



Université d'Aix-Marseille
Faculté des Sciences de Luminy

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de la Méditerranée
-Microbiologie Moléculaire, Biologie végétale et Biotechnologies-

Audrey GERSTEL

Stress oxydant chez *E. coli* :
Maturation du régulateur transcriptionnel SoxR
Effet du dioxyde de carbone sur le stress au peroxyde d'hydrogène

Jury

Dr William Nasser
Dr Sandrine Ollagnier de Choudens
Dr Bertrand Daignan Fornier
Dr Ivan Matic
Pr Frédéric Barras
Dr Béatrice Py

Rapporteur
Rapportrice
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse et chef de laboratoire Frédéric Barras, pour sa bonne humeur et son humour qui ont accompagnés mes années de thèse.

Je remercie tout particulièrement Béatrice Py, qui a encadré mon travail de recherche, mes présentations orales et la rédaction de mon manuscrit. Je n'aurais pas pu rêver meilleure encadrante : douce, compréhensive et toujours disponible.

Je remercie l'ensemble de « l'équipe Barras » qui m'a accueilli et mise à l'aise dès mes premiers pas dans le laboratoire. Laurent L., Allison, Béa. R, Ben, Laurent. A, Camille, Jordi, merci d'avoir été disponible pour répondre à mes questions et partager avec moi vos expériences et votre savoir faire. C'est avec grand plaisir que je suis venue travailler parmi vous.

Je tiens à écrire quelques mots pour certains membres de l'équipe que je considère aujourd'hui comme des amis : Yohann et Pierre, deux perles, avec qui j'ai partagé paillasse et bureau tout au long de ma thèse. Marion, « mon p'tit » et Sylvia, « yaya », mes super copines. Yohann, Pierre, Marion et Sylvia j'ai adoré partager tous ces fous rires, délires, chansons, cafés, mots croisés, ragots et soirées avec vous. Yohann merci également pour toute l'aide que tu m'as apportée à mon travail de thèse.

Je remercie aussi Maia d'avoir partagé avec enthousiasme mon master 2 et ma première année de thèse et je remercie ma marraine de thèse Anne Galinier de m'avoir aidé dans mes choix et mes démarches.

Je remercie aussi ma jolie famille recomposée, Yves, Maman, Julien « mon Toune », Aurélie « Ratus », Julie « Dédé », Caroline de me voir avant tout en tant que « petite biloute » quoi que je fasse et peu importe mes choix de carrière.

Je remercie Marie et Papa pour tous les bons moments partagés à l'île de la Réunion.

Merci à mon groupe d'amis les Nawaks pour le bonheur qu'ils m'apportent depuis plus d'une dizaine d'années : Thomas, Amandine, Loriane, Manon, Alexis, Fabien, Gaëlle, Cécile, Matthieu R., Florent, Laura et Julien. Je sais que je pourrais toujours compter sur vous et que vous faites partie des bases solides de ma vie.

Merci à mes amis plus récents Elie, Patrick, Lisa, Hadrien, Elsa, Thomas et Emilie pour les moments agréables passés ensemble en espérant qu'ils se multiplient à l'avenir.

Merci également à Lulu et Sophie de suivre toutes mes aventures au quotidien.

J'ai une pensée pour ma famille de l'île de la Réunion que j'adore et qui représente mes racines.

Je remercie de tout mon cœur mes beaux parents Charly et Nathalie pour l'accueil à bras ouverts qu'ils m'ont fait quand je suis arrivée dans la famille. Merci pour votre gentillesse rare et votre amour au quotidien. C'est toujours un grand plaisir de vous voir.

De toute évidence je remercie mon amoureux Matthieu de partager sa vie avec moi. Je te remercie d'avoir remplacé toutes les questions qui se bousculaient dans ma tête par une sérénité et de beaux projets d'avenir.

