation du mercure au niveau cellulaire a été étudiée. Il est présenté sous forme d'un article en préparation.



## First evidence of a mercury resistance system in anaerobic bacteria: impact on mercury localization and methylation

### 1. Introduction

Mercury (Hg) is a highly toxic pollutant, widespread in the environment and its methylated forms are even more toxic. Monomethylmercury (MeHg) production is mainly carried out by anaerobic microorganisms (Kerin et al. 2006; Gilmour et al. 2013; Bravo et al. 2018; Compeau and Bartha. 1985) and requires a cluster of two genes *hgcA* and *hgcB* encoding respectively a putative methyltransferase and a protein involved in its electron recycling (Parks et al. 2013; Smith et al. 2015; Cooper et al. 2020). The ability to produce MeHg do not confer resistance to Hg in anaerobic bacteria (Gilmour et al. 2011). It was however proposed that intracellular Hg methylation could be part of a global detoxification mechanism with Hg(II) uptake and MeHg export (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al. 2011). The so-called *mer* system, able to transform Hg (Hg(II) and MeHg) into Hg(0) (Barkay 1987; Boyd and Barkay 2012), is currently the only genetic determinism known to confer Hg resistance in microorganisms. Functional *mer* was experimentally identified in aerobic or facultative anaerobic bacteria (Schaefer et al. 2002) but never in strict anaerobic bacteria, although recent data analysis suggested the occurrence of *mer* in anaerobic microorganisms (Christakis et al. 2021; Vigneron et al. 2021). So far, no evidence of Hg resistance *via mer* operon or others mechanisms in methylating bacteria was reported implying how the mechanism of Hg resistance in these bacteria is remain unknown.

The link between Hg uptake, Hg methylation and MeHg export and, Hg cellular homeostasis was supported by previous studies (Schaefer and Morel 2009; Qian et al. 2016a, 2018a). Indeed, a decrease in Hg accumulation was measured in  $\Delta hgcAB$  mutant compared to the WT strain in both methylating bacteria *Pseudosulfovibrio mercurii* ND132 and *Geobacter desulfureducens* PCA suggesting a relationship between Hg uptake and methylation (Lin et al. 2014a). Moreover, two comparative proteomic studies between WT and  $\Delta hgcAB$  strains in the same two methylating bacteria showed an increase in the abundance of proteins involved in an efflux system belonging to the RND family (Resistance Nodulation cell Division, (Qian et al. 2018)). Members belonging to the RND family are involved in metal resistance and homeostasis in gram negative bacteria highlighting a relationship between Hg efflux and Hg methylation processes. In order to understand of how methylating bacteria tackle with mercury, and identify the genetic determinisms involved in this process, a differential transcriptomic analysis of the methylating SRB *P. hydrargyri* BerOc1 exposed to either Hg(II), or to MeHg (along with no Hg as control) was performed (Goñi-Urriza et al. unpublished). Differential display analysis revealed a cluster of four genes (peg number: 471, 470, 469 and 468) overexpressed in the



presence of Hg(II) but repressed in the presence of MeHg suggesting a reverse-cell response mechanism when handling Hg(II) and MeHg. Bioinformatics showed homologies of the proteins encoded by these genes with proteins involved in metal sensing, metal resistance and metal efflux.

The aim of this study was to determine the role of the genes cluster 471-468 in Hg resistance, Hg trafficking and Hg methylation. We thus generated a mutant strain in the Hg(II) methylating bacterium model *P. hydrargyri* strain BerOc1 and determined (i) the Hg(II) and MeHg resistance, (ii) the Hg(II) methylation rate, (iii) the intracellular accumulation of Hg and, (iv) the cellular distribution of Hg by cell imaging in BerOc1 mutant strain compared to the WT. Our study highlights a better understanding of the mechanisms by which methylating bacteria cope with mercury.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

*Pseudodesulfovibrio hydrargyri* strain BerOc1 (DMSZ 103834) was cultured anaerobically in the dark at 37°C and pH 7.0 on Brackish Multipurpose Medium supplemented with Pyruvate and Fumarate as electron donor and acceptor respectively, to provide fumarate respiration (MM<sub>10</sub>PF medium). The MM<sub>10</sub>PF medium contains (per liter): 10 g NaCl, 1.2 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.25 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g KCl, 1 mL trace metal elements SL12B modified solution, 1 mL Selenite-Tungstate, 2.38 g HEPES, 4.40 g Pyruvate, 6.40 g Fumarate, 1 mL V7 vitamins solution and 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Selenite-Tungstate solution is composed of 0.5 g NaOH, 2 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and 4 mg Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O per liter and SL12B modified solution is composed of 300 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1.1 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 190 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 50 mg MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 42 mg ZnCl<sub>2</sub>; 24 mg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 18 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O and 2 mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O per liter. For all cultures (experiments as well as strain's storage), cysteine was added as sulfur source at 0.1 mM in the MM<sub>10</sub>PF medium after autoclaving (MM<sub>10</sub>PFCys medium). The stock solution of cysteine (50 mM) was prepared in the anaerobic chamber, consistently prior each inoculation of the strains to avoid cystine formation.

*Escherichia coli* TOP10 strains (Invitrogen®) were grown at 37°C in Luria-Bertani broth (LB, Condalab®) medium and LB agar (Condalab®) was used as solid medium.

### 2.2. Construction of BerOc1 $\Delta 470-467$ mutant strain

To perform genetic analysis and generate mutant strain of BerOc1, the strain was cultivated as previously described except that the MM<sub>10</sub>PF medium was supplemented with 0.5 mM of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> instead of cysteine and with 1 g of Yeast Extract per liter (MM<sub>10</sub>PFYE medium). Solid cultures in MM<sub>10</sub>PFYE medium were further complemented with 1.5 % agar (European bacteriological Agar, Condalab®) and, after autoclaving, 0.5 mL/L Titanium (III) citrate and 0.025 µg/L Natamycine (Sigma) were added in the medium to respectively decrease the redox potential and avoid fungi growth. Titanium (III) citrate solution is composed of 5 mL of a 15% titanium (III) chloride solution in 50 mL of 0.2 M sodium citrate solution, neutralized with a saturated sodium carbonate solution. Spectinomycin was added at 400 µg/mL (Sigma) in liquid medium and at 100, 400 or 800 µg/L in solid medium, when needed.

The BerOc1 mutant strain deleted on *470-467* genes (accession numbers: WP\_071546880, WP\_071546881, WP\_071546882 and WP\_071546883, respectively) was created by replacing the *470-467* cluster by a spectinomycin resistance cassette. Using the POE-PCR (Prolonged Overlap Extension-PCR) technique (You et al. 2011), the upstream and downstream flanking regions of the targeted *470-467* fragment were inserted upstream and downstream the spectinomycin cassette in the

pNot19ΔPCM vector. Briefly, primers containing 5' overlapping terminus were used to amplify by PCR the upstream and downstream 470-467 fragments (**Table VI-1**). The spectinomycin cassette and the pNot19ΔPCM vector were also amplified with specific primers containing 5' overlapping terminus (**Table VI-1**). The pNot19ΔPCM vector PCR product was fused with the 470-467 upstream fragment by POE-PCR without adding primers to generate DNA multimers. The POE-PCR product was transformed in *E. coli* TOP10 electrocompetent cells (Invitrogen®), and transformants were selected on LB plates supplemented with 100 µg/mL spectinomycin. Transformants were grown in liquid LB medium supplemented with 100 µg/mL spectinomycin. Plasmid was extracted using a QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen®) and the construction was checked by sequencing. This procedure was repeated to fuse the four PCR products in order to synthesize the pNot19ΔPCM(Sp470-467) deletion plasmid that will be used to transform *P. hydrargyri* BerOc1. Since pNot19ΔPCM is non-replicative plasmide in *P. hydrargyri* BerOc1, it could homologously recombine with the chromosome to acquire spectinomycin resistance.

**Table VI-1** : Primers used (i) for the construction of pNot19ΔPCM(Sp470-467) plasmid and, (ii) to perform the experiments of co-expression of the 472-466 genes cluster.

ID	Primer	Sequence (5'3')	Hybridization temperature (°C)	Fragment size (pb)
Plasmid construction	>470_up_bb_I(F)	TTGTAAAACGACGCGCCAGTGAATTCcgggatcgaggactcgcg	68	651
	>470_up_S_I(R)	TGGCTGGCGAACGAGCGCAAatgaaacctcctgtaggggtt		
	>470_S_up_V(F)	aacctacaggagggttcatTTGCGCTCGTTCGCCAGCCA	61	4597
	>470_bb_up_V(R)	atcgagtcctcctcatccggaGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAA		
	>470_dwn_Spec_IF2	ATCCGCATAAAATCTAGCGcaaccgggacattttcaccga	70	809
	>470_dwn_bb_IR	ACCATGATTACGCCAAGCTTatggccttgaccgcctggat		
	>470_bb_dwn_VF	atccaggcgtcaaggccatAAGCTTGGCGTAATCATGGT	60	4614
>470_Spec_dwn_VR2	tcggtgaaaatgtcccgttgcgctagattttaatgccggat			
Co expression gene assay	>470F1	AGGATTCCACTGCCGACC	F1-R1 : 56 F1-R2 : 56 F1-R3 : 56 F1-R4 : 56 F2-R3 : 56 F2-R4 : 56 F3-R5 : 53	F1-R1 : 400
	>469R1	CCCCAGTTGTGATGCAGC		F1-R2 : 813
	>468R2	AGGGTGGTGGTTATAGCTGT		F1-R3 : 2181
	>467R3	CACAGGGCCAGCTTGATTC		F1-R4 : 2665
	>466R4	CAGGTGATGTTCCGTCGTC		F2-R3 : 541
	>468F2	ACTACTATCCCGATTTCACCT		F2-R4 : 1025
	>471F3	ACTGAACATCGGCATCAACG		F3-R5 : 561
	>472R5	AGGAGTAGGCGGTCATGAT		

BerOc1 competent cells were prepared as follows: 100 mL of a fresh culture of *P. hydrargyri* BerOc1 grown in MM<sub>10</sub>PFYE medium were harvested at mid-exponential growth phase (OD 0.4) by centrifugation (12 min, 2600 g, 4°C) and washed twice with degassed MilliQ water kept on ice. Competent cells were resuspended in a final volume of 300 µL of cold degassed MilliQ water. To perform transformation, 50 µL of competent BerOc1 cells were mixed with 0.5 or 1 µg of pNot19ΔPCM(Sp470-467) plasmid in a 1-mm electroporation cuvette kept on ice. Electrical shock was

carried out at 1500 Volts, 250 Ohm and 25  $\mu$ F using ECM 630 Electroporator BTX. Immediately after electroporation, cells were incubated in 6 mL of MM<sub>10</sub>PFYE medium in 12-mL hungate tubes. Tubes were closed, degassed and incubated overnight at 37°C without antibiotic selection pressure. Antibiotic selection pressure (100  $\mu$ g/mL of spectinomycin) was added before cultures OD (600 nm) doubled (one generation). The electroporated cultures that showed an efficient growth were grown with 400  $\mu$ g/mL of spectinomycin. At each growth with increasing spectinomycin concentration, aliquots were inoculated on agar MM<sub>10</sub>PFYE medium containing spectinomycin and incubated at 37°C until colonies appearance (at least one month). Replacement of the 470-467 cluster by spectinomycin resistance cassette was confirmed by PCR and sequencing the insert and its surrounding genomic region. Generation of spontaneous mutants was determined with BerOc1 competent cells electroporated with cold degassed MilliQ water (instead of pNot19 $\Delta$ PCM(Sp470-467) plasmid) and grown on solid medium with 100  $\mu$ g/mL of spectinomycin.

### 2.3. Expression of genes, promoter prediction and, protein localization and function prediction of the cluster 472-466

In order to determine if genes 470-467 forms an operon as well as genes 471-472, BerOc1 WT cells grown on MM<sub>10</sub>PF medium were spiked with Hg(II) at 0, 0.005, 0.5, 2 and 5  $\mu$ M of HgCl<sub>2</sub> at the beginning of the exponential growth phase. After 30 minutes of incubation with Hg(II) at 37°C, RNA protect solution (3% (v/v) of 5 % phenol saturated with Na acetate 1M pH 5.5 into 95 % ethanol) was added and then the cultures were pelleted (10 min, 5000 g). Total RNA was extracted using Extract-all® Kit (Eurobio Scientific) and treated with Invitrogen™ Ambion™ TURBO DNA-free Kit (Fisher scientific). Purified RNA was quantified with Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen™) and then diluted to 20 ng/ $\mu$ L to perform cDNA synthesis using M-MLV-RT (Invitrogen), following manufacturer's instructions. PCRs were performed on cDNA samples using 0.2  $\mu$ M of primers encompassing the 472 to 466 genes (**Figure VI-1**) listed in **Table VI-1**. For this purpose, the AmpliTaq Gold DNA polymerase (ThermoFischer®) was used following manufacturer's recommendations at specific hybridization temperature (**Table VI-1**).

Promoter prediction in the 472-466 genomic region was performed with fruitfly (procaryote, 0.8 of confidence, [https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) and softberry (0.8 of confidence,

<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>)

softwares. ProtCompB (Localization of bacterial protein,

<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=pcompb&group=programs&subgroup=proloc>) was

used to protein localization prediction. Protein function and conserved domains were given by BLAST® software using Blastp web.

## 2.4. Mercury sensitivity assays

To determine if genes 470-467 were involved in a resistance mechanism to Hg in BerOc1 WT strain, the impact of mercury on cell growth was compared between BerOc1 WT strain and its mutant strain. Hg(II) stock solution (9.14 mM HgCl<sub>2</sub> in 1% HCl) and Methylmercury (13.22 mM in 1:3 methanol:acetic acid) were used to yield final concentrations ranging respectively from 0 to 50 µM and from 0 to 4.7 µM. In order to avoid heterogeneity, MM<sub>10</sub>PFCys medium was inoculated with BerOc1 WT strain or its mutant strain in the anaerobic chamber and 9 mL of the inoculated medium was distributed in 12-mL Bellco tubes containing 100 µL of Hg(II) at the required final concentration. The tubes were sealed with PTFE coated butyl stoppers, mixed and incubated in the dark at 37°C. Hg spike was thus performed just after the strain inoculation. Growth of BerOc1 WT strain and its mutant strain was monitored by OD at 600 nm. Experiments were performed on three independent cultures.

## 2.5. Mercury species partitioning and methylation assays

All Hg species partitioning and methylation assays were performed in pre-washed (ultrasonication in 10 % HNO<sub>3</sub> and HCl baths) and rinsed (ultrapure MilliQ water) autoclaved Hungate tubes. BerOc1 WT strain and BerOc1 Δ470-467 strain were grown overnight in MM<sub>10</sub>PFCys medium then spiked with Hg(II) ranging from 0 to 25 µM in the anaerobic chamber. At both Hg spike time and after 4-hours of Hg exposition, bulk fractions (500 µL) were collected in 50% (v/v) of 6N nitric acid (HNO<sub>3</sub>) to quantify Hg(II) and MeHg concentrations. In addition, after 4-hours of Hg exposition, 5 mL of the cultures were centrifuged (6000 g, 30 min, 4°C), washed once with 1 mL of MM<sub>10</sub>PF medium then centrifuged again (6000 g, 10 min, 4°C). To remove Hg adsorbed at the cell surface, a two steps washing procedure was performed (Schaefer *et al.* 2014; Thomas and Gaillard 2017): a first incubation with 2.5 mL of a 100 mM EDTA and 100 mM oxalate solution for 10 minutes was done, followed by a 10 minutes incubation with 2.5mL of 10 mM GSH and 3 mM ascorbate solution. Each incubation was carried out under agitation (40 rpm). Then, cells were filtered on PVDF filter (0.2 µm) to collect separately, the intracellular fraction and, the desorbed cell fraction both used for extraction using 6N HNO<sub>3</sub> to quantify Hg(II) and MeHg concentrations. All the procedures were performed in three independent replicates. To determine the amounts of Hg(II) binding the filter unrelated to the cell binding, abiotic controls were performed by carrying out the two washings steps procedure with a given concentration of Hg(II) and the fractions were collected as described above.

For each fraction, Hg(II) and MeHg concentrations were measured by capillary gas chromatography (GC TriPlus™ RSH™, Thermo Scientific) connected to an inductively coupled plasma

mass spectrometer (ICPMS, X2-series, Thermo Electron). Quantification of each Hg species concentration was performed by isotopic dilution as described in (Monperrus et al. 2005). Briefly, a known amount of fractions (bulk, intracellular or cell adsorbed fractions) was buffered at pH 3.9 using a 0.1 M acetic acid/acetate buffer and then spiked with a known quantity of isotopically enriched Hg species ( $^{199}\text{Hg(II)}$  and  $^{201}\text{MeHg}$ ). Hg(II) and MeHg were ethylated using 5% (v/v)  $\text{NaBEt}_4$  and extracted in isooctane by shaking vigorously during 20 min. Organic phase containing Hg species was collected and analyzed by GC-ICPMS. Each fraction was measured at least two times.