Pour finir je dédie cette thèse à Papa et Maman qui m'ont donné des ailes grâce à leur amour inconditionnel. Papa et maman, je vous aime...

fluctuat nec mergitur

SOMMAIRE

Avant-propos	1
Introduction bibliographique	3
Le stress oxydant	4
I. Les formes réactives de l'oxygène	5
I. 1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	5
I. 2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	6
I. 3. Le radical hydroxyle (HO^{\cdot})	6
I. 4. Le monoxyde d'azote (NO)	7
II. Sources des formes réactives de l'oxygène et du NO	8
II. 1. Sources intracellulaires de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène	8
II. 2. Sources extracellulaires de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène	9
II. 3. Source de NO	12
III. Cibles du superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyle	13
III. 1. Les protéines	13
III. 2. Les lipides	16
III. 3. L'ADN	16
IV. Cibles du NO	17
V. Moyens de défense contre le stress oxydant	18
V. 1. Élimination des formes réactives de l'oxygène	18
V. 2. Contrôle du niveau de fer intracellulaire	20
V. 3. Contrôle du niveau de manganèse intracellulaire	20
V. 4. Efflux des composés redox actifs	21
V. 5. Réparation des dommages causés par les formes réactives de l'oxygène	21
VI. Régulateurs du stress oxydant	24
VI. 1. OxyR	24
VI. 2. SoxR	24
VI. 3. FuR	25

La biogenèse des protéines à centres FeS chez <i>E. coli</i>	27
I. Le système ISC	30
I. 1. La cystéine désulfurase IscS	30
I. 2. La protéine d'échafaudage IscU	30
I. 3. Le système co-chaperonne/chaperonne HscB/HscA	31
I. 4. La ferredoxine Fdx	31
I. 5. La protéine de transport IscA	32
I. 6. La protéine CyaY	32
I. 7. La protéine IscX	33
II. Le système SUF	34
II. 1. Le complexe cystéine désulfurase SufSE	34
II. 2. Le complexe d'échafaudage SufBCD	34
II. 3. La protéine de transport SufA	35
III. Autres protéines de transport des centres FeS	35
III. 1. ErpA, une troisième ATC	35
III. 2. NfuA, une ATC atypique	35
IV. Régulation des systèmes ISC et SUF	36
V. La biogenèse des protéines à centre FeS en conditions de stress	37
Les régulateurs transcriptionnels à centre FeS chez <i>E. coli</i>	39
I. FNR	40
I. 1. La protéine FNR : ses caractéristiques et son mécanisme de régulation	40
I. 3. Le régulon FNR	42
I. 4. Maturation de la protéine FNR	43
II. IscR	45
II. 1. La protéine IscR : ses caractéristiques et son mécanisme de régulation	45
II. 2. Le régulon IscR	47
II. 3. Maturation de la protéine IscR	47
III. NsrR	49
III. 1. La protéine NsrR : ses caractéristiques et son mécanisme de régulation	49
III. 2. Le régulon NsrR	50
III. 3. Maturation de la protéine NsrR	51

IV. SoxR	52
IV. 1. La protéine SoxR : ses caractéristiques et son mécanisme de régulation	52
IV. 2. Les systèmes de réduction de SoxR	54
IV. 3. Les activateurs de SoxR	55
IV. 4. Conservation du régulon SoxRS dans le monde vivant	58
IV. 5. Différence d'activation de SoxR dans le monde vivant	59
IV. 6. Activation de SoxR et résistance aux antibiotiques	60
Résultats	62
Partie I : Etude de la maturation du régulateur transcriptionnel à centre FeS SoxR	63
I. Contribution des machineries ISC et SUF à la résistance au stress superoxyde en aérobie	64
I.1. Les machineries ISC et SUF permettent à <i>E. coli</i> de résister au stress superoxyde	64
I.2. L'expression des opérons <i>isc</i> et <i>suf</i> est induite en présence de PMS	66
II. Biogénèse de SoxR en aérobie	68
II.1. Stratégie utilisée pour mesurer l'activité de SoxR	68
II.2. Contribution de la machinerie SUF à la maturation de SoxR	69
II.3. Contribution de la machinerie ISC à la maturation de SoxR	71
II.4. Contribution NfuA et YggX dans la maturation de SoxR	73
III. Réduction de SoxR en aérobie	73
III.1. Contribution des machineries ISC et SUF à la réduction de SoxR	74
III.2. Contribution NfuA et YggX à la réduction de SoxR	75
III. Contribution des machineries ISC et SUF à la résistance au stress PMS en anaérobie	76
III.1. Expression des opérons <i>isc</i> et <i>suf</i> en présence de PMS en anaérobie	76
III.2. En anaérobie la machinerie SUF est importante pour résister au PMS	77
IV. Biogénèse de SoxR en anaérobie	77
IV.1. Contribution de la machinerie SUF	77
IV.2. Contribution de la machinerie ISC	78
V. Impact de la maturation de SoxR sur la résistance aux antibiotiques en aérobie	79
V.1. Impact de la maturation de SoxR sur la résistance aux antibiotiques en milieu liquide	79
V. 2. Impact de la maturation de SoxR sur la résistance aux antibiotiques en milieu solide	82

Discussion et perspectives	84
Partie II : Effet du CO₂ sur le stress au H₂O₂	94
Introduction	95
I. Les deux modes d'action du peroxyde d'hydrogène	96
II. Le dioxyde de carbone, nouvel acteur du stress oxydatif	97
III. Un modèle d'équations différentielles pour mesurer la concentration en ROS chez <i>E. coli</i>	98
Résultats	99
I. La limitation en fer est nécessaire pour obtenir un profil d'oxydation de l'ADN de type mode 1	100
II. Importance de la densité cellulaire sur le mode 1	101
II. 1. Une forte densité cellulaire augmente l'élimination du H ₂ O ₂ ajouté dans le milieu de culture	101
II. 2. Une forte densité cellulaire supprime la sensibilité <i>via</i> le mode 1	101
III. Impact du CO₂ sur la létalité mode 1 dépendante	103
III. 1. Le CO ₂ est responsable de la disparition du mode 1 aux fortes concentrations en bactéries	103
III. 2. Une forte concentration en CO ₂ atténue la sensibilité <i>via</i> le mode 1	103
IV. Impact du CO₂ sur les dommages à l'ADN lors du mode 1	104
IV. 1. Le CO ₂ diminue l'oxydation du p-NDA lors de la réaction de Fenton	104
IV. 2. Le CO ₂ diminue le taux de mutagenèse en présence de H ₂ O ₂	105
Discussion	106
Matériels et Méthodes	112
Annexes	125
Références bibliographiques	126

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATC : transporteur de type A

Centre FeS : centre Fe-soufre

CO₂ : dioxyde de carbone

CMI : concentration minimale inhibitrice

DIP : 2-2' dipyridyl

DO_{600nm} : densité optique à 600 nm

E. coli : *Escherichia coli*

FAD/FADH₂ : flavine adénine dinucléotide

FMN : flavine mononucléotide

H₂O : eau

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

kDa : kilodalton

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADP⁺/NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO : monoxyde d'azote

O₂ : oxygène

O₂^{•-} : superoxyde

OH[•] : radical hydroxyle

PMS : phénazine méthosulfate

Ppm : parties pour million

ROS : formes réactives de l'oxygène

SOD : superoxyde dismutase

Avant propos

La vie a initialement évolué dans un environnement dépourvu d'oxygène et riche en fer, sous une forme ferreuse Fe^{2+} , et de soufre, sous une forme sulfide S^{2-} . Par conséquent, les centres FeS ont été recrutés très tôt durant l'évolution par les systèmes enzymatiques émergents. Le développement des organismes photosynthétiques, il y a trois milliards d'années, a provoqué l'apparition d'une atmosphère aérobie, ce qui a rendu difficile le maintien d'une biologie en partie basée sur les centres FeS. En effet, les centres FeS sont les cibles des formes réactives de l'oxygène, et le fer sous forme ferreux peut agir comme catalyseur de la production de formes réactives de l'oxygène. Dans ce contexte, les organismes vivants ont mis au point des mécanismes pour continuer à utiliser les centres FeS, comme le développement de systèmes multiprotéiques dédiés à leur biogenèse et l'enfouissement des centres FeS au sein des protéines pour leur protection face aux formes réactives de l'oxygène. Plusieurs régulateurs transcriptionnels ont évolué pour, au contraire, tirer profit et exploiter la réactivité chimique des centres FeS en les utilisant pour percevoir des signaux. Ces régulateurs transcriptionnels perçoivent les changements environnementaux, grâce au centre FeS qu'ils contiennent et coordonnent l'expression des gènes permettant de s'adapter à ces changements environnementaux.