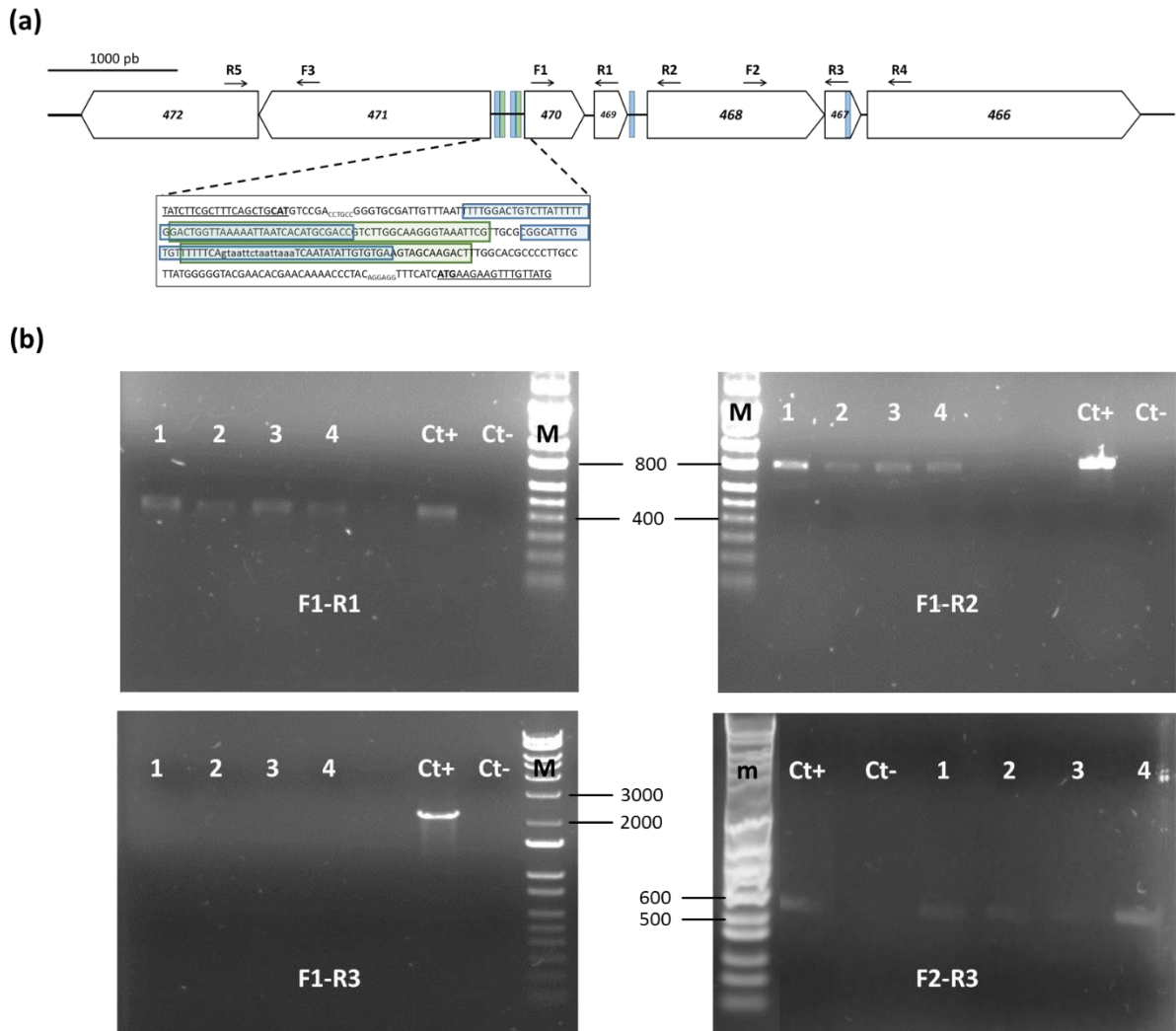
## 2.6. Mercury imaging assays

BerOc1 WT and BerOc1  $\Delta 470-467$  strains grown in  $\text{MM}_{10}\text{PFCys}$  medium at 37 °C until culture doubled (at least one generation) were exposed for 4 hours at 2  $\mu\text{M}$  of Hg(II). Cultures were centrifuged (6000 g, 30 min, rt) and washed once with 1 mL of  $\text{MM}_{10}\text{PF}$  medium (centrifugation 6000 g, 10 min, rt) and once with degassed milliQ water (centrifugation 6000 g, 10 min, rt). Washed cells were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of degassed milliQ water, deposited on silicon nitride ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) membranes, blotted and immediately plunged in liquid ethane cooled with liquid nitrogen using Leica EM-GP2 plunge freezer. The membranes were kept in liquid nitrogen until measurement and cryo-transferred in the analysis chamber operating in vacuum. Synchrotron nano-XRF measurement were carried out on ID16A Nano-Imaging beamline at European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) (Da Silva, 2017). All measurements were performed in cryogenic conditions using a liquid nitrogen cryostate. They were carried out with a pink nanoprobe ( $\Delta E/E = 1\%$ ) at 17 keV. The X-ray beam was focused with a Kirkpatrick-Baez (KB) mirror to a size of 39 nm (V) x 64 nm (H) and a flux of  $1.9 \cdot 10^{11}$  ph/s. Samples were scanned with a pixel size of 30 nm and 50 or 100 ms of integration time. The X-ray fluorescence signal was collected with a four elements silicon drift diode detector. XRF spectra were fitted using PYMCA (Solé et al, 2017) to provide areal density maps ( $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ ). Calibration was done using the thin film reference AXO (Dresden, GmbH). Resulting elemental maps were expressed in areal density maps ( $\text{ng}\cdot\mu\text{m}^{-2}$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Genomic structure in 472-466 cluster and Co-expression analysis

**Figure VI-2a** shows the gene organization of the 472-466 cluster. Bioinformatic analysis were performed on amino acid sequences in order to identify homologues of the protein coding 472 to 466 genes in the databases. 470 gene encodes for a protein homologues to *E. coli* ZraP (48% of similarity) and belongs to the superfamily of CpxP like proteins (E value  $5.16e^{-5}$ ). The protein sequence analysis of 470 predicted a pfam13801 domain (E value  $2.30e^{-4}$ ) characteristic of this superfamily although the LTXQ motif could not be found. This domain is found in metal-binding proteins and is involved in resistance to heavy-metal ions (Yamamoto *et al.* 2008; Appia-Ayme *et al.* 2012). 469 gene encodes for a small protein with a C terminus SHOCT domain (pfam 09581; E value  $5.72e^{-6}$ ), but no similarity with protein of known function could be found. 469 protein is predicted as an inner membrane protein (score of 9.96 for Integral Prediction of protein location and of 2.60 for NNets prediction). The protein-coding sequence of 468 gene is predicted to belongs to the TolC superfamily (COG1538; E value  $5.81e^{-30}$ ), the outer membrane protein of RND metal efflux systems (Nikaido and Takatsuka 2009). 467 gene encodes for a small protein, with a YHS domain (pfam 04945, E value  $3.31e^{-4}$ ) found in proteins with unknown function. However, two adjacent cysteines are identified in 467 protein sequence and may form a metal binding site. The protein showed a predicted periplasmic localization in the cell, but anchored to the membrane (Integral Prediction of protein location: membrane bound Periplasmic with score 7.2). Finally, 466 encoded protein belongs to CusB/HlyD superfamily (pfam16576; E value  $1.12e^{-95}$ ), a periplasmic subunit of RND metal efflux systems (Nikaido 2011). Thus, 468 and 466 genes encode probably two subunits of a RND TolC efflux system. In the same cluster of genes but in the reverse strand, 471 and 472 genes encode proteins similar to ZraS (PRK10364, E value  $1.47e^{-120}$ ) and ZraR (PRK10365, E value 0) (Rome *et al.* 2018). 471 and 472 genes along with 470 gene may constitute a complete sequester/two-component signal transduction system (2CSS), similar to the Zra 2CSS. Therefore, 472-466 gene cluster appears to encode several proteins predicted to be involved in metal sensing and export. The bioinformatics analysis unraveled two distinct systems, a metal efflux system and a metal responsive signaling/transduction system.



**Figure VI-2** : Genomic structure of 472-466 genes cluster. **(a)** Schematic representation of genomic region from 472 gene to 466 gene. Open reading frames (ORFs) of genes are illustrated with white numbered arrows. The reading direction is indicated by the arrow direction. Putative forward (blue) and reverse (green) promoters are indicated with boxes. The sequence of the promoter region are detailed encompassing the beginning of ORFs (underlined), start codons (ATG or CAT; bold), ribosomal binding sites (RBS; index), putative DNA binding site of ZraR (15 bp long; small letters) and putative promoters (boxed). **(b)** Results of the Reverse transcription-PCR (RT-PCR) performed on total RNA extracted from BerOc1 grown at different Hg(II) concentrations. RT-PCR were performed with primers F1-R1 (425 bp), F1-R2 (838 bp), F1-R3 (2206 bp) and F2-R3. M: ladder 2 log (Ozyme®). M: ladder 100pb (Ozyme®), Ct+: positive control performed on BerOc1 genomic DNA. Ct-: negative control without DNA template. Lines 1, 2, 3, 4 correspond to the RT-PCR performed using cDNA from BerOc1 cells grown in the presence of 0, 0.005, 0.5 and 2 μM of Hg(II), respectively. Position of the primers used for the RT-PCR are indicated by black arrows on panel **(a)**.



Promoter prediction analyses of the genomic region from 472-gene's stop codon to 466-gene's stop codon showed six putative promoters (score cutoff = 0.8, **Figure VI-2a**) including four promoters in the forward strand and two promoters in the reverse strand (respectively blue and green boxes in **Figure VI-2a**). The location of the predicted promoters together with the direction of open reading frames (ORF) suggested four transcriptional units including: (i) 471 and 472 genes, (ii) 470 and 469 genes, (iii) 468 and 467 genes and, (iv) 466 gene. The intergenic region between 471 and 470 genes showed a particular structure with two predicted promoters in each strand; the promoters of the different strands overlap (**Figure VI-2a, insert**). This genomic structure is similar to the structure observed in the Zra 2CSS of *Escherichia coli* (Leonhartsberger et al. 2001) and has an important role in the regulation of gene expression by ZraR. Moreover, a putative ZraR binding site was identified in the promoter region of 470 gene (**Figure VI-2a**).

The transcriptional units in the genomic region 472-466, were determined by reverse transcription-PCR (RT-PCR). Moreover, since 471 to 468 genes are overexpressed in the presence of Hg(II) (Goñi-Urriza et al. unpublished) there might be differences in the transcription of those genes depending on Hg(II) exposure conditions. The transcriptional units were determined using total RNA extracted from BerOc1 cultures after 30 minutes of incubation with increasing concentrations of Hg(II) (0.005, 0.5, 2 and 5  $\mu$ M) and without Hg(II). For this purpose, a forward primer located 154 bp downstream the start codon of 470 gene (**F1**) was used to conduct PCR with a set of reverse primers located in 469 (**R1**), 468 (**R2**), 467 (**R3**) and 466 (**R4**) genes i.e. at respectively 554 bp, 967 bp, 2335 bp and 2819 bp downstream the start codon of 470 gene (**Figure VI-2b, Table VI-1**). A second set of PCRs was performed with a forward primer located in 468 gene (**F2**) and primers **R3** and **R4**. Results showed amplifications only by using the couples of primers F1-R1, F1-R2 and F2-R3 (**Figure VI-2b**). These amplifications were observed in the absence and presence of mercury independently of Hg(II) concentrations. As expected from promoter predictions, no amplification is observed with primers F1-R4 and F2-R4 (data not shown). These results reveal two transcriptional units, one encompassing 470 to 468 genes, and the second one including 468 and 467 genes. The protein function predictions encoding by 470-467 genes cluster associated with these genomic and transcriptomic organizations of the cluster in BerOc1 suggest that this strain has a coupled mechanism to deal with Hg, i.e., an efflux system and a sequester/two-components regulatory system. The cluster of genes 470-467 was therefore selected to generate mutant strain and investigate the resistance mechanisms in the methylating bacterium *P. hydrargyri* BerOc1.

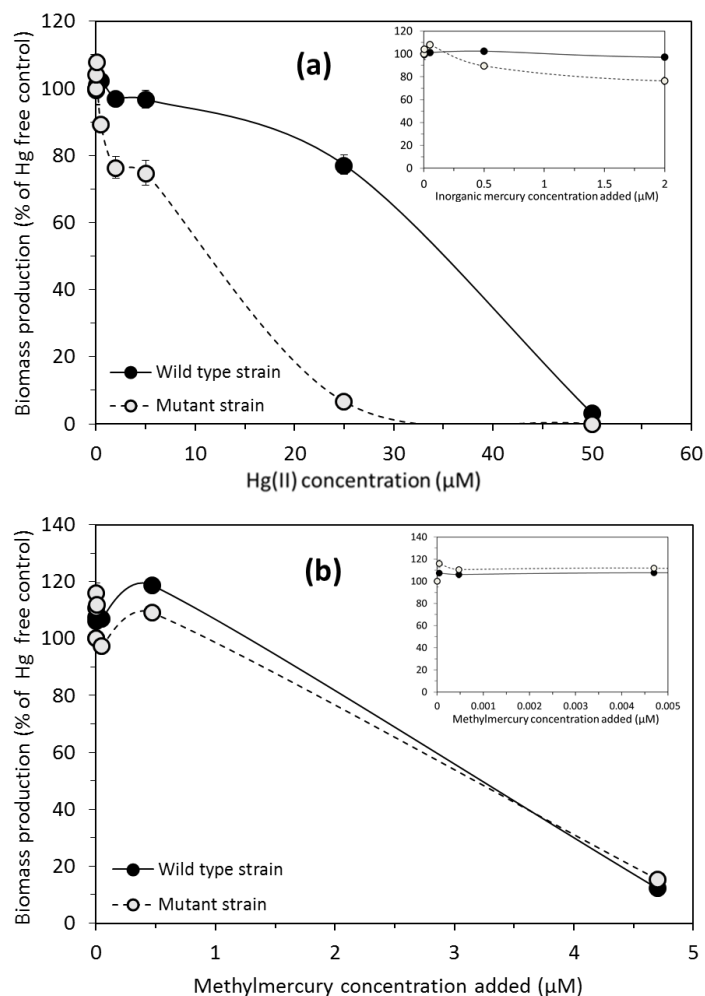
Transcriptional units for 471 and 472 genes in the reverse strand were also determined using a forward primer located 1505 bp downstream the start codon of 471 gene (**F3**) and a reverse primer located 234 bp downstream the start codon of 472 gene (**R5**) (**Figure VI-2a** and **Table VI-1**). Although,

no predicted promoter could be found upstream 472 gene, there is no co-transcription detected for those genes regardless of Hg(II) conditions tested (data not shown).

Thus, a mutant strain deleted on the cluster of genes 470 to 467 was generated. 471 gene was not deleted because it is encoded in the reverse strand (**Figure VI-2a**). Although 467 gene was not overexpressed in the previous differential display analysis (*Goñi-Urriza et al. unpublished*) we decided to delete also this gene because it was cotranscribed with 468.

### 3.2. Hg(II) and MeHg resistance of BerOc1 wild type and BerOc1 $\Delta 470-467$ mutant strains

The sensitivity BerOc1 WT and the  $\Delta 470-467$  mutant strains to Hg(II) and MeHg was investigated on cultures exposed to a range of Hg(II) from 0.005  $\mu\text{M}$  to 50  $\mu\text{M}$  and, of MeHg from 0.000047  $\mu\text{M}$  to 4.7  $\mu\text{M}$ . Mutant strain was highly sensitive to Hg(II) compared to the WT strain (**Figure VI-3a**), suggesting a role of the 470-467 cluster in Hg(II) resistance. No impact of Hg(II) in biomass production of the WT strain was observed below 25  $\mu\text{M}$  whereas the growth was begun to decrease from 0.5  $\mu\text{M}$  in the mutant strain (**Figure VI-3a**). The biomass of BerOc1  $\Delta 470-467$  strain decreased with the increase of Hg(II) concentrations and the growth was strongly inhibited at 25  $\mu\text{M}$ . On the contrary, the mutant and the WT strains displayed similar sensitivity to MeHg, with no effect on bacterial growth for concentrations up to 0.47  $\mu\text{M}$ . (**Figure VI-3b**) indicating that cluster 467-470 was not likely involved in MeHg resistance. The higher level resistance to Hg(II) observed in the WT strain compared to the mutant strain suggests the presence of a Hg(II) resistance mechanism in BerOc1 strain involving the 470-467 gene cluster.