Ces dernières années, de nombreux progrès ont été faits dans la compréhension des mécanismes par lesquels les centres FeS permettent aux régulateurs transcriptionnels de reprogrammer l'expression des gènes en réponse à des stimuli environnementaux. *E. coli*, possède quatre régulateurs transcriptionnels à centre FeS : FNR, IscR, NsrR et SoxR. Les régulateurs FNR, IscR et NsrR utilisent le centre FeS comme senseur du niveau intracellulaire en oxygène, en monoxyde d'azote ou en centres FeS. Par conséquent, les systèmes permettant l'assemblage des centres FeS sont d'une importance majeure pour la fonctionnalité de ces régulateurs.

SoxR est un régulateur transcriptionnel qui permet à la cellule de sentir les composés redox actifs, molécules provoquant la production de superoxyde dans la cellule et le déséquilibre de l'état d'oxydoréduction. SoxR régule l'expression du gène *soxS*, un second régulateur transcriptionnel qui contrôle l'expression d'une centaine de gènes. Parmi les membres du régulon SoxRS certains codent pour des protéines qui suppriment la toxicité du superoxyde ou qui contrôlent l'entrée ou la sortie d'antibiotiques dont les composés redox actifs.

Plusieurs études récentes ont notamment mis en évidence que l'activation du régulon SoxRS augmente la résistance aux antibiotiques. La particularité de SoxR, par rapport aux trois autres régulateurs transcriptionnels à centre FeS d'*E. coli*, réside dans le fait que SoxR n'utilise pas la présence ou l'absence de son centre FeS pour moduler l'expression des gènes. En effet, l'activation de SoxR est provoquée par un changement de l'état redox de son centre [2Fe-2S]. Ainsi, la réponse rapide et efficace de SoxR nécessite le maintien du centre [2Fe-2S] au sein de la protéine, même dans des conditions de stress oxydant, connues pour déstabiliser les centres FeS.

Ce manuscrit contient une introduction bibliographique divisée en trois grandes parties. La première partie concerne le stress oxydant et les moyens de la cellule pour s'en protéger. La deuxième partie décrit la biogenèse des protéines à centre FeS chez *E. coli*. Et la troisième partie porte sur les régulateurs transcriptionnels à centre FeS d'*E. coli*.

Mes résultats de thèse sont décrits en deux parties. La première partie porte sur les résultats obtenus au cours des deux dernières années au sein de l'équipe de Frédéric Barras, sur la maturation du régulateur transcriptionnel SoxR. La deuxième partie porte sur les résultats obtenus au cours de ma première année de thèse au sein de l'équipe de Sam Dukan, sur l'impact du dioxyde de carbone sur le stress au peroxyde d'hydrogène.

Introduction Bibliographique

Le stress oxydant

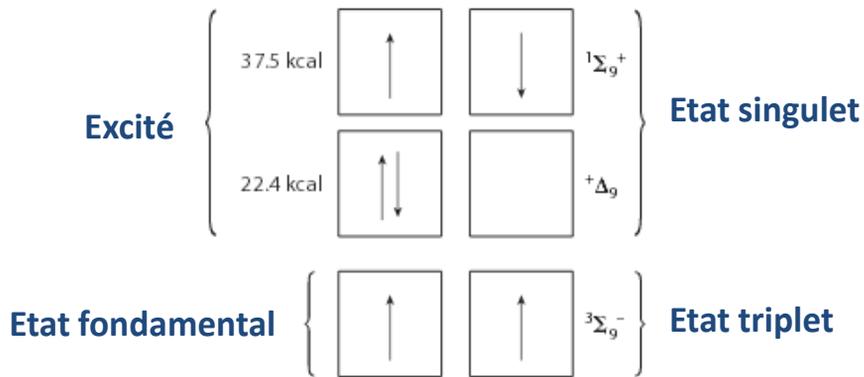


Figure 1 : Configuration électronique et différents niveaux d'énergie de la molécule d'oxygène.

La molécule d'oxygène possède six électrons sur la deuxième couche électronique et deux électrons non appariés dans le premier niveau énergétique. Les deux électrons non appariés s'orientent dans une même direction. L'oxygène a tendance à faire deux liaisons covalentes comme par exemple dans la molécule d'eau ou à capter deux électrons (d'après une revue de Fridovich, 2013).

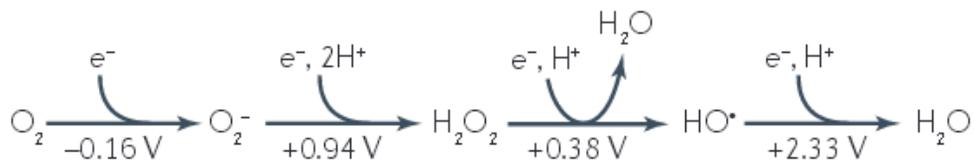
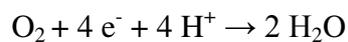


Figure 2 : Les différents états redox de l'oxygène et sa réduction en molécule d'eau.

La réduction totale de l'oxygène nécessite quatre électrons et aboutit à la formation de deux molécules d'eau. O_2 : oxygène ; O_2^- : superoxyde ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; HO^\bullet : radical hydroxyle (d'après une revue d'Imlay, 2013).

I. Les formes réactives de l'oxygène

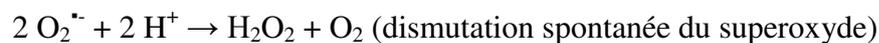
L'oxygène, de part sa configuration électronique, est une molécule très peu réactive vis-à-vis des molécules organiques. En effet, l'oxygène possède un nombre pair d'électrons et présente deux électrons non appariés dits célibataires au niveau de ses orbitales moléculaires. Par conséquent, l'oxygène a tendance à faire deux liaisons covalentes ou à capter deux électrons (Figure 1). L'oxygène peut être « activé » par des étapes de réductions mono-électroniques successives pour aboutir à la formation du superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle (HO^{\cdot}). La réduction totale de l'oxygène nécessite quatre électrons et aboutit à l'obtention de deux molécules d'eau (Figure 2).



Les formes réactives de l'oxygène forment une famille d'entités chimiques oxygénées qui regroupent non seulement les dérivés non radicalaires (sans électrons célibataires) et aussi les radicaux libres (possédant un électron célibataire non apparié). Parmi les dérivés non radicalaires, sont retrouvés l'anion peroxyde (O_2^{2-}), le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$). Les radicaux libres sont l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). Par la suite, nous nous intéressons uniquement à l'anion superoxyde, au peroxyde d'hydrogène, au radical hydroxyle et au monoxyde d'azote.

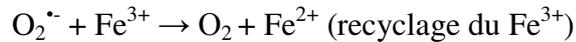
I.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

Le superoxyde est formé suite au transfert d'un électron à la molécule d'oxygène. Le superoxyde est instable en solution et se dismute spontanément en peroxyde d'hydrogène et oxygène lors du rapprochement et du transfert d'électrons entre deux anions superoxyde. La dismutation définit une réaction qui convertit deux molécules identiques en deux produits distincts.



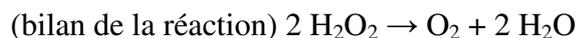
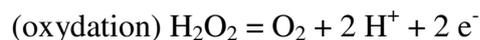
Cependant, à pH 7 la charge du superoxyde provoque une répulsion électrostatique empêchant ce rapprochement. Ainsi la dismutation spontanée du superoxyde est rare dans la cellule. L'intervention d'enzymes spécifiques appelées superoxydes dismutases est nécessaire pour éliminer le superoxyde (voir plus loin).

Le superoxyde peut agir comme un oxydant ou comme un réducteur. La toxicité du superoxyde peut être directe ou indirecte en réduisant le Fe^{3+} en Fe^{2+} qui va alimenter la réaction de Fenton générant du radical hydroxyle (voir plus loin).

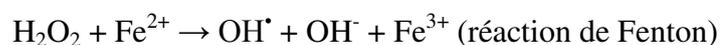


I. 2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène est formé par réduction de l'oxygène ou par dismutation de l'anion superoxyde. La réaction entre sa forme oxydante et sa forme réductrice produit sa dismutation en deux étapes d'oxydoréduction. Les produits de la réaction sont deux molécules d'eau et une molécule d'oxygène.