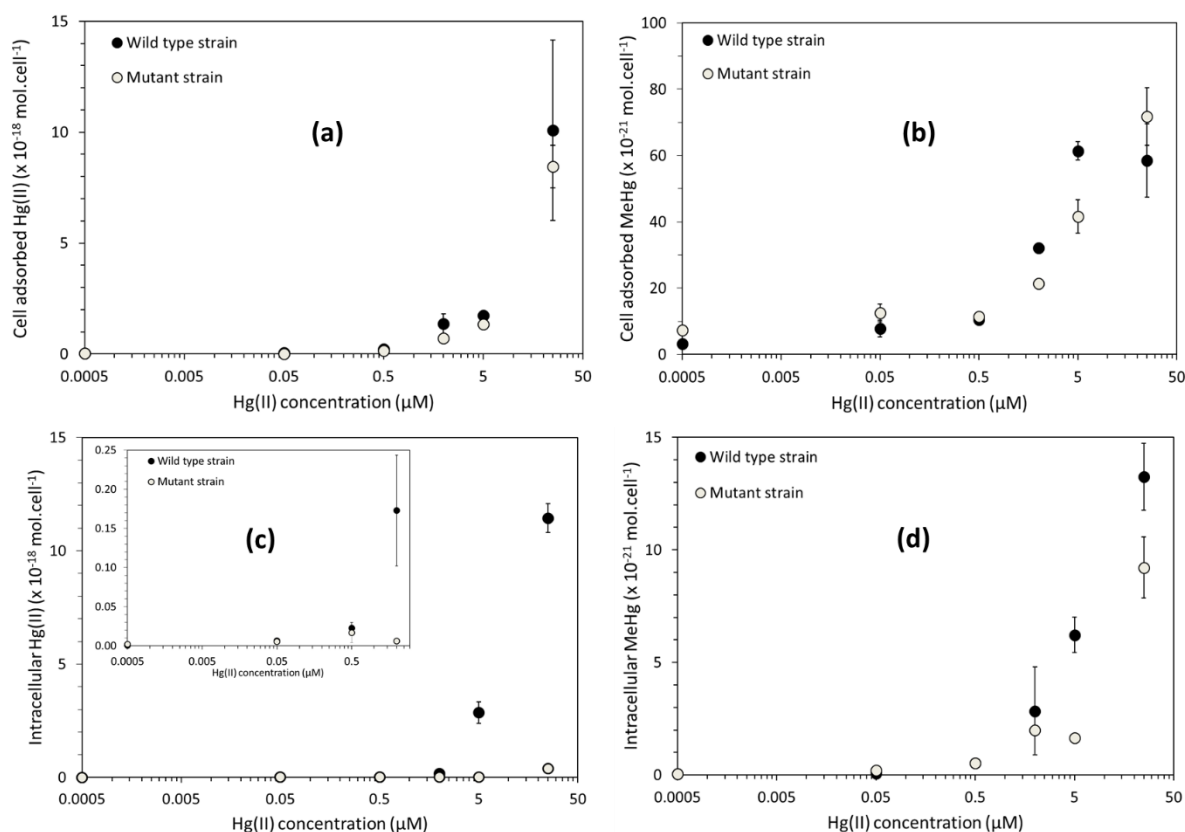


**Figure VI-3** : Biomass production of the wild type strain (solid line) and its mutant (dotted line) exposed with either **(a)** Hg(II) concentration ranging from 0.005 to 50 μM or **(b)** methylmercury ranging from 0.00047 to 4.7 μM. Mercury was added consecutively to the culture inoculation i.e. Ti of the growth and incubated until the stationary growth phase (Tf, about 140 hours). Inserts: zoom on the lowest concentrations. Error bars corresponds to standard deviation calculated from three or four independent replicates.

### 3.3. Intracellular accumulation and Hg(II) methylation in BerOc1 WT and BerOc1 $\Delta 470-467$ strains

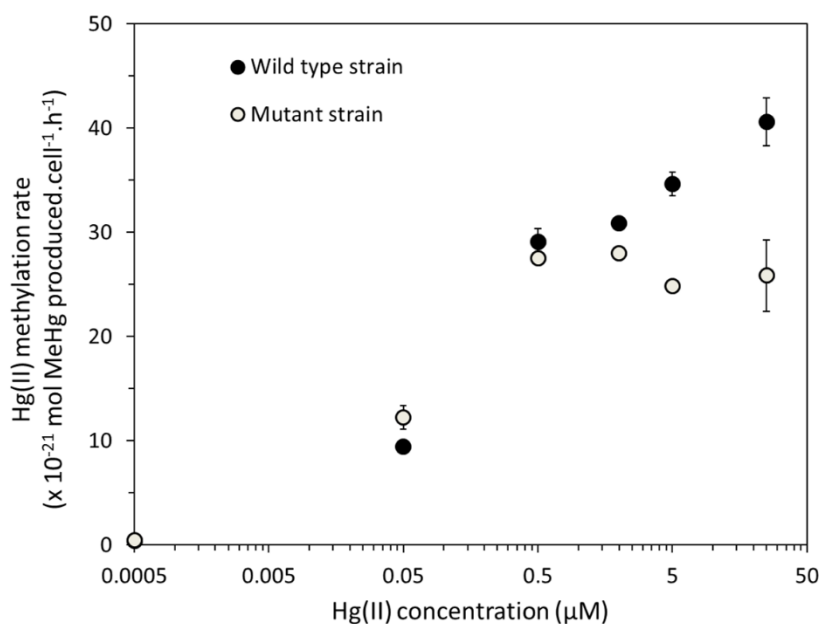
The cellular accumulation of Hg (either Hg(II) or MeHg) was determined at different Hg(II) concentrations (from 0.0005 μM to 25 μM) in the WT and mutant strains. Both strains showed similar amounts of Hg(II) and MeHg adsorbed on the cells regardless of Hg(II) concentration spiked (**Figure VI-4a and VI-4b**). On the contrary, the amounts of intracellular Hg(II) quantities in the WT strain was higher than in the mutant strain when Hg(II) concentrations are above 1 μM (**Figure VI-4c**). The intracellular accumulation of Hg(II) increased in the WT strain with the increase of Hg(II) concentration, while the mutant strain is incapable of accumulating more than  $0.35 \times 10^{-18}$  mol of Hg(II).cell<sup>-1</sup>

(corresponds to 0.08% of Hg(II) at 25  $\mu\text{M}$  of Hg(II) spiked). This concentration was reached at 0.5  $\mu\text{M}$  of Hg(II) for both the WT and the mutant strains (**Figure VI-4c - insert**). For higher concentrations, WT accumulated more Hg(II) intracellularly, to reach  $11.44 \times 10^{-18}$  mol of Hg(II).cell<sup>-1</sup> at 25  $\mu\text{M}$  (corresponding to 2.3% of Hg(II) at 25  $\mu\text{M}$  of Hg(II) spiked). Thus, the WT strain accumulated 2 to 190 times more Hg(II) than the mutant strain depending on the spiked Hg(II) concentration. Hg(II) retained in filters from abiotic controls was only  $0.023\% \pm 0.002$ , corroborating the results of intracellular Hg(II) accumulation for biotic assays. Moreover, the similar amounts of intracellular MeHg observed in the WT and mutant strains (**Figure VI-4d**) supports the observed MeHg resistance phenotype and further highlights the differences observed between the two strains for the phenotype of Hg(II) intracellular accumulation.



**Figure VI-4** : Quantities of (a,c) Hg(II) or (b,d) MeHg found in (a,b) cell adsorbed and (c,d) intracellular fractions. Hg(II) was spiked during the exponential growth phase. Hg(II) and MeHg concentrations were measured by GC-ICPMS from cultures of BerOc1 wild type and mutant strains stopped after 4 hours of Hg(II) exposition (from 0.0005 to 25  $\mu\text{M}$ ). Insets correspond to zooms from 0.005 to 2  $\mu\text{M}$  Hg(II) expositions. Error bars corresponds to standard deviation calculated from three replicates each measured three times.

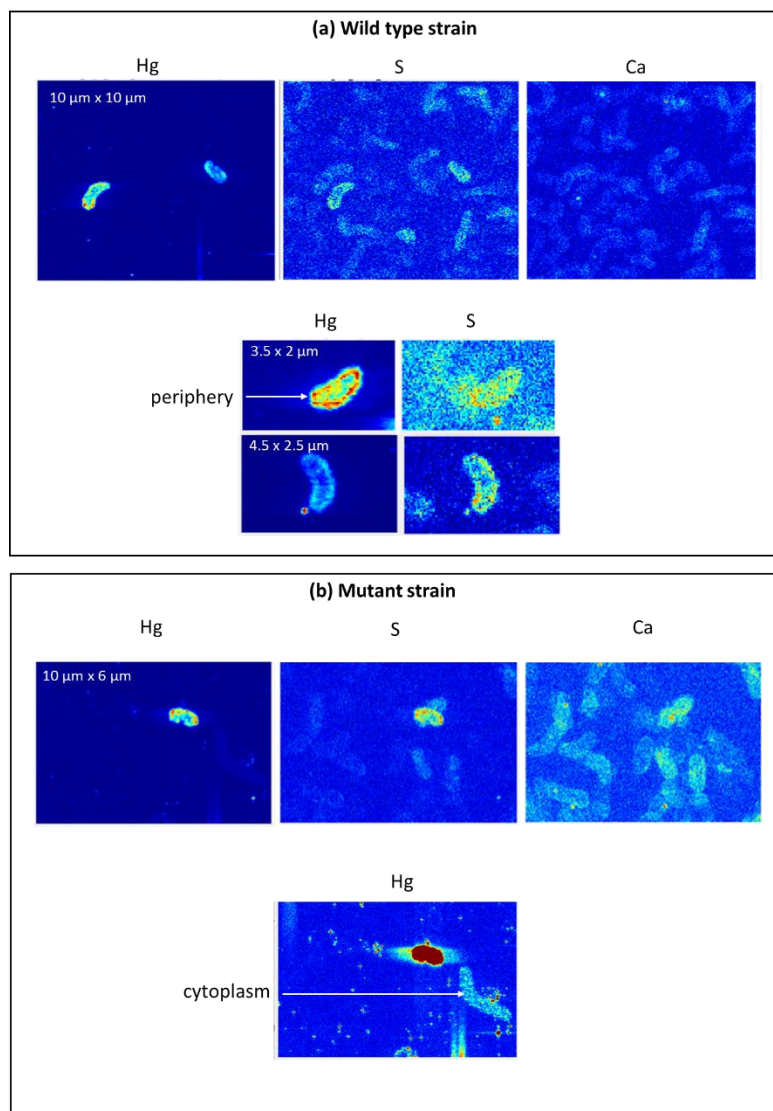
The capacity of the BerOc1 WT and BerOc1  $\Delta 470-467$  strains to methylate Hg(II) during cell growth was also assessed (**Figure VI-5**). Up to 0.5  $\mu\text{M}$  of Hg(II), no differences in Hg(II) methylation rates between WT and mutant strains was observed in line with the Hg(II) intracellular quantities data. For higher Hg(II) concentrations, methylation rates of the WT strain increased with the increase of Hg(II) concentration spiked to reach  $40.59 \times 10^{-21} \text{ mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  at 25  $\mu\text{M}$  of Hg(II). On the contrary, a saturation of MeHg production occurred around  $26.54 \times 10^{-21} \text{ mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  in the mutant strain, when Hg(II) concentrations is spiked above 0.5  $\mu\text{M}$ . Overall, these results highlight a direct link between Hg(II) accumulation and Hg(II) methylation and further brings out a coupling between Hg(II) intracellular accumulation and Hg(II) resistance processes observed for the both strains. The lack of saturation of methylation rates in the WT strain under these conditions of growth as well as the increase of about 35-fold compared to the rates measured in the study conducted on the impact of sulfides concentration on Hg(II) methylation at 5  $\mu\text{M}$  of Hg(II) (**Chapter IV**) is certainly due to the decrease in Hg(II) exposure times (4 hours in this study compared to several tens of hours in the previous studies), as already observed in the study conducted on the ArsR protein (**Chapter V**). The increase in methylation rates with decreasing mercury exposure times may indicate a later onset of methylmercury demethylation in methylating bacteria.



**Figure VI-5** : Hg(II) methylation rates of BerOc1 wild type and mutant strains exposed to Hg(II) ranging from 0.0005 to 25  $\mu\text{M}$  during 4 hours. Methylation rates were measured from the whole culture (bulk fraction). Error bars corresponds to standard deviation calculated from three replicates each measured three times.

### 3.4. Mercury localization in BerOc1 WT and BerOc1 $\Delta 470-467$ mutant cells

To further discriminate the subcellular localization of Hg, BerOc1 wild type and mutant cells exposed to 2  $\mu\text{M}$  of Hg(II) were imaged by nano-X-ray fluorescence. Hg appears consistently colocalized with sulfur for both strains, and could be detected outside and inside the cells (**Figure VI-6**). Interestingly, the detection of Hg in the cells was heterogeneous for both strains: few number of the cells imaged accumulated high amounts of Hg (Hg-accumulating cells), whereas Hg in the other cells was not detected (below the detection limit of the technique). In the WT strain, Hg in Hg-accumulating cells appeared to be at the periphery of the cells (**Figure VI-6a**), while it appeared homogeneously distributed in the mutant hyperaccumulating cells maps (**Figure VI-6b**). These results reveal an impact of mechanisms encoding by 470-467 genes cluster on Hg cellular distribution.



**Figure VI-6** : Nano-XRF maps of mercury (Hg), sulfur (S) and calcium (Ca) in BerOc1 **(a)** wild type and **(b)** mutant strain exposed to 2  $\mu\text{M}$  of Hg(II) during 4 hours in the exponential growth phase. Incident energy = 17 keV, step size = 30 nm, counting time = 100 ms. Outsets correspond to zooms on one or two Hg-accumulating cell(s).

## 4. Discussion

A previous transcriptional study using *P. hygrargyri* BerOc1 as bacterial model, showed the overexpression of a cluster of genes (from 471 to 468) in the presence of 0.05  $\mu\text{M}$  of Hg(II). Those genes are repressed in the presence of 0.05  $\mu\text{M}$  of MeHg (Goñi-Urriza *et al.* unpublished). The purpose of the current study was to determine the role of this cluster of genes in Hg resistance and transformation.

A deletion of a cluster of genes (deletion of 470, 469, 468 and 467 genes) was performed and a BerOc1  $\Delta$ 470-467 mutant strain was generated. Deletion of 470 to 467 genes resulted in both an increase of Hg(II) sensitivity and a low accumulation of intracellular Hg(II) compared to the WT strain. Neither MeHg sensitivity nor its accumulation are affected in  $\Delta$ 470-467 mutant strain. The lack of 470 protein in the mutant may explain these results. Indeed, based on previous knowledge of the functioning of ZraP/CpxP-like proteins, it is likely that the periplasmic sequestration of Hg(II) mediated by 470 occurs to protect BerOC1 cells (as ZraP protect *E.coli* by acting as a zinc scavenger (Taher and de Rosny 2021)). Deleting 470 could lead to a lower accumulation of Hg(II) in the periplasm and to a higher sensitivity to Hg(II). As observed in our study, previous studies reported that cadmium resistance resided in a capacity to accumulate cadmium intracellularly rather than on metal adsorption in cell membranes (Lima *et al.* 2006; Siripornadulsil and Siripornadulsil 2013) and cadmium accumulation in cytoplasmic and periplasmic spaces in resistant SRB cells was revealed by TEM observations (Naz *et al.* 2005). Furthermore, from the data of biomass production, intracellular Hg(II) quantity and methylation assays (Figure VI-3, Figure VI-4, Figure VI-5), we could determine a range of Hg(II) concentrations that induces the Hg(II) sequestration: the Hg(II) concentration between 0.5 and 1  $\mu\text{M}$  is the threshold that might trigger the sequestration of Hg(II) and protect the cells from Hg(II) toxicity.