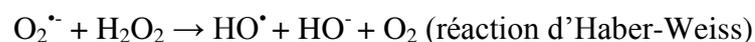


La dismutation du peroxyde d'hydrogène est une réaction lente en solution aqueuse mais peut être accélérée soit par les métaux lourds et leurs sels (cuivre, cobalt, manganèse, chrome, nickel, molybdène, plomb, fer) soit par des catalyseurs biologiques comme les enzymes. N'étant pas un radical libre, le peroxyde d'hydrogène est un faible oxydant, relativement stable avec les molécules biologiques. Toutefois, en présence de certains ions métalliques sa décomposition est de type radicalaire. C'est le cas lors de son association avec l'ion Fe^{2+} qui entraîne la réaction de Fenton et aboutit à la formation du radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et de l'ion hydroxyde (HOO^{\cdot}).

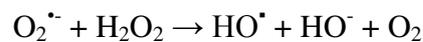
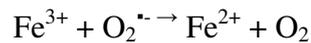


I. 3. Le radical hydroxyle (HO^{\cdot})

Le radical hydroxyle est produit par la réaction de Fenton ou par la réaction d'Haber-Weiss. Contrairement à la réaction de Fenton, la réaction d'Haber-Weiss ne nécessite pas de catalyseur métallique.



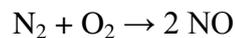
Cependant, il a été reconnu que la réaction d'Haber-Weiss est thermodynamiquement défavorable dans les systèmes biologiques puisque l'interaction entre le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène est une réaction de second ordre qui a une constante proche de zéro en solution aqueuse (Kehrer, 2000). Pour se produire la réaction requiert un catalyseur sous forme d'ion métallique et peut être séparée en deux réactions chimiques dont l'une est celle de Fenton :



La réaction de Fenton faisant intervenir le fer est aujourd'hui reconnue comme le mécanisme majeur de formation du radical hydroxyle. Le radical hydroxyle est l'oxydant le plus puissant actuellement connu généré au sein des cellules. De par sa demi-vie courte (environ une nanoseconde), et la faible distance qu'il peut parcourir (moins de dix nanomètres), il diffuse peu et agit directement sur son site de production avec toutes les macromolécules biologiques (sucres, acides aminés, phospholipides, nucléotides et acides organiques). Il opère selon trois mécanismes : en arrachant un électron, en arrachant un atome d'hydrogène ou en s'additionnant sur les doubles liaisons. Enfin, contrairement au superoxyde et au peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle ne peut pas être éliminé par une réaction enzymatique ce qui accentue sa dangerosité.

I. 4. Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote peut être formé par réaction entre le diazote et le dioxygène mais cette réaction ne peut se produire dans les systèmes biologiques car elle nécessite une température très élevée (plus de 1000 °C).



La formation du monoxyde d'azote dans la cellule nécessite donc l'intervention d'enzymes spécifiques (voir plus loin). En solution aqueuse le monoxyde d'azote se dissout en acide nitreux.



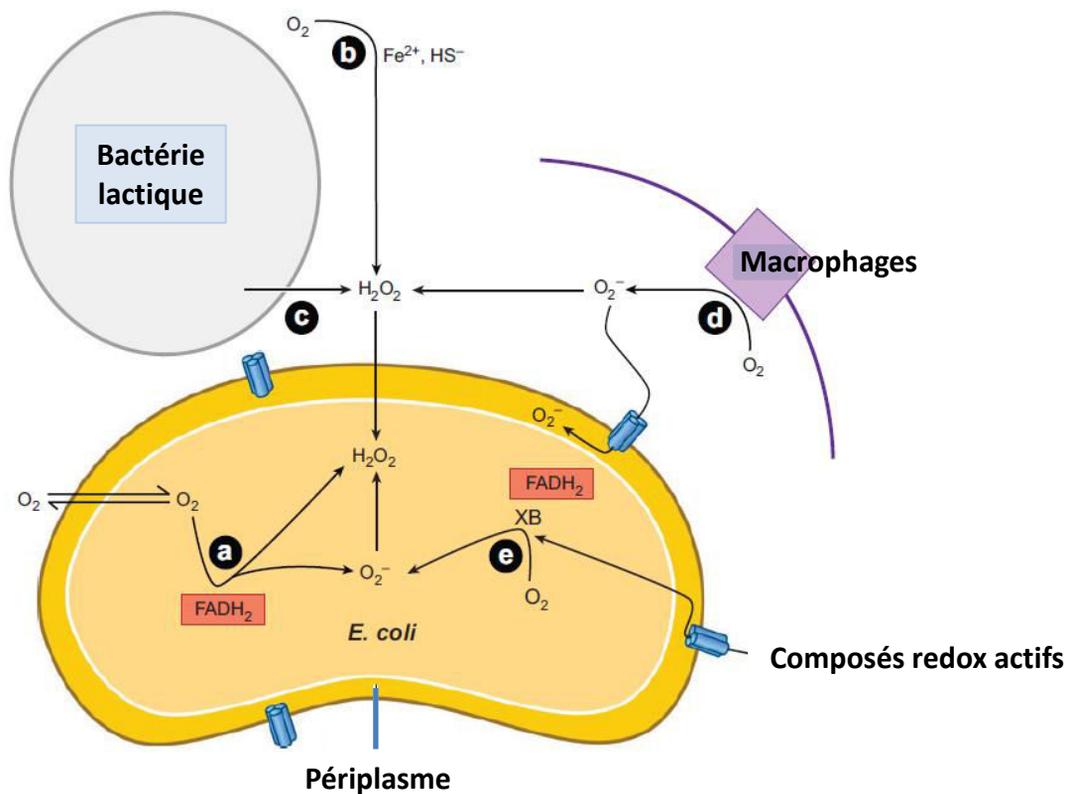


Figure 3 : Sources intracellulaires et extracellulaires de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène chez les bactéries.

E. coli est schématisée en jaune. (a) L'oxygène diffuse à travers la membrane et provoque l'autoxydation intracellulaire des flavoprotéines pour aboutir à la formation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. La source extracellulaire de peroxyde d'hydrogène provient des réactions d'oxydoréduction qui ont lieu dans l'environnement (ex : oxydation du soufre) (b) ou de la production par les bactéries compétitrices (ex : les bactéries lactiques) (c). La source extracellulaire de superoxyde provient des enzymes NADPH oxydases des macrophages (d) ou des composés redox actifs (ex : le paraquat) (e) (d'après une revue d'Imlay, 2008).

II. Sources des formes réactives de l'oxygène et du NO

Un résumé des sources intracellulaires et extracellulaires du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène est présenté en Figure 3.

II. 1. Sources intracellulaires de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène

Le taux de formation du peroxyde d'hydrogène chez *E. coli* est de 15 $\mu\text{M}/\text{sec}$ et celui du superoxyde est de 5 $\mu\text{M}/\text{sec}$. Ce taux a été mesuré chez des mutants déficients pour les systèmes d'élimination du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (Imlay, 2008).

La production intracellulaire en superoxyde et en peroxyde d'hydrogène dépend de deux paramètres. D'une part la concentration en oxygène, et d'autre part la quantité de molécules capables de céder des électrons à la molécule d'oxygène. L'oxygène traverse facilement la membrane bactérienne, sa concentration intracellulaire est donc proche de sa concentration extracellulaire. Quand la concentration en oxygène est élevée, la fréquence de collision avec les enzymes de transfert des électrons augmente et donc le taux de formation des formes réactives de l'oxygène augmente. Pour cette raison, les bactéries microaérophiles subissent moins de stress oxydatif que les bactéries vivant dans un environnement saturé en oxygène. Le potentiel d'oxydoréduction de l'oxygène est de -0.16V ce qui lui procure une faible affinité pour le premier électron qui lui est transféré. Par conséquent l'oxygène accepte uniquement les électrons provenant de bons donneurs univalents d'électrons comme les flavines, les centres métalliques et les quinones servant de cofacteur aux enzymes de transfert des électrons. Les flavines sont des composés à trois cycles qui sont capables de subir des réactions d'oxydoréduction (Figure 4). L'oxygène, étant une molécule de petite taille, pénètre facilement dans le site actif des flavoprotéines réduites. Le transfert d'un électron à la molécule d'oxygène aboutit à la formation du superoxyde (Kussmaul et Hirst, 2006). Si ce dernier reste à proximité de l'enzyme il peut recevoir un deuxième électron entraînant la production du peroxyde d'hydrogène. Théoriquement, les flavoprotéines forment un mélange de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Mais la réduction du superoxyde en peroxyde d'hydrogène doit être assez rapide pour que la réaction ait lieu avant le départ du superoxyde du site actif. Dans le cas contraire, du peroxyde d'hydrogène est obtenu. Par exemple, la glucose oxydase séquestre le superoxyde formé et donc produit uniquement du peroxyde d'hydrogène. Le taux de formation du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par les flavines dépend de leur potentiel d'oxydoréduction, de leur exposition au solvant, et du temps de résidence de l'électron sur la flavine durant le cycle catalytique (Messner et Imlay, 2002) (Korshunov et Imlay, 2010).