The genomic structure of the cluster (470-471-472 and the intergenic 229 bp region containing the overlapping promoters and the putative ZraR DNA binding sites) and the similarities of 471 and 472 with ZraR and ZraS respectively, also support that Hg resistance in BerOc1 is a mechanism similar to that described for zinc sensing and sequestration of the Zra system (Taher and de Rosny 2021). Briefly, ZraP is associated with ZraRS, a two component regulatory system responding to zinc environmental stress (Appia-Ayme *et al.* 2012). Zinc ion binds to the periplasmic domain of the ZraS inner membrane protein inducing an autophosphorylation of the histidine kinase domain in the cytoplasmic side. ZraS protein once activated phosphorylates ZraR protein, a transcriptional activator binding DNA promoters of genes involved in zinc stress response and homeostasis. ZraR induces its own transcription coupled with *zraS* gene transcription in one strand and, the transcription of *zraP*



gene in the other strand. When zinc concentration increases, ZraP conformation changes (it forms an octamer), binds zinc in the periplasm trapping the excess of zinc and limits ZraS autophosphorylation (Leonhartsberger *et al.* 2001; Taher and de Rosny 2021). Our results suggest that 470 protein is responsible for Hg(II) resistance by acting as a periplasmic Hg scavenger, similar to ZraP and limits 2CSS (471-472) response.

Interestingly, downstream 470-471-472 cluster, two genes annotated as an efflux system and an outer membrane subunit (468, probably belonging to TolC superfamily) are also overexpressed in the presence of Hg(II) and repressed with MeHg. Efflux systems drive the extrusion of heavy metals from cytoplasm to the extracellular medium in exchange for protons (Paulsen *et al.* 1996). They are usually composed of three proteins: an outer membrane protein, an inner membrane protein and, a third connecting the two in the periplasmic space. The well-studied Cus system, involved in Cu efflux, has also a fourth protein involved in Cu efflux, CusF (Loftin *et al.* 2005). CusF is a periplasmic protein that binds copper in the periplasm and transfers the metal to the periplasmic subunit of the efflux system (Mealman *et al.* 2011). The system studied here showed a cotranscription of 470 gene (encoding for the periplasmic ZraP/CpxP-like protein) with 468 gene (encoding for the outer membrane TolC-like protein) suggesting that a similar link between sequestration and efflux of heavy metal could occur for Hg handling in BerOc1. The coupling of both sequestration and efflux systems could be a collective effort to eliminate heavy metal and to protect the cells against their toxicity.

Two other actors are probably involved in the resistance to Hg(II) in BerOc1. 469 gene is cotranscribed with 470, suggesting a common (or related) pathway or functioning. No similarities between 469 protein and proteins of known function could be found thus, its role in Hg(II) handling could not be suggested. This protein has a SHOCT domain which is widespread in bacteria. Several hypotheses about the function of this domain including oligomerisation and nucleic acid binding have been suggested, but not demonstrated so far (Eberhardt *et al.* 2013). Finally, 467 protein, which the encoding gene is cotranscribed with 468 (but not with 470), could also play a role in Hg(II) handling. This small protein shows a YHS domain but no similarities with proteins of known function, no putative role in Hg(II) resistance or accumulation. Nevertheless, it contains two cysteines that may be functionally important, and probably involved in metal binding (Ettema *et al.* 2003). Together, the gene localization of 467 between a TolC-like encoding gene (468) and a CusB-like encoding gene (466) and, its periplasmic localization suggest that 467 protein has probably a role in Hg(II) handling.

In any case, the deletion of 470-467 genes results in a lowest intracellular Hg(II) accumulation leading to lowest methylation rates. Similarly, a previous study showed a greater accumulation of intracellular mercury in the wild-type strains of *P. mercurii* ND132 and *G. sulfurreducens* PCA compared



to a strain deleted for the *hgcA* and *hgcB* genes, deficient for mercury methylation (Lin *et al.* 2014a). In addition, deletion of these genes resulted in an increase in the abundance of RND efflux systems including the outer membrane subunit of TolC superfamily (Qian *et al.* 2016, 2018). The TolC identified in the latter study shows 86% of identity to 468 BerOc1 gene studied suggesting that Hg resistant mechanism and Hg methylation are linked at the molecular level. Thus, our study considerably reinforces the previous proposal regarding cell coupling Hg uptake, Hg methylation and export of MeHg and, cellular homeostasis.

In conclusion, this study identified for the first time a genetic determinism involved in Hg(II) resistance in an anaerobic sulfate reducing bacterium. This genetic determinism further elucidates how methylating bacteria cope with Hg and its impact on Hg(II) methylation. Many unknowns still remain on its exact functioning but this system probably includes a periplasmic sequestration avoiding the 2CSS response, an Hg(II) efflux and two small proteins able to complex Hg(II). Future studies on the function of each protein encoded by genes from 472 to 466 would determine their exact role in Hg(II) resistance mechanism. The sequence analysis of the system in other microorganisms would be important to evaluate the distribution of these genes in microorganisms involved in the Hg geochemical cycle.

## CHAPITRE VII - Conclusions et perspectives



Disséminé dans l'ensemble des environnements et persistant, le mercure est un polluant majeur conduisant à des problèmes à la fois environnementaux et sanitaires. Sa transformation en une molécule hautement toxique, le méthylmercure (MeHg), capable d'être bioaccumulée et bioamplifiée le long de la chaîne trophique, est actuellement la principale cause des problèmes liés au mercure. Acteurs majeurs de cette production, les microorganismes capables de méthyler le mercure vivent dans les milieux anoxiques (*Barkay and Wagner-Döbler 2005; Kerin et al. 2006; Gilmour et al. 2013, 2018; Bravo et al. 2018; Compeau and Bartha 1985*). La production de méthylmercure est influencée par les facteurs environnementaux tels que des ligands soufrés ou la concentration en mercure. En revanche, aucun déterminisme génétique dont l'expression est induite en réponse au mercure (*Gilmour et al. 2011; Goñi-Urriza et al. 2015; Qian et al. 2016, 2018*), y compris les gènes *hgcA* et *hgcB* codant les protéines essentielles pour la réaction de méthylation du mercure (*Parks et al. 2013*), n'a été à ce jour identifié.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont permis d'identifier les premiers déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au mercure et dans sa méthylation chez une bactérie méthylante, la bactérie sulfato réductrice *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1. Ils ont de plus permis de montrer le rôle majeur des sulfures qu'ils soient exogènes ou endogènes (produits par la cellule) dans la production de méthylmercure. La difficulté de ce travail a été à la fois conceptuelle, pour savoir quels déterminismes génétiques cibler pour mener à bien cette étude et, technique, pour pouvoir générer des souches délétées des déterminismes génétiques sélectionnés. Conceptuellement, ce travail a ciblé deux déterminismes génétiques : le gène *arsR*, présent chez certaines bactéries méthylantes juste en amont des gènes *hgcA* et *hgcB*, acteurs de la méthylation du mercure (*Goñi-Urriza et al. 2020*) et, le cluster de gènes 470-467, quatre gènes adjacents au niveau génomique et, excepté le gène 467, surexprimés en présence de Hg(II) (*Goñi-Urriza et al. Données non publiées* **Préambule Chapitre VI**). Techniquement, la première partie de ce travail a permis de mettre au point un protocole reproductible pour générer des souches mutantes de délétion et fournir le matériel biologique nécessaire pour étudier l'implication de ces déterminismes génétiques dans la réponse au mercure et sa méthylation.

## 1. Transformation du mercure et résistance

Cette étude s'est attachée à identifier des facteurs impactant la méthylation du mercure. Tout d'abord, elle a démontré que la concentration en sulfures était un facteur déterminant dans la production de méthylmercure allant plus loin que les précédentes études sur le sujet qui pointaient plutôt le rôle des ligands thiols du mercure (*Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al. 2011, 2014; Liu*

*et al. 2016; Thomas et al. 2020*). Dans ce travail, les effets des thiols, des sulfures et du métabolisme bactérien sur la méthylation du mercure ont été évalués selon la concentration en sulfures mesurée, qu'ils soient exogènes (ajouté dans le milieu), ou produits de manière endogène (suite à la dégradation de molécules soufrées par la bactérie). Ainsi, il s'avère que les sulfures favorisent ou défavorisent la méthylation du mercure selon leur concentration. Cette étude a également démontré que l'augmentation de la concentration en sulfures joue un rôle déterminant dans l'export du MeHg (**Figure VII-1**).

En plus du rôle des sulfures, ces travaux de thèse ont permis d'identifier deux déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au Hg chez la souche BerOc1. Ces déterminismes lui confèrent des capacités différentes à la fois pour la transformation du mercure et, pour la résistance à ce dernier. Le premier déterminisme étudié code pour la protéine ArsR identifiée comme un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille ArsR-SmtB. La co transcription des gènes *arsR* et *hgca* (*Goñi-Urriza et al. 2020*) associée à la prédiction du site de fixation à l'ADN de ArsR au niveau de son promoteur (qui est de plus celui d'*hgca*) suggèrent fortement un lien entre ArsR et la méthylation du mercure. Même si un effet sur la méthylation du mercure a été observé, notamment à partir de 0.5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) ajouté, l'étude de la souche BerOc1  $\Delta arsR$  a plutôt suggéré une implication de la protéine ArsR dans la déméthylation du MeHg (**Figure VII-1**). Les résultats observés peuvent aussi être la conséquence de la surexpression de la protéine HgcA dans la souche délétée. Dans tous les cas, les résultats sont inédits et soulèvent de nombreuses questions, notamment sur le lien entre méthylation et déméthylation. De plus, ce phénotype semble certainement relié à la capacité de la souche à résister au MeHg puisque la souche mutante résiste ainsi jusqu'à une concentration de 4.7  $\mu\text{M}$  de MeHg c'est-à-dire environ 400 fois plus élevée que les concentrations en MeHg retrouvées dans les sédiments (*Kannan et al. 1998; Oswald and Carey 2016*).

Afin de distinguer la conséquence de l'absence de la protéine ArsR de celle de la surexpression d'HgcA et déterminer lequel de ces déterminismes génétiques étaient impliqués dans la déméthylation du mercure, les trois tentatives de génération d'une souche mutante n'impliquant que la délétion du gène *arsR* (remplacement du gène *arsR* par la cassette de la spectinomycine dans le sens inverse du gène *hgca* pour ne pas affecter le promoteur) ont été infructueuses. Au vu des pourcentages de réussite obtenus pour la génération des autres souches mutantes, il est très probable que la génération de cette souche soit infructueuse pour des raisons physiologiques. Il serait alors pertinent de changer de stratégie, et notamment d'envisager une complémentation de la souche BerOc1  $\Delta arsR$  avec le gène *arsR*. Ainsi, le phénotype vis-à-vis de la méthylation et la déméthylation chez les souches BerOc1 sauvage, BerOc1  $\Delta arsR$  (sans ArsR et qui surexprime HgcA) et BerOc1  $\Delta arsR$ +pBMC7*arsR* (qui possède ArsR et qui surexprime HgcA) pourra être comparé. Par ailleurs, il pourrait aussi être envisagé de

réaliser une expression hétérologue uniquement du cluster *hgcAhgcB*. Néanmoins, pour ne pas affecter la région promotrice, une délétion partielle d'*arsR* (incluant le codon START de la traduction de la protéine ArsR) devra être envisagée. La comparaison de ces cinq souches (BerOc1 sauvage, BerOc1  $\Delta$ *arsR*, BerOc1  $\Delta$ *arsR*+pBMC7*arsR*, G20 + pBMK7*arsRhgcAhgcB* et G20 + pBMK7*hgcAhgcB*) au niveau de la résistance au Hg et de la méthylation et déméthylation du Hg permettra d'apporter des informations sur le rôle d'ArsR dans la réponse de la cellule au Hg et ses transformations.

Le second déterminisme étudié dans le cadre de ma thèse fait appel aux systèmes codés par le cluster de gènes 470-467. Il a été démontré que la délétion de ces systèmes diminue les taux de méthylation et induit une sensibilité au Hg(II) ; ces déterminismes génétiques impliqueraient un système de séquestration du mercure couplé à un système d'efflux. Cette étude a démontré que ces systèmes se déclenchent pour des concentrations excédant 0.5  $\mu$ M de Hg(II). La plus faible accumulation de Hg(II) observée dans la souche mutante suggère fortement que le système de séquestration a un rôle majeur dans la résistance. Il est important, maintenant que le phénotype observé est très marqué, de distinguer sans équivoque le rôle d'un système par rapport à l'autre. Pour cela, il faudrait soit, uniquement déléter les couples de gènes 470-469 ou 468-467 chez une souche BerOc1 sauvage soit, compléter la souche  $\Delta$ 470-467 actuellement disponible avec un de ces deux couples. En effet, la co transcription de ces deux couples de gènes démontrée dans ce travail est un facteur à prendre sérieusement en considération pour comprendre le lien entre les deux mécanismes.

Ensemble, les résultats obtenus corroborent l'hypothèse proposant un lien entre la méthylation du Hg(II), son assimilation, l'export du MeHg et l'homéostasie cellulaire (Schaefer and Morel 2009; Qian et al. 2016, 2018). Ils suggèrent que, de manière générale, les systèmes répondant au Hg(II) et impactant la méthylation du mercure se mettent en place à partir de 0.5  $\mu$ M de Hg(II) ajouté. Ce travail a aussi mis en évidence un lien, probablement indirect, entre la résistance au Hg(II) et la méthylation du Hg(II) et, la résistance au MeHg et la déméthylation du MeHg.

## 2. Une réponse plus globale que la transformation du Hg ?

Au-delà des conséquences sur les transformations du mercure et les mécanismes de résistance associés, ce travail a permis de mettre en évidence l'implication du cluster de gènes *arsRhgcAhgcB* dans la physiologie cellulaire. D'une part, deux résultats ont appuyé qu'il existait un lien entre ce cluster de gènes et la motilité cellulaire. Premièrement, une perte de la motilité a été observée à la fois chez la souche délétée pour le gène *arsR* et chez la souche délétée pour le gène *hgcB*. Deuxièmement, un site putatif de fixation d'ArsR a été retrouvé en amont d'un gène codant une protéine appartenant à la famille des protéines de chimiotaxie acceptant le méthyl (MCP), famille impliquée dans la motilité cellulaire (**Figure VII-1**). D'autre part, un lien entre le cluster de gènes

*arsRhgcAhgcB* et le métabolisme a été suggéré. En effet, au cours de croissance en respiration sulfate, une diminution de la production de sulfure quasiment de moitié a été mesurée chez la souche G20 + pBMK7*arsRhgcAhgcB* comparée à la souche G20 sauvage. La production de sulfure chez la souche G20 + pBMK7*arsRhgcAhgcB* est alors devenue équivalente à celle mesurée chez la souche BerOc1 sauvage (possédant ce cluster physiologiquement). Ce résultat inattendu devra être confirmé mais suggère que le cluster de gènes *arsRhgcAhgcB* pourrait impacter le métabolisme *a minima* de respiration sulfate chez les bactéries sulfato réductrices et appuie, avec l'impact sur la motilité cellulaire, l'importance d'identifier le rôle du cluster *arsRhgcAhgcB* dans la physiologie cellulaire.

Cette étude a aussi prédit que le système de séquestration du Hg(II) (gène 470) semble être la troisième protéine d'un système de transduction du signal à deux composantes (gènes 471 et 472). Ces systèmes sont connus dans la réponse aux métaux pour entraîner, grâce à l'action d'un régulateur transcriptionnel, une réponse cellulaire globale et notamment l'induction du système de séquestration (Petit-Härtlein et al. 2015; Taher and de Rosny 2021). Un site putatif de fixation à l'ADN du régulateur codé par le gène 472 a été mis en évidence en amont du gène 470. La localisation de ce site implique de plus un lien avec une sous unité d'un système d'efflux des métaux (gène 468) démontrée comme étant co transcrite avec le gène 470. Cependant, alors que le gène 469 est lui aussi cotranscrit avec le gène 470, le quatrième gène (gène 467) n'est cotranscrit qu'avec le gène 468. Une étude plus approfondie sur ce cluster de gènes devrait être menée pour comprendre les conditions sous lesquelles l'expression de ces gènes est induite et ainsi déterminer sous quelles conditions la fixation de la protéine codée par le gène 472 entraîne une induction de l'ensemble du cluster.

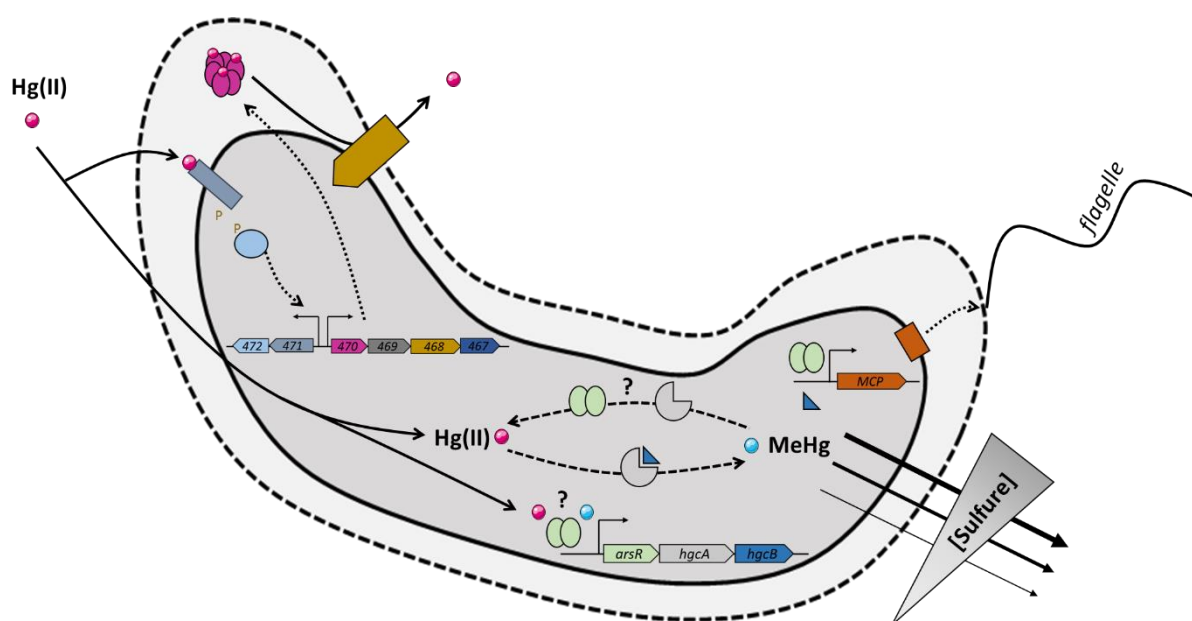
L'ensemble de ces résultats permet d'émettre des hypothèses sur la réponse au Hg(II) par la souche BerOc1 (**Figure VII-1**) dans lesquelles, le Hg(II) serait alors :

- (i) Méthylé par les protéines HgcA et HgcB conduisant à la formation de MeHg (Parks et al. 2013) et dont la présence (*a minima* de HgcB) est de plus nécessaire à la motilité cellulaire.
- (ii) Détecté par le système à deux composantes entraînant à la fois à la mise en place d'un système de séquestration et d'un système d'efflux.
- (iii) Impliqué dans l'expression de la protéine ArsR qui pourrait jouer un rôle indirect ou direct de régulation dans la production de MeHg mais aussi, sur la motilité cellulaire *via* les protéines MCP.

De manière intéressante, deux régulateurs, le régulateur du système à deux composantes et la protéine ArsR, semblent impliqués dans la réponse au Hg(II) chez la souche BerOc1 suggérant une réponse plus globale encore non élucidée. Un des axes futurs pour la compréhension de la réponse au Hg(II) serait alors l'identification des gènes régulés par ces deux protéines. Les séquences de fixation

des régulateurs sont en général des séquences peu conservées (ou avec une conservation partielle) rendant difficile l'identification *in silico* de l'ensemble des gènes régulés par ces protéines. Expérimentalement, il serait pertinent de purifier ces deux régulateurs pour procéder à des expériences de gel retard tout d'abord au niveau de leur propre promoteur mais aussi, spécifiquement pour ArsR, au niveau du promoteur de la protéine MCP. Ces purifications pourront de plus permettre de préciser les concentrations en Hg(II) entraînant la fixation et la libération de ces régions promotrices et mieux comprendre leur mode d'action. Pour avoir une vision plus globale de cette réponse, des expériences de CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) permettant de co immunoprécipiter une protéine avec les séquences génomiques qu'elle est capable de fixer pour finalement les identifier par séquençage serait alors à envisager. Cette étude devra être couplée à la caractérisation de la souche délétée *a minima* pour le régulateur du système à deux composantes afin d'évaluer les conséquences de son absence sur la résistance, l'efflux et la séquestration et, la méthylation du Hg(II).

Une autre perspective d'étude concernant la protéine ArsR serait de déterminer si cette réponse est spécifique au mercure. En effet, les membres de la famille ArsR-SmtB peuvent lier différents métaux. Des études visant à identifier par SEC ICPMS (Size exclusion chromatography (SEC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS)) les métaux pouvant être fixés par la protéine ArsR et déterminer le ou les métaux ayant le plus d'affinité pour cette protéine en incubant un cocktail de métaux pourront être effectuées. L'identification des métaux capables de se fixer à la



**Figure VII-1** : Représentation schématique des conclusions et des hypothèses mises en évidence au cours de ce travail de thèse sur les déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au Hg(II) et dans sa méthylation/déméthylation chez la bactérie sulfato réductrice *P. hydragryri* souche BerOc1. *hgcA* et *hgcB* : Parks et al. 2013. *arsR*, *MCP* et cluster de gènes 472, 471, 470, 469, 468 et 467 : cette étude. P : phosphorylation activatrice.



protéine ArsR de BerOc1 pourrait aussi être envisagée par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Cette méthode, en plus d'informer sur l'affinité et le panel de métaux se fixant à ArsR, pourra informer sur la dynamique du dimère de protéines ArsR lors de la fixation du métal et mieux comprendre son mode d'action.

### 3. Une réponse au mercure ubiquiste chez les bactéries méthylantes ?

Dans cette étude, les déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au mercure ont été mis en évidence chez une bactérie méthylante, la souche BerOc1. Cependant, ils ne semblent pas se limiter uniquement à cette souche. En effet, des études de protéomique différentielle comparant une souche méthylante et son mutant délété des gènes *hgcAB* ont mis en évidence la surproduction de protéines appartenant à la famille des RND (Qian et al. 2016, 2018). Le gène codant la sous unité de la membrane externe de ce système RND surexprimé possède 86% d'identité avec le gène 468 étudié dans nos travaux, indiquant qu'il s'agit probablement du même système d'efflux.

De plus, notre étude a démontré que le cluster *arsRhgcAhgcB* conduisait à l'acquisition de la capacité à méthyler le mercure chez une souche non méthylante. Le fait que des souches non méthylantes puissent acquérir la capacité à méthyler le mercure simplement par l'acquisition du cluster *arsRhgcAhgcB* et que ces dernières ne présentent aucune difficulté à supporter la capacité de méthyler le mercure amène à se poser la question sur l'acquisition de ce cluster de gènes par les microorganismes. Une plasticité génomique au niveau de ce cluster pourrait en effet avoir un impact considérable sur la diversité des souches capables de méthyler le mercure. Une précédente étude sur l'organisation génomique des *Pseudodesulfovibrio* et des *Desulfovibrio* a proposé que le gène *hgcB* pourrait constituer une zone de plasticité génomique suite à l'observation chez une souche d'une inversion complète d'un locus génomique à partir de ce gène (Goñi-Urriza et al. 2020). Dans la suite de cette idée, il apparaît important de déterminer la diversité des souches méthylantes possédant un régulateur transcriptionnel en amont des gènes *hgcAB* ce qui permettra de (i) mieux comprendre son rôle et (ii) déterminer son origine et son évolution. Des analyses *in silico* préliminaires visant à déterminer la plasticité du génome au niveau du cluster *arsRhgcAhgcB* (et donc la possibilité qu'un transfert horizontal de ce cluster puisse se faire) ont été réalisées durant ce travail. En effet, notre étude a permis de montrer que l'organisation synténique du cluster *arsRhgcAhgcB* chez certaines souches méthylantes était loin d'être anodine puisque l'ensemble des protéines ArsR retrouvées en synténie avec les gènes *hgcAB* appartiennent à la classe  $\alpha 35$  alors qu'une autre classe est codée en absence de synténie. La classe est déterminée par les motifs de liaison aux métaux. Elle est donc cruciale dans le rôle de la protéine. De plus, ces analyses ont montré que la protéine ArsR n'est pas

associée à une diversité phylogénétique proche puisque retrouvée au sein de divers genres. Des résultats en cours d'analyse suggèrent qu'une partie des souches méthanogènes pures dont la capacité à méthyler le mercure a été démontrée expérimentalement (*Methanospirillum hungatei*, *Methanocella paludicola*, *Methanocorpusculum bavaricum*, *Methanofollis liminatans* et *Methanosphaerula palustris*, Gilmour et al. 2018) possèdent un régulateur transcriptionnel en amont des gènes codant les protéines HgcA et HgcB. Certains sont prédits comme des métallorégulateurs transcriptionnels appartenant à la famille ArsR-SmtB et d'autres en tant que protéines contenant un domaine de liaison à l'ADN de la famille AbrB/MazE/SpoVT connue comme pouvant réguler une multitude de gènes dont des gènes impliqués dans la croissance, la motilité cellulaire ou encore la synthèse de molécules permettant la résistance aux antibiotiques (non exhaustif (Phillips and Strauch 2002)). De plus, une étude de métagénomique a prédit que l'acquisition par transfert horizontal du gène *hgcA* était certainement due à des événements indépendants qui ont conduit à sa distribution au sein de plusieurs phyla comprenant les *Desulfobacterota* (anciennement classe *Deltaproteobacteria*), *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, et les *Actinobacteria* (McDaniel et al. 2020). Cette étude a montré que le cluster *hgcAhgcB* retrouvé dans ces phyla est précédé par un potentiel régulateur transcriptionnel séparé du cluster par un gène *a minima*. Une analyse exhaustive de la diversité des gènes *hgcAhgcB* associé au gène *arsR* en synténie apparaît importante à réaliser pour répondre en partie ou entièrement à : (i) l'origine évolutive ayant conduit aux microorganismes méthylants et (ii) l'origine évolutive ayant conduit à une majorité de microorganismes méthylants dans les milieux anoxiques.

Globalement, il apparaît important de réaliser des analyses *in silico* sur la diversité des souches possédant les deux déterminismes génétiques mis en évidence dans ce travail de thèse comme étant des acteurs clés dans la réponse au mercure chez les bactéries capables de méthyler le mercure. Les bases de ce travail de recherche associées à des études sur la diversité pourraient apporter une meilleure compréhension de la réponse au mercure au niveau de la communauté microbienne méthylante et du mécanisme permettant la production de MeHg toutes deux importantes pour la prévention et la mesure des risques liés au mercure dans l'environnement.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Abiko Y, Katayama Y, Akiyama M, Kumagai Y (2021) Lipophilic compounds in garlic decrease the toxicity of methylmercury by forming sulfur adducts. *Food and Chemical Toxicology* 150:112061. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112061>
- Accornero A, Gnerre R, Manfra L (2008) Sediment Concentrations of Trace Metals in the Berre Lagoon (France): An Assessment of Contamination. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:372–385. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9049-6>
- Adediran GA, Liem-Nguyen V, Song Y, et al (2019) Microbial Biosynthesis of Thiol Compounds: Implications for Speciation, Cellular Uptake, and Methylation of Hg(II). *Environ Sci Technol* 53:8187–8196. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01502>
- Aiking H, Govers H, van 't Riet J (1985) Detoxification of mercury, cadmium, and lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 50:1262–1267. <https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1262-1267.1985>
- Allen RC, Tu Y-K, Nevarez MJ, et al (2013) The mercury resistance (*mer*) operon in a marine gliding flavobacterium, *Tenacibaculum discolor* 9A5. *FEMS Microbiol Ecol* 83:135–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01460.x>
- Amyot M, Morel FMM, Ariya PA (2005) Dark Oxidation of Dissolved and Liquid Elemental Mercury in Aquatic Environments. *Environ Sci Technol* 39:110–114. <https://doi.org/10.1021/es035444k>
- An J, Zhang L, Lu X, et al (2019) Mercury Uptake by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132: Passive or Active? *Environ Sci Technol* 53:6264–6272. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00047>
- Andrei A, Öztürk Y, Khalfaoui-Hassani B, et al (2020) Cu Homeostasis in Bacteria: The Ins and Outs. *Membranes* 10:242. <https://doi.org/10.3390/membranes10090242>
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
- Appia-Ayme C, Hall A, Patrick E, et al (2012) ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR. *Biochem J* 442:85–93. <https://doi.org/10.1042/BJ20111639>
- Astakhov AS, Ivanov MV, Li BYa (2011) Hydrochemical and atmochemical mercury dispersion zones over hydrothermal vents of the submarine Piip Volcano in the Bering Sea. *Oceanology* 51:826. <https://doi.org/10.1134/S0001437011050031>
- Atchison WD, Hare MF (1994) Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *The FASEB Journal* 8:622–629. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.9.7516300>
- Azaroff A, Goñi Urriza M, Gassie C, et al (2020) Marine mercury-methylating microbial communities from coastal to Capbreton Canyon sediments (North Atlantic Ocean). *Environmental Pollution* 262:114333. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114333>
- Bae H-S, Dierberg FE, Ogram A (2014) Syntrophs Dominate Sequences Associated with the Mercury Methylation-Related Gene *hgcA* in the Water Conservation Areas of the Florida Everglades. *Appl Environ Microbiol* 80:6517–6526. <https://doi.org/10.1128/AEM.01666-14>

- Bagai I, Rensing C, Blackburn NJ, McEvoy MM (2008) Direct Metal Transfer between Periplasmic Proteins Identifies a Bacterial Copper Chaperone. *Biochemistry* 47:11408–11414. <https://doi.org/10.1021/bi801638m>
- Baksh KA, Zamble DB (2020) Allosteric control of metal-responsive transcriptional regulators in bacteria. *J Biol Chem* 295:1673–1684. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.011444>
- Baranova N, Nikaido H (2002) The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* 184:4168–4176. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4168-4176.2002>
- Barkay T (1987) Adaptation of Aquatic Microbial Communities to Hg<sup>2+</sup> Stress. *Appl Environ Microbiol* 53:2725–2732
- Barkay T, Kritee K, Boyd E, Geesey G (2010) A thermophilic bacterial origin and subsequent constraints by redox, light and salinity on the evolution of the microbial mercuric reductase. *Environ Microbiol* 12:2904–2917. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02260.x>
- Barkay T, Wagner-Döbler I (2005) Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp 1–52
- Ben Fekih I, Zhang C, Li YP, et al (2018) Distribution of Arsenic Resistance Genes in Prokaryotes. *Frontiers in Microbiology* 9:
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP (2001a) The Influence of Sulfide on Solid-Phase Mercury Bioavailability for Methylation by Pure Cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Environmental Science & Technology* 35:127–132. <https://doi.org/10.1021/es001415n>
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP (2001b) Aspects of Bioavailability of Mercury for Methylation in Pure Cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Applied and Environmental Microbiology* 67:51–58. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.51-58.2001>
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP, Heyes A (1999a) Sulfide Controls on Mercury Speciation and Bioavailability to Methylating Bacteria in Sediment Pore Waters. *Environmental Science & Technology* 33:951–957. <https://doi.org/10.1021/es9808200>
- Benoit JM, Mason RP, Gilmour CC (1999b) Estimation of mercury-sulfide speciation in sediment pore waters using octanol-water partitioning and implications for availability to methylating bacteria: Mercury-sulfide speciation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:2138–2141. <https://doi.org/10.1002/etc.5620181004>
- Bhate MP, Molnar KS, Goulian M, DeGrado WF (2015) Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure* 23:981–994. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.04.002>
- Bouchet S, Goñi-Urriza M, Monperrus M, et al (2018) Linking Microbial Activities and Low-Molecular-Weight Thiols to Hg Methylation in Biofilms and Periphyton from High-Altitude Tropical Lakes in the Bolivian Altiplano. *Environmental Science & Technology* 52:9758–9767. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01885>
- Boudou A, Ribeyre F (1997) Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms. *Met Ions Biol Syst* 34:289–319

- Boyd E, Barkay T (2012) The Mercury Resistance Operon: From an Origin in a Geothermal Environment to an Efficient Detoxification Machine. *Frontiers in Microbiology* 3:349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00349>
- Bravo AG, Zopfi J, Buck M, et al (2018) Geobacteraceae are important members of mercury-methylating microbial communities of sediments impacted by waste water releases. *The ISME Journal* 12:802–812. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0007-7>
- Bridou R, Monperrus M, Gonzalez PR, et al (2011) Simultaneous determination of mercury methylation and demethylation capacities of various sulfate-reducing bacteria using species-specific isotopic tracers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30:337–344. <https://doi.org/10.1002/etc.395>
- Brünker P, Rother D, Sedlmeier R, et al (1996) Regulation of the operon responsible for broad-spectrum mercury resistance in *Streptomyces lividans* 1326. *Mol Gen Genet* 251:307–315. <https://doi.org/10.1007/BF02172521>
- Cao J, Gayet N, Zeng X, et al (2016) *Pseudodesulfovibrio indicus* gen. nov., sp. nov., a piezophilic sulfate-reducing bacterium from the Indian Ocean and reclassification of four species of the genus *Desulfovibrio*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:3904–3911. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001286>
- Capdevila DA, Edmonds KA, Giedroc DP (2017) Metallochaperones and metalloregulation in bacteria. *Essays in Biochemistry* 61:177–200. <https://doi.org/10.1042/EBC20160076>
- Capo E, Broman E, Bonaglia S, et al (2022) Oxygen-deficient water zones in the Baltic Sea promote uncharacterized Hg methylating microorganisms in underlying sediments. *Limnology and Oceanography* 67:135–146. <https://doi.org/10.1002/lno.11981>
- Celo V, Lean DRS, Scott SL (2006) Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Science of The Total Environment* 368:126–137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.043>
- Cha JS, Cooksey DA (1991) Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8915–8919
- Chacon KN, Mealman TD, McEvoy MM, Blackburn NJ (2014) Tracking metal ions through a Cu/Ag efflux pump assigns the functional roles of the periplasmic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:15373–15378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411475111>
- Chapman L, Chan HM (2000) The influence of nutrition on methyl mercury intoxication. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 1:29–56. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s129>
- Choe K-Y, Gill GA, Lehman R (2003) Distribution of particulate, colloidal, and dissolved mercury in San Francisco Bay estuary. 1. Total mercury. *Limnology and Oceanography* 48:1535–1546. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.4.1535>
- Choi S-C, Bartha R (1993) Cobalamin-Mediated Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LSt. 59:6
- Choi S-C, Chase T, Bartha R (1994) Metabolic Pathways Leading to Mercury Methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl Environ Microbiol* 60:4072–4077



- Christakis CA, Barkay T, Boyd ES (2021) Expanded Diversity and Phylogeny of mer Genes Broadens Mercury Resistance Paradigms and Reveals an Origin for MerA Among Thermophilic Archaea. *Front Microbiol* 12:682605. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682605>
- Cline JD (1969) SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF HYDROGEN SULFIDE IN NATURAL WATERS1. *Limnology and Oceanography* 14:454–458. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.3.0454>
- Compeau GC, Bartha R Sulfate-Reducing Bacteria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sedimentt. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 5
- Cooper CJ, Zheng K, Rush KW, et al (2020) Structure determination of the HgcAB complex using metagenome sequence data: insights into microbial mercury methylation. *Commun Biol* 3:1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1047-5>
- Costa M, Liss PS (1999) Photoreduction of mercury in sea water and its possible implications for Hg0 air–sea fluxes. *Marine Chemistry* 68:87–95. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00067-5)
- Date SS, Parks JM, Rush KW, et al (2019) Kinetics of Enzymatic Mercury Methylation at Nanomolar Concentrations Catalyzed by HgcAB. *Appl Environ Microbiol* 85:. <https://doi.org/10.1128/AEM.00438-19>
- Deonaraine A, Hsu-Kim H (2009) Precipitation of mercuric sulfide nanoparticles in NOM-containing water: implications for the natural environment. *Environ Sci Technol* 43:2368–2373. <https://doi.org/10.1021/es803130h>
- Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, et al (2013) Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environ Sci Technol* 47:4967–4983. <https://doi.org/10.1021/es305071v>
- Drott A, Lambertsson L, Björn E, Skjellberg U (2007) Importance of Dissolved Neutral Mercury Sulfides for Methyl Mercury Production in Contaminated Sediments. *Environmental Science & Technology* 41:2270–2276. <https://doi.org/10.1021/es061724z>
- Eberhardt RY, Bartholdson SJ, Punta M, Bateman A (2013) The SHOCT Domain: A Widespread Domain Under-Represented in Model Organisms. *PLOS ONE* 8:e57848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057848>
- Endo G, Silver S (1995) CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol* 177:4437–4441. <https://doi.org/10.1128/jb.177.15.4437-4441.1995>
- Essa AMM, Macaskie LE, Brown NL (2002) Mechanisms of mercury bioremediation. *Biochemical Society Transactions* 30:672–674. <https://doi.org/10.1042/bst0300672>
- Essa AMM, Macaskie LE, Brown NL (2005) A New Method for Mercury Removal. *Biotechnol Lett* 27:1649–1655. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2722-9>
- Ettema T, Huynen M, De Vos W, Oost J (2003) TRASH: A novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance. *Trends in biochemical sciences* 28:170–3. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00037-9)

- Farina M, Rocha JBT, Aschner M (2011) Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sciences* 89:555–563. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.019>
- Feio MJ (2004) *Desulfovibrio alaskensis* sp. nov., a sulphate-reducing bacterium from a soured oil reservoir. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 54:1747–1752. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63118-0>
- Findlay AJ (2016) Microbial impact on polysulfide dynamics in the environment. *FEMS Microbiology Letters* 363:fnw103. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw103>
- Findlay AJ, Kamyshny A (2017) Turnover Rates of Intermediate Sulfur Species ( $S_x^{2-}$ ,  $S_0$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $S_4O_6^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ) in Anoxic Freshwater and Sediments. *Frontiers in Microbiology* 8:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02551>
- Fortin D, Southam G, Beveridge TJ (1994) Nickel sulfide, iron-nickel sulfide and iron sulfide precipitation by a newly isolated *Desulfotomaculum* species and its relation to nickel resistance. *FEMS Microbiology Ecology* 14:121–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1994.tb00099.x>
- Franke S, Grass G, Nies DH (2001) The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology (Reading)* 147:965–972. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-965>
- Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH (2003) Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System *CusCFBA* of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 185:3804–3812. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3804-3812.2003>
- Fu H-L, Meng Y, Ordóñez E, et al (2009) Properties of Arsenite Efflux Permeases (*Acr3*) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* 284:19887–19895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011882>
- Gao C-H, Yang M, He Z-G (2011) An *ArsR*-like transcriptional factor recognizes a conserved sequence motif and positively regulates the expression of *phoP* in mycobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411:726–731. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.014>
- Gao R, Stock AM (2009) Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annu Rev Microbiol* 63:133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
- Gentès S, Taupiac J, Colin Y, et al (2017) Bacterial periphytic communities related to mercury methylation within aquatic plant roots from a temperate freshwater lake (South-Western France). *Environ Sci Pollut Res* 24:19223–19233. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9597-x>
- Gerbig CA, Kim CS, Stegemeier JP, et al (2011) Formation of Nanocolloidal Metacinnabar in Mercury-DOM-Sulfide Systems. *Environ Sci Technol* 45:9180–9187. <https://doi.org/10.1021/es201837h>
- Gilmour CC, Bullock AL, McBurney A, et al (2018) Robust Mercury Methylation across Diverse Methanogenic Archaea. *mBio* 9:e02403-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02403-17>
- Gilmour CC, Elias DA, Kucken AM, et al (2011) Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a Model for Understanding Bacterial Mercury Methylation. *Applied and Environmental Microbiology* 77:3938–3951. <https://doi.org/10.1128/AEM.02993-10>

- Gilmour CC, Henry EA (1991) Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution* 71:131–169. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90031-Q](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90031-Q)
- Gilmour CC, Henry EA, Mitchell R (1992) Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environ Sci Technol* 26:2281–2287. <https://doi.org/10.1021/es00035a029>
- Gilmour CC, Podar M, Bullock AL, et al (2013) Mercury Methylation by Novel Microorganisms from New Environments. *Environmental Science & Technology* 47:11810–11820. <https://doi.org/10.1021/es403075t>
- Gionfriddo CM, Tate MT, Wick RR, et al (2016) Microbial mercury methylation in Antarctic sea ice. *Nature Microbiology* 1:. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.127>
- Glendinning KJ, Macaskie LE, Brown NL (2005) Mercury Tolerance of Thermophilic *Bacillus* sp. and *Ureibacillus* sp. *Biotechnol Lett* 27:1657–1662. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2723-8>
- Golding GR, Kelly CA, Sparling R, et al (2002) Evidence for facilitated uptake of Hg(II) by *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* under anaerobic and aerobic conditions. *Limnology & Oceanography* 967–975
- Goñi-Urriza M, Gassie C, Bouchez O, et al (2017) Draft Genome Sequence of *Desulfovibrio* BerOc1, a Mercury-Methylating Strain. *Genome Announcements* 5:. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01483-16>
- Goñi-Urriza M, Corsellis Y, Lancelleur L, et al (2015) Relationships between bacterial energetic metabolism, mercury methylation potential, and *hgcA/hgcB* gene expression in *Desulfovibrio dechloroacetivorans* BerOc1. *Environmental Science and Pollution Research* 22:13764–13771. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4273-5>
- Goñi-Urriza M, Klopp C, Ranchou-Peyruse M, et al (2020) Genome insights of mercury methylation among *Desulfovibrio* and *Pseudodesulfovibrio* strains. *Research in Microbiology* 171:3–12. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.10.003>
- Graham AM, Aiken GR, Gilmour CC (2012a) Dissolved Organic Matter Enhances Microbial Mercury Methylation Under Sulfidic Conditions. *Environ Sci Technol* 46:2715–2723. <https://doi.org/10.1021/es203658f>
- Graham AM, Bullock AL, Maizel AC, et al (2012b) Detailed Assessment of the Kinetics of Hg-Cell Association, Hg Methylation, and Methylmercury Degradation in Several *Desulfovibrio* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 78:7337–7346. <https://doi.org/10.1128/AEM.01792-12>
- Grégoire DS, Lavoie NC, Poulain AJ (2018) Heliobacteria Reveal Fermentation As a Key Pathway for Mercury Reduction in Anoxic Environments. *Environ Sci Technol* 52:4145–4153. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00320>
- Grégoire DS, Poulain AJ (2016) A physiological role for HgII during phototrophic growth. *Nature Geosci* 9:121–125. <https://doi.org/10.1038/ngeo2629>
- Grégoire DS, Poulain AJ (2018) Shining light on recent advances in microbial mercury cycling. *FACETS*. <https://doi.org/10.1139/facets-2018-0015>

- Gu B, Bian Y, Miller CL, et al (2011) Mercury reduction and complexation by natural organic matter in anoxic environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:1479–1483. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008747108>
- Gudipaty SA, Larsen AS, Rensing C, McEvoy MM (2012) Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS. *FEMS Microbiol Lett* 330:30–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02529.x>
- Gutknecht J (1981) Inorganic mercury (Hg<sup>2+</sup>) transport through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* 61:61–66. <https://doi.org/10.1007/BF01870753>
- Hamelin S, Amyot M, Barkay T, et al (2011) Methanogens: Principal Methylators of Mercury in Lake Periphyton. *Environmental Science & Technology* 45:7693–7700. <https://doi.org/10.1021/es2010072>
- Hamlett NV, Landale EC, Davis BH, Summers AO (1992) Roles of the Tn21 merT, merP, and merC gene products in mercury resistance and mercury binding. *J Bacteriol* 174:6377–6385
- Harada M (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25:1–24. <https://doi.org/10.3109/10408449509089885>
- Hauser LJ, Land ML, Brown SD, et al (2011) Complete Genome Sequence and Updated Annotation of *Desulfovibrio alaskensis* G20<sup>ⓧ</sup>. *J Bacteriol* 193:4268–4269. <https://doi.org/10.1128/JB.05400-11>
- Helling RB, Janes BK, Kimball H, et al (2002) Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:3699–3703. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3699-3703.2002>
- Higgins MK, Bokma E, Koronakis E, et al (2004) Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9994–9999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400375101>
- Hsu-Kim H, Kucharzyk KH, Zhang T, Deshusses MA (2013) Mechanisms Regulating Mercury Bioavailability for Methylating Microorganisms in the Aquatic Environment: A Critical Review. *Environmental Science & Technology* 47:2441–2456. <https://doi.org/10.1021/es304370g>
- Hu H, Lin H, Zheng W, et al (2013) Mercury Reduction and Cell-Surface Adsorption by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Environ Sci Technol* 47:10922–10930. <https://doi.org/10.1021/es400527m>
- Isaure M-P, Albertelli M, Kieffer I, et al (2020) Relationship Between Hg Speciation and Hg Methylation/Demethylation Processes in the Sulfate-Reducing Bacterium *Pseudodesulfovibrio hydrargyri*: Evidences From HERFD-XANES and Nano-XRF. *Front Microbiol* 11:584715. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584715>
- Jay JA, Morel FMM, Hemond HF (2000) Mercury Speciation in the Presence of Polysulfides. *Environmental Science & Technology* 34:2196–2200. <https://doi.org/10.1021/es9911115>
- Jay JA, Murray KJ, Gilmour CC, et al (2002) Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 in the Presence of Polysulfides. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5741–5745. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5741-5745.2002>

- Jensen S, Jernelöv A (1969) Biological Methylation of Mercury in Aquatic Organisms. *Nature* 223:753–754. <https://doi.org/10.1038/223753a0>
- Joe-Wong C, Shoenfelt E, Hauser EJ, et al (2012) Estimation of Reactive Thiol Concentrations in Dissolved Organic Matter and Bacterial Cell Membranes in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology* 120831120231009. <https://doi.org/10.1021/es301381n>
- Jones DS, Walker GM, Johnson NW, et al (2019) Molecular evidence for novel mercury methylating microorganisms in sulfate-impacted lakes. *ISME J* 13:1659–1675. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0376-1>
- Jørgensen BB, Findlay AJ, Pellerin A (2019) The Biogeochemical Sulfur Cycle of Marine Sediments. *Frontiers in Microbiology* 10:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00849>
- Jung K, Fried L, Behr S, Heermann R (2012) Histidine kinases and response regulators in networks. *Current Opinion in Microbiology* 15:118–124. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.009>
- Kannan K, Jr. RGS, Lee RF, et al (1998) Distribution of Total Mercury and Methyl Mercury in Water, Sediment, and Fish from South Florida Estuaries. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34:109–118. <https://doi.org/10.1007/s002449900294>
- Kanzler CR, Lian P, Trainer EL, et al (2018) Emerging investigator series: methylmercury speciation and dimethylmercury production in sulfidic solutions. *Environmental Science: Processes & Impacts* 20:. <https://doi.org/10.1039/C7EM00533D>
- Kaur P, Rosen BP (1992) Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. *Plasmid* 27:29–40. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(92\)90004-T](https://doi.org/10.1016/0147-619X(92)90004-T)
- Keller KL, Wall JD, Chhabra S (2011) Methods for Engineering Sulfate Reducing Bacteria of the Genus *Desulfovibrio*. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp 503–517
- Kerin EJ, Gilmour CC, Roden E, et al (2006) Mercury Methylation by Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7919–7921. <https://doi.org/10.1128/AEM.01602-06>
- Kim E-H, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C (2011) Switch or Funnel: How RND-Type Transport Systems Control Periplasmic Metal Homeostasis. *J Bacteriol* 193:2381–2387. <https://doi.org/10.1128/JB.01323-10>
- Kittleson JT, Loftin IR, Hausrath AC, et al (2006) Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI. *Biochemistry* 45:11096–11102. <https://doi.org/10.1021/bi0612622>
- Kiyono M, Pan-Hou H (1999) The merG gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. *J Bacteriol* 181:726–730. <https://doi.org/10.1128/JB.181.3.726-730.1999>
- Kucharzyk KH, Deshusses MA, Porter KA, Hsu-Kim H (2015) Relative contributions of mercury bioavailability and microbial growth rate on net methylmercury production by anaerobic mixed cultures. *Environ Sci Process Impacts* 17:1568–1577. <https://doi.org/10.1039/c5em00174a>

- Kuroda T, Tsuchiya T (2009) Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1794:763–768. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.012>
- Lalonde JD, Amyot M, Kraepiel AML, Morel FMM (2001) Photooxidation of Hg(0) in Artificial and Natural Waters. *Environ Sci Technol* 35:1367–1372. <https://doi.org/10.1021/es001408z>
- Lee S, Kim D-H, Kim K-W (2018) The enhancement and inhibition of mercury reduction by natural organic matter in the presence of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Chemosphere* 194:515–522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.007>
- Lefebvre DD, Kelly D, Budd K (2007) Biotransformation of Hg(II) by Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 73:243–249. <https://doi.org/10.1128/AEM.01794-06>
- Leonhartsberger S, Huber A, Lottspeich F, Böck A (2001) The *hydH/G* genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *Journal of Molecular Biology* 307:93–105. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4451>
- Li X, Luo Q, Wofford NQ, et al (2009) A Molybdopterin Oxidoreductase Is Involved in H<sub>2</sub> Oxidation in *Desulfovibrio desulfuricans* G20. *J Bacteriol* 191:2675–2682. <https://doi.org/10.1128/JB.01814-08>
- Li XZ, Nikaido H, Williams KE (1997) Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag<sup>+</sup> and are deficient in porins. *J Bacteriol* 179:6127–6132
- Li Y, Zhao J, Zhong H, et al (2019) Understanding Enhanced Microbial MeHg Production in Mining-Contaminated Paddy Soils under Sulfate Amendment: Changes in Hg Mobility or Microbial Methylators? *Environ Sci Technol* 53:1844–1852. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03511>
- Liem-Nguyen V, Skjellberg U, Björn E (2017) Thermodynamic Modeling of the Solubility and Chemical Speciation of Mercury and Methylmercury Driven by Organic Thiols and Micromolar Sulfide Concentrations in Boreal Wetland Soils. *Environ Sci Technol* 51:3678–3686. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04622>
- Lima AIG, Corticeiro SC, de Almeida Paula Figueira EM (2006) Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. *Enzyme and Microbial Technology* 39:763–769. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.009>
- Lin H, Ascher DB, Myung Y, et al (2021) Mercury methylation by metabolically versatile and cosmopolitan marine bacteria. *ISME J* 15:1810–1825. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00889-4>
- Lin H, Hurt RA, Johs A, et al (2014a) Unexpected Effects of Gene Deletion on Interactions of Mercury with the Methylation-Deficient Mutant  $\Delta$ hgcAB. *Environ Sci Technol Lett* 1:271–276. <https://doi.org/10.1021/ez500107r>
- Lin H, Lu X, Liang L, Gu B (2015a) Thiol-Facilitated Cell Export and Desorption of Methylmercury by Anaerobic Bacteria. *Environmental Science & Technology Letters* 2:292–296. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00209>
- Lin H, Lu X, Liang L, Gu B (2015b) Cysteine Inhibits Mercury Methylation by *Geobacter sulfurreducens* PCA Mutant  $\Delta$ omcBESTZ. *Environ Sci Technol Lett* 2:144–148. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00068>



- Lin H, Morrell-Falvey JL, Rao B, et al (2014b) Coupled Mercury–Cell Sorption, Reduction, and Oxidation on Methylmercury Production by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Environ Sci Technol* 48:11969–11976. <https://doi.org/10.1021/es502537a>
- Liu S, Wiatrowski HA (2018) Reduction of Hg(II) to Hg(0) by Biogenic Magnetite from two Magnetotactic Bacteria. *Geomicrobiology Journal* 35:198–208. <https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1362076>
- Liu Y-R, Lu X, Zhao L, et al (2016) Effects of Cellular Sorption on Mercury Bioavailability and Methylmercury Production by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132. *Environmental Science & Technology* 50:13335–13341. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04041>
- Loftin IR, Franke S, Roberts SA, et al (2005) A Novel Copper-Binding Fold for the Periplasmic Copper Resistance Protein CusF. *Biochemistry* 44:10533–10540. <https://doi.org/10.1021/bi050827b>
- Long F, Su C-C, Lei H-T, et al (2012) Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:1047–1058. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0203>
- Lu X, Johs A, Zhao L, et al (2018) Nanomolar Copper Enhances Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132. *Environmental Science & Technology Letters* 5:372–376. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00232>
- Lu X, Liu Y, Johs A, et al (2016) Anaerobic Mercury Methylation and Demethylation by *Geobacter bemidjensis* Bem. *Environmental Science & Technology* 50:4366–4373. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00401>
- Ludwig ML, Matthews RG (1997) Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 66:269–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.269>
- Ma M, Du H, Wang D (2019) Mercury methylation by anaerobic microorganisms: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 49:1893–1936. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1594517>
- Ma N, Sha Z, Sun C (2021) Formation of cadmium sulfide nanoparticles mediates cadmium resistance and light utilization of the deep-sea bacterium *Idiomarina* sp. OT37-5b. *Environmental Microbiology* 23:934–948. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15205>
- Marteyn B, Sakr S, Farci S, et al (2013) The *Synechocystis* PCC6803 MerA-Like Enzyme Operates in the Reduction of Both Mercury and Uranium under the Control of the Glutaredoxin 1 Enzyme. *Journal of Bacteriology* 195:4138–4145. <https://doi.org/10.1128/JB.00272-13>
- Matsumura K, Furukawa S, Ogihara H, Morinaga Y (2011) Roles of Multidrug Efflux Pumps on the Biofilm Formation of *Escherichia coli* K-12. *Biocontrol Science* 16:69–72. <https://doi.org/10.4265/bio.16.69>
- McDaniel EA, Peterson B, Stevens SLR, et al (2020) Expanded Phylogenetic Diversity and Metabolic Flexibility of Microbial Mercury Methylation. *bioRxiv* 2020.01.16.909358. <https://doi.org/10.1101/2020.01.16.909358>
- Mealman TD, Bagai I, Singh P, et al (2011) Interactions between CusF and CusB Identified by NMR Spectroscopy and Chemical Cross-Linking Coupled to Mass Spectrometry. *Biochemistry* 50:2559–2566. <https://doi.org/10.1021/bi102012j>

- Minagawa S, Inami H, Kato T, et al (2012) RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiology* 12:70. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-70>
- Monperrus M, Tessier E, Veschambre S, et al (2005) Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381:854–862. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2973-7>
- Morby AP, Turner JS, Huckle JW, Robinson NJ (1993) SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucleic Acids Res* 21:921–925. <https://doi.org/10.1093/nar/21.4.921>
- Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M (1998) The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:543–566
- Mukhopadhyay D, Yu HR, Nucifora G, Misra TK (1991) Purification and functional characterization of MerD. A coregulator of the mercury resistance operon in gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 266:18538–18542
- Muller M, Merrett ND (2014) Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Confers Resistance to Ionic Silver. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5492–5499. <https://doi.org/10.1128/AAC.03069-14>
- Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, et al (2006) Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443:173–179. <https://doi.org/10.1038/nature05076>
- Muresan B, Cossa D, Jézéquel D, et al (2007) The biogeochemistry of mercury at the sediment–water interface in the Thau lagoon. 1. Partition and speciation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 72:472–484. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.11.015>
- Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, et al (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial Biotechnology* 2:489–498. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00103.x>
- Naz N, Young HK, Ahmed N, Gadd GM (2005) Cadmium Accumulation and DNA Homology with Metal Resistance Genes in Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4610–4618. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4610-4618.2005>
- Ndu U, Barkay T, Mason RP, et al (2015) The Use of a Mercury Biosensor to Evaluate the Bioavailability of Mercury-Thiol Complexes and Mechanisms of Mercury Uptake in Bacteria. *PLOS ONE* 10:e0138333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138333>
- Ndu U, Barkay T, Schartup AT, et al (2016) The effect of aqueous speciation and cellular ligand binding on the biotransformation and bioavailability of methylmercury in mercury-resistant bacteria. *Biodegradation* 27:29–36. <https://doi.org/10.1007/s10532-015-9752-3>
- Nikaido H (2011) Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 77:1–60. <https://doi.org/10.1002/9780470920541.ch1>
- Nikaido H, Takatsuka Y (2009) Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta* 1794:769–781. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.004>



- Nixon BT, Ronson CW, Ausubel FM (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7850–7854
- Norambuena J, Miller M, Boyd JM, Barkay T (2020) Expression and regulation of the *mer* operon in *Thermus thermophilus*. *Environmental Microbiology* 22:1619–1634. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14953>
- Novick RP, Roth C (1968) Plasmid-linked Resistance to Inorganic Salts in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 95:1335–1342
- Nriagu J, Becker C (2003) Volcanic emissions of mercury to the atmosphere: global and regional inventories. *Sci Total Environ* 304:3–12. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00552-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00552-1)
- Nucifora G, Chu L, Silver S, Misra TK (1989) Mercury operon regulation by the *merR* gene of the organomercurial resistance system of plasmid pDU1358. *J Bacteriol* 171:4241–4247
- O'Brien (2015) The sociality of bioremediation. *EMBO reports* 16:1241–1245. <https://doi.org/10.15252/embr.201541064>
- Ogawa W, Minato Y, Dodan H, et al (2015) Characterization of MATE-Type Multidrug Efflux Pumps from *Klebsiella pneumoniae* MGH78578. *PLoS One* 10:e0121619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121619>
- Oremland RS, Culbertson CW, Winfrey MR (1991) Methylmercury Decomposition in Sediments and Bacterial Cultures: Involvement of Methanogens and Sulfate Reducers in Oxidative Demethylation. *Appl Environ Microbiol* 57:130–137
- Osborn AM, Bruce KD, Strike P, Ritchie DA (1997) Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiology Reviews* 19:239–262. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00300.x>
- Osman D, Cavet JS (2010) Bacterial metal-sensing proteins exemplified by *ArsR*–*SmtB* family repressors. *Nat Prod Rep* 27:668. <https://doi.org/10.1039/b906682a>
- Oswald CJ, Carey SK (2016) Total and methyl mercury concentrations in sediment and water of a constructed wetland in the Athabasca Oil Sands Region. *Environ Pollut* 213:628–637. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.002>
- Outridge PM, Mason RP, Wang F, et al (2018) Updated Global and Oceanic Mercury Budgets for the United Nations Global Mercury Assessment 2018. *Environ Sci Technol* 52:11466–11477. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01246>
- Overmann J, Fischer U, Pfennig N (2004) A new purple sulfur bacterium from saline littoral sediments, *Thiorhodovibrio winogradskyi* gen. nov. and sp. nov. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/BF00248677>
- Pagès J-M, Amaral L (2009) Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1794:826–833. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.011>

- Pagès J-M, Monlezun L, Broutin I, Davin-Regli A (2011) Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Francophone des Laboratoires* 2011:63–72. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)71103-0](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71103-0)
- Pan-Hou HSK, Imura N (1981) Role of hydrogen sulfide in mercury resistance determined by plasmid of *Clostridium cochlearium* T-2. *Arch Microbiol* 129:49–52. <https://doi.org/10.1007/BF00417179>
- Parales RE, Luu RA, Hughes JG, Ditty JL (2015) Bacterial chemotaxis to xenobiotic chemicals and naturally-occurring analogs. *Curr Opin Biotechnol* 33:318–326. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.017>
- Parkinson JS, Kofoid EC (1992) Communication Modules in Bacterial Signaling Proteins. *Annual Review of Genetics* 26:71–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.000443>
- Parks JM, Johs A, Podar M, et al (2013) The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. *Science* 339:1332–1335. <https://doi.org/10.1126/science.1230667>
- Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* 60:575–608
- Pederick VG, Eijkelkamp BA, Begg SL, et al (2015) ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 5:13139. <https://doi.org/10.1038/srep13139>
- Pedrero Z, Bridou R, Mounicou S, et al (2012) Transformation, Localization, and Biomolecular Binding of Hg Species at Subcellular Level in Methylating and Nonmethylating Sulfate-Reducing Bacteria. *Environmental Science & Technology* 46:11744–11751. <https://doi.org/10.1021/es302412q>
- Petit-Härtlein I, Rome K, de Rosny E, et al (2015) Biophysical and physiological characterization of ZraP from *Escherichia coli*, the periplasmic accessory protein of the atypical ZraSR two-component system. *Biochem J* 472:205–216. <https://doi.org/10.1042/BJ20150827>
- Pham AL-T, Morris A, Zhang T, et al (2014) Precipitation of nanoscale mercuric sulfides in the presence of natural organic matter: Structural properties, aggregation, and biotransformation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 133:204–215. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.02.027>
- Phillips ZEV, Strauch MA (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 59:392–402. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8431-9>
- Poole K (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 39:162–176. <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>
- Programme UNE (2013) *Global Mercury Assessment 2013: Sources, emissions, releases, and environmental transport*
- Qian C, Chen H, Johs A, et al (2018) Quantitative Proteomic Analysis of Biological Processes and Responses of the Bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 upon Deletion of Its Mercury Methylation Genes. *PROTEOMICS* 18:1700479. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700479>
- Qian C, Johs A, Chen H, et al (2016) Global Proteome Response to Deletion of Genes Related to Mercury Methylation and Dissimilatory Metal Reduction Reveals Changes in Respiratory Metabolism in

- Geobacter sulfurreducens* PCA. *Journal of Proteome Research* 15:3540–3549. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00263>
- Ranchou-Peyruse A, Moppert X, Hourcade E, et al (2004) Characterization of brackish anaerobic bacteria involved in hydrocarbon degradation: A combination of molecular and culture-based approaches. *Ophelia* 58:255–262. <https://doi.org/10.1080/00785236.2004.10410233>
- Ranchou-Peyruse M, Goñi-Urriza M, Guignard M, et al (2018) *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* sp. nov., a mercury-methylating bacterium isolated from a brackish sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:1461–1466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002173>
- Ranchou-Peyruse M, Monperrus M, Bridou R, et al (2009) Overview of Mercury Methylation Capacities among Anaerobic Bacteria Including Representatives of the Sulphate-Reducers: Implications for Environmental Studies. *Geomicrobiology Journal* 26:1–8. <https://doi.org/10.1080/01490450802599227>
- Regnell O, Watras CarlJ (2019) Microbial Mercury Methylation in Aquatic Environments: A Critical Review of Published Field and Laboratory Studies. *Environmental Science & Technology* 53:4–19. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02709>
- Rensing C, Grass G (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews* 27:197–213. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00049-4)
- Rice KM, Walker EM, Wu M, et al (2014) Environmental Mercury and Its Toxic Effects. *Journal of Preventive Medicine & Public Health* 47:74–83. <https://doi.org/10.3961/jpmph.2014.47.2.74>
- Rome K, Borde C, Taher R, et al (2018) The Two-Component System ZraPSR Is a Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 430:4971–4985. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021>
- Rousset M, Casalot L, Rapp-Giles BJ, et al (1998) New Shuttle Vectors for the Introduction of Cloned DNA in *Desulfovibrio*. *Plasmid* 39:114–122. <https://doi.org/10.1006/plas.1997.1321>
- Roy R, Samanta S, Patra S, et al (2018) *In silico* identification and characterization of sensory motifs in the transcriptional regulators of the ArsR-SmtB family. *Metallomics* 10:1476–1500. <https://doi.org/10.1039/C8MT00082D>
- Saha RP, Samanta S, Patra S, et al (2017) Metal homeostasis in bacteria: the role of ArsR–SmtB family of transcriptional repressors in combating varying metal concentrations in the environment. *Biometals* 30:459–503. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0020-3>
- Salah Ud-Din AIM, Roujeinikova A (2017) Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cell Mol Life Sci* 74:3293–3303. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2514-0>
- San Francisco MJ, Hope CL, Owolabi JB, et al (1990) Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Res* 18:619–624
- Schaefer JK, Letowski J, Barkay T (2002) mer -Mediated Resistance and Volatilization of Hg(II) Under Anaerobic Conditions. *Geomicrobiology Journal* 19:87–102. <https://doi.org/10.1080/014904502317246192>

- Schaefer JK, Morel FMM (2009) High methylation rates of mercury bound to cysteine by *Geobacter sulfurreducens*. *Nature Geoscience* 2:123–126. <https://doi.org/10.1038/ngeo412>
- Schaefer JK, Rocks SS, Zheng W, et al (2011) Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:8714–8719. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105781108>
- Schaefer JK, Szczuka A, Morel FMM (2014) Effect of Divalent Metals on Hg(II) Uptake and Methylation by Bacteria. *Environmental Science & Technology* 48:3007–3013. <https://doi.org/10.1021/es405215v>
- Schelert J, Dixit V, Hoang V, et al (2004) Occurrence and Characterization of Mercury Resistance in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* by Use of Gene Disruption. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.427-437.2004>
- Schelert J, Drozda M, Dixit V, et al (2006) Regulation of Mercury Resistance in the Crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00558-06>
- Schué M, Dover LG, Besra GurdyalS, et al (2009) Sequence and Analysis of a Plasmid-Encoded Mercury Resistance Operon from *Mycobacterium marinum* Identifies MerH, a New Mercuric Ion Transporter. *Journal of Bacteriology* 191:439–444. <https://doi.org/10.1128/JB.01063-08>
- Sennhauser G, Bukowska MA, Briand C, Grütter MG (2009) Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* 389:134–145. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.001>
- Sevcenco A-M, Pinkse MWH, Wolterbeek HT, et al (2011) Exploring the microbial metalloproteome using MIRAGE<sup>+</sup>. *Metallomics* 3:1324–1330. <https://doi.org/10.1039/c1mt00154j>
- Silva JC da, Pacureanu A, Yang Y, et al (2017) Efficient concentration of high-energy x-rays for diffraction-limited imaging resolution. *Optica, OPTICA* 4:492–495. <https://doi.org/10.1364/OPTICA.4.000492>
- Silver S (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene* 179:9–19. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00323-X)
- Silver S, Phung LT (2005) Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic. *Appl Environ Microbiol* 71:599–608. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.599-608.2005>
- Siripornadulsil S, Siripornadulsil W (2013) Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: Potential for microbial bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 94:94–103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.002>
- Slowey AJ (2010) Rate of formation and dissolution of mercury sulfide nanoparticles: The dual role of natural organic matter. <https://doi.org/10.1016/J.GCA.2010.05.012>
- Smith SD, Bridou R, Johs A, et al (2015) Site-Directed Mutagenesis of HgcA and HgcB Reveals Amino Acid Residues Important for Mercury Methylation. *Applied and Environmental Microbiology* 81:3205–3217. <https://doi.org/10.1128/AEM.00217-15>
- Smith T, Pitts K, McGarvey JA, Summers AO (1998) Bacterial Oxidation of Mercury Metal Vapor, Hg(0). *Appl Environ Microbiol* 64:1328–1332. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.4.1328-1332.1998>

- Solé VA, Papillon E, Cotte M, et al (2007) A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim Acta B* 63–68
- Sone Y, Pan-Hou H, Nakamura R, et al (2010) Roles Played by MerE and MerT in the Transport of Inorganic and Organic Mercury Compounds in Gram-negative Bacteria. *Journal of Health Science* 56:123–127. <https://doi.org/10.1248/jhs.56.123>
- Song Y, Adediran GA, Jiang T, et al (2020) Toward an Internally Consistent Model for Hg(II) Chemical Speciation Calculations in Bacterium–Natural Organic Matter–Low Molecular Mass Thiol Systems. *Environ Sci Technol* 54:8094–8103. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01751>
- Soto SM (2013) Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 4:223–229. <https://doi.org/10.4161/viru.23724>
- Stanisich VA, Bennett PM, Richmond MH (1977) Characterization of a translocation unit encoding resistance to mercuric ions that occurs on a nonconjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 129:1227–1233
- Steele RA (1996) Structure determination of a mercury binding protein, MerP. Dissertations available from ProQuest 1–81
- Stock A, Robinson V, Goudreau P (1999) Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* 69:183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Stout V, Gottesman S (1990) RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172:659–669
- Streets DG, Devane MK, Lu Z, et al (2011) ALL-TIME RELEASES OF MERCURY TO THE ATMOSPHERE FROM HUMAN ACTIVITIES. *Environ Sci Technol* 45:10485–10491. <https://doi.org/10.1021/es202765m>
- Streets DG, Horowitz HM, Jacob DJ, et al (2017) Total Mercury Released to the Environment by Human Activities. *Environ Sci Technol* 51:5969–5977. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00451>
- Su C-C, Li M, Gu R, et al (2006) Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *J Bacteriol* 188:7290–7296. <https://doi.org/10.1128/JB.00684-06>
- Summers AO, Silver S (1972) Mercury Resistance in a Plasmid-Bearing Strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 112:1228–1236
- Sun J, Deng Z, Yan A (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453:254–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
- Taher R, de Rosny E (2021) A structure-function study of ZraP and ZraS provides new insights into the two-component system Zra. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865:129810. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129810>
- Tamura N, Murakami S, Oyama Y, et al (2005) Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking. *Biochemistry* 44:11115–11121. <https://doi.org/10.1021/bi050452u>

- Taylor DL, Bina XR, Bina JE (2012) *Vibrio cholerae* VexH encodes a multiple drug efflux pump that contributes to the production of cholera toxin and the toxin co-regulated pilus. *PLoS One* 7:e38208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038208>
- Teitzel GM, Geddie A, De Long SK, et al (2006) Survival and Growth in the Presence of Elevated Copper: Transcriptional Profiling of Copper-Stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:7242–7256. <https://doi.org/10.1128/JB.00837-06>
- Thomas SA, Catty P, Hazemann J-L, et al (2019) The role of cysteine and sulfide in the interplay between microbial Hg(II) uptake and sulfur metabolism. *Metallomics* 11:1219–1229. <https://doi.org/10.1039/c9mt00077a>
- Thomas SA, Gaillard J-F (2017) Cysteine Addition Promotes Sulfide Production and 4-Fold Hg(II)–S Coordination in Actively Metabolizing *Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology* 51:4642–4651. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06400>
- Thomas SA, Mishra B, Myneni SCB (2020) Cellular Mercury Coordination Environment, and Not Cell Surface Ligands, Influence Bacterial Methylmercury Production. *Environmental Science & Technology* 54:3960–3968. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05915>
- Thomas SA, Rodby KE, Roth EW, et al (2018) Spectroscopic and Microscopic Evidence of Biomediated HgS Species Formation from Hg(II)–Cysteine Complexes: Implications for Hg(II) Bioavailability. *Environmental Science & Technology* 52:10030–10039. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01305>
- Tian L, Guan W, Ji Y, et al (2021) Microbial methylation potential of mercury sulfide particles dictated by surface structure. *Nat Geosci* 14:409–416. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00735-y>
- Tottey S, Harvie DR, Robinson NJ (2005) Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones. *Acc Chem Res* 38:775–783. <https://doi.org/10.1021/ar0300118>
- Trüper HG, Pfennig N (1992) The Family Chlorobiaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, et al. (eds) *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer, New York, NY, pp 3583–3592
- van der Weel L, As KS, Dekker WJC, et al (2019) ZraP, the most prominent zinc protein under zinc stress conditions has no direct role in in-vivo zinc tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Inorganic Biochemistry* 192:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.12.013>
- Vigneron A, Cruaud P, Aubé J, et al (2021) Transcriptomic evidence for versatile metabolic activities of mercury cycling microorganisms in brackish microbial mats. *NPJ Biofilms Microbiomes* 7:83. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00255-y>
- Villar E, Cabrol L, Heimbürger-Boavida L (2020) Widespread microbial mercury methylation genes in the global ocean. *Environmental Microbiology Reports* 12:277–287. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12829>
- von Rozycki T, Nies DH (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96:115–139. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9284-5>
- Weimer PJ, Van Kavelaar MJ, Michel CB, Ng TK (1988) Effect of Phosphate on the Corrosion of Carbon Steel and on the Composition of Corrosion Products in Two-Stage Continuous Cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* 54:386–396



- West J, Graham AM, Liem-Nguyen V, Jonsson S (2020) Dimethylmercury Degradation by Dissolved Sulfide and Mackinawite. *Environ Sci Technol* 54:13731–13738. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04134>
- Wiatrowski HA, Ward PM, Barkay T (2006) Novel Reduction of Mercury(II) by Mercury-Sensitive Dissimilatory Metal Reducing Bacteria. *Environ Sci Technol* 40:6690–6696. <https://doi.org/10.1021/es061046g>
- Widdel F, Bak F (1992) Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, et al. (eds) *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp 3352–3378
- Wilson JR, Leang C, Morby AP, et al (2000) MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? *FEBS Lett* 472:78–82. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01430-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01430-7)
- Xu Y, Lee M, Moeller A, et al (2011) Funnel-like hexameric assembly of the periplasmic adapter protein in the tripartite multidrug efflux pump in gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 286:17910–17920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238535>
- Yamamoto K, Hirao K, Oshima T, et al (2005) Functional Characterization in Vitro of All Two-component Signal Transduction Systems from *Escherichia coli*\*. *Journal of Biological Chemistry* 280:1448–1456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410104200>
- Yamamoto K, Ogasawara H, Ishihama A (2008) Involvement of multiple transcription factors for metal-induced spy gene expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 133:196–200. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.002>
- Yang J, Rawat S, Stemmler TL, Rosen BP (2010) Arsenic Binding and Transfer by the ArsD As(III) Metallochaperone. *Biochemistry* 49:3658–3666. <https://doi.org/10.1021/bi100026a>
- Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y, et al (2011) Detoxification of Methylmercury by Hydrogen Sulfide-Producing Enzyme in Mammalian Cells. *Chem Res Toxicol* 24:1633–1635. <https://doi.org/10.1021/tx200394g>
- You C, Zhang X-Z, Zhang Y-HP (2012) Simple Cloning via Direct Transformation of PCR Product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1593–1595. <https://doi.org/10.1128/AEM.07105-11>
- Yu R-Q, Reinfelder JR, Hines ME, Barkay T (2013) Mercury Methylation by the Methanogen *Methanospirillum hungatei*. *Applied and Environmental Microbiology* 79:6325–6330. <https://doi.org/10.1128/AEM.01556-13>
- Yu R-Q, Reinfelder JR, Hines ME, Barkay T (2018) Syntrophic pathways for microbial mercury methylation. *The ISME Journal* 12:1826–1835. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0106-0>
- Zahid N, Zulfiqar S, Shakoori AR (2012) Functional analysis of cus operon promoter of *Klebsiella pneumoniae* using *E. coli lacZ* assay. *Gene* 495:81–88. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.12.040>
- Zgurskaya HI, Krishnamoorthy G, Ntrel A, Lu S (2011) Mechanism and Function of the Outer Membrane Channel TolC in Multidrug Resistance and Physiology of Enterobacteria. *Front Microbiol* 2:189. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00189>

- Zhang T, Kim B, Levard C, et al (2012) Methylation of Mercury by Bacteria Exposed to Dissolved, Nanoparticulate, and Microparticulate Mercuric Sulfides. *Environmental Science & Technology* 46:6950–6958. <https://doi.org/10.1021/es203181m>
- Zhao C, Zhang Y, Chan Z, et al (2015) Insights into arsenic multi-operons expression and resistance mechanisms in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. *Front Microbiol* 6:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00986>
- Zhou J (2017) Understanding Mercury Transport and Transformation by Computational Simulations. 172 (thèse)
- Zhou J, Riccardi D, Beste A, et al (2014) Mercury Methylation by HgcA: Theory Supports Carbanion Transfer to Hg(II). *Inorg Chem* 53:772–777. <https://doi.org/10.1021/ic401992y>







# École doctorale des Sciences exactes et de leurs applications

## Institut des Sciences Analytiques et Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux

### Résumé

Le mercure (Hg) est un polluant persistant à l'origine de problèmes environnementaux et sanitaires. La transformation du Hg(II) en méthylmercure (MeHg), hautement toxique, est réalisée par certains microorganismes anaérobies capables de produire les protéines HgcA et HgcB. L'impact des conditions environnementales sur la production de MeHg par les microorganismes méthylants a été décrit. Cependant, les déterminismes génétiques dont l'expression est induite pour répondre au Hg restent peu connus. Ce travail vise ainsi à identifier des déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au Hg et sa méthylation chez la bactérie sulfato réductrice méthylante modèle *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* souche BerOc1. Pour cela, des souches mutantes de délétion ciblant certains gènes ont été générées. Les gènes ciblés ont été sélectionnés à partir de précédentes études sur l'organisation génomique des genres *Desulfovibrio* et *Pseudodesulfovibrio* et, de transcriptomique différentielle sur la souche BerOc1 menée avec ou sans Hg. Au préalable, une étude physiologique de la souche BerOc1 a été nécessaire pour optimiser un protocole de génération de souches mutantes. De plus, l'étude sur la méthylation du Hg(II) a permis de déterminer l'importance de la concentration en sulfures sur la production et l'export du MeHg chez la souche BerOc1. Néanmoins, les potentiels de méthylation mesurés sous différentes concentrations de Hg(II) et de sulfures n'ont pas été corrélés à l'induction de l'expression d'*hgcA*. La deuxième partie de ce travail s'est focalisée sur la protéine ArsR, un putatif régulateur transcriptionnel codé par le gène retrouvé en amont d'*hgcAhgcB*. Elle a été menée grâce à une souche délétée d'*arsR* surexprimant de plus *hgcA*. A partir de 0.5  $\mu\text{M}$  de Hg(II), les taux de méthylation supérieurs mesurés chez cette souche comparée à la souche sauvage suggèrent que ce mécanisme est limité par la production d'HgcA. En revanche, (i) les taux de déméthylation mesurés supérieurs à ceux de la souche sauvage quelle que soit la concentration en MeHg ajoutée, (ii) l'absence de saturation des taux de déméthylation et, (iii) l'absence de sensibilité au MeHg chez la souche mutante suggèrent un rôle d'ArsR ou d'HgcA dans la déméthylation du MeHg. Il s'agit d'un phénotype inattendu soulevant des questions sur le lien entre la méthylation, la déméthylation et la résistance au MeHg. Cette étude a de plus démontré pour la première fois que l'expression du cluster *arsRhgcAhgcB* confère à lui seul la capacité à méthyler le Hg(II), lors de son expression hétérologue chez la bactérie non méthylante *D. alaskensis* G20 et, souligne qu'au-delà de la transformation du Hg, ce cluster joue un rôle dans la physiologie cellulaire, notamment sur la motilité. La dernière partie de ce travail a ciblé le cluster de gènes 470-467, dont la majorité est surexprimée en présence de Hg(II). Le mutant délété de ce cluster a montré à partir de 0.5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) un seuil d'accumulation du Hg(II) au niveau intracellulaire. Les résultats ont aussi révélé (i) une sensibilité au Hg(II) accrue, (ii) une localisation du Hg au sein de la cellule plus diffuse et, (iii) des taux de méthylation saturant chez la souche mutante comparée à la sauvage. L'homologie de la séquence protéique d'un des gènes délétés avec une protéine impliquée dans la séquestration périplasmique des métaux suggère un rôle de séquestration du Hg dans la capacité à résister au Hg(II) chez les bactéries méthylantes et révèle le premier mécanisme de résistance au Hg(II) chez une bactérie anaérobie. L'ensemble de ces travaux a ainsi identifié deux déterminismes génétiques impliqués dans la réponse au Hg et sa méthylation mais aussi, que 0.5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) est une concentration seuil conduisant à déclencher la réponse de la souche BerOc1 pour faire face au Hg. Globalement, ces travaux permettent de progresser dans la compréhension du mécanisme de méthylation du Hg, cruciale pour mesurer les risques liés au Hg dans l'environnement.

### Abstract

Mercury (Hg) is a persistent pollutant leading to environmental and health issues. The transformation of Hg(II) into the highly toxic methylmercury (MeHg) is carried out by some anaerobic microorganisms producing HgcA and HgcB proteins. The impact of environmental conditions on methylmercury production by methylating microorganisms has been described. However, genetic determinisms whose expression is induced for the microbial Hg response are almost unknown. This work aims to identify genetic determinisms involved in the Hg response and methylation in the model sulfate-reducing methylating bacterium *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* strain BerOc1. For this purpose, gene-deleted mutant strains were generated. The targeted genes were selected from previous studies of genome organization analyses of *Desulfovibrio* and *Pseudodesulfovibrio* genus, and differential transcriptomics of *P. hydrargyri* BerOc1 growing with or without Hg(II). First, the required physiological characterization of the BerOc1 strain to set up a protocol in order to generate mutant strains was performed. In addition to the protocol set up, study on Hg(II) methylation showed the key role of sulfide concentration on MeHg production and export in *P. hydrargyri* BerOc1. However, Hg(II) methylation potentials measured under different Hg(II) and sulfide concentrations were not related to the *hgcA* gene expression induction. The second part of the work targeted *P. hydrargyri* BerOc1 ArsR protein, a putative transcriptional regulator encoded by an *arsR* gene found upstream *hgcAhgcB* genes, and was carried out using a strain deleted for *arsR* gene and overexpressing the *hgcA* gene. The higher methylation rates measured from 0.5  $\mu\text{M}$  of Hg(II) in the mutant compared to the wild type strain strongly suggested that the methylation mechanism was limited by production of the HgcA protein. In contrast, (i) the increase of the demethylation rates regardless of the MeHg concentrations added, (ii) the lack of saturation of the demethylation rates and, (iii) the lack of sensitivity to MeHg (up to 4.7  $\mu\text{M}$ ) of the mutant strain suggested a role of the ArsR protein or the HgcA protein in MeHg demethylation reaction. These unexpected phenotypes inquire as to whether there is a link between methylation, demethylation and methylmercury resistance. This work also demonstrated for the first time, that the heterologous expression of solely *arsRhgcAhgcB* in the non methylating bacterium *Desulfovibrio alaskensis* G20 conferred the ability to methylate mercury. Furthermore, beyond the mechanisms of mercury transformation, this work underlined the role of the *arsRhgcAhgcB* gene cluster in cell physiology, particularly in cell motility. Finally, the last part of this work focused on the 470-467 gene cluster, mostly overexpressed in the presence of Hg(II). The mutant deleted of this gene cluster showed, from 0.5  $\mu\text{M}$  of Hg(II), the inability to accumulate Hg(II) at the intracellular level. Moreover, (i) the sensitivity to Hg(II) was increased, (ii) the localization of Hg within the cell was largely diffuse and, (iii) the methylation rates saturated in the mutant compared to the wild type strain. The amino acid sequence homology of one of the deleted genes to a protein involved in periplasmic metal sequestration strongly suggests a relationship between Hg(II) sequestration and the capacity of methylating bacteria to resist Hg and reveals the first mechanism of resistance to Hg(II) in an anaerobic bacterium. These results established two genetic determinisms involved in the cellular response to Hg and its methylation and, that 0.5  $\mu\text{M}$  Hg(II) is the threshold concentration driving the response of *P. hydrargyri* BerOc1 to cope with Hg. Overall, this work is a compilation of data dedicated to the progress of our understanding of Hg methylation mechanisms in Hg methylating microorganisms, crucial for risk assessments of mercury in the environment.