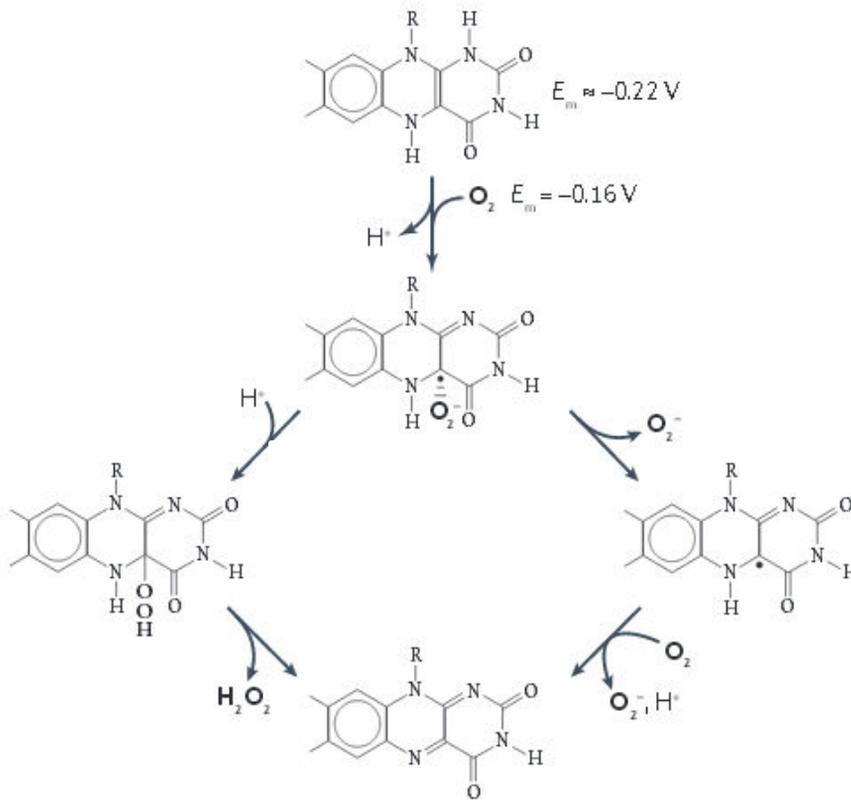


Figure 4 : La production des espèces réactives de l'oxygène à partir des flavoprotéines.

Les deux voies d'oxydation de la flavine d'une flavoprotéine sont représentées. L'autoxydation de la flavoprotéine est possible car la flavine associée à une enzyme possède un potentiel d'oxydoréduction aussi faible que l'oxygène. La voie de gauche permet la production de peroxyde d'hydrogène. La voie de droite relargue deux molécules de superoxyde consécutives. Les ROS et l'oxygène sont représentés en gras. Em, est le potentiel d'oxydoréduction (d'après une revue d'Imlay, 2013).

Chez *E. coli* les flavines des déshydrogénases de la chaîne respiratoire ont d'abord été identifiées comme la source principale de production du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (Messner et Imlay, 1999). Cependant des mutations qui éliminent les enzymes de la chaîne respiratoire, comme la NADH déshydrogénase II, ne diminuent pas la production du peroxyde d'hydrogène suggérant que le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont principalement formés par les flavoprotéines non respiratoires (Seaver and Imlay, 2004). Depuis, il a été montré, *in vitro*, qu'une grande variété de ces flavoprotéines non respiratoires sont capables de relarguer des ROS, dont la glutathione réductase, la lipoamide déshydrogénase et la glutamate synthase. Les centres FeS et les quinones de certaines enzymes peuvent également produire du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène car leur cofacteur est exposé à la surface facilitant la rencontre avec la molécule d'oxygène. C'est le cas de la succinate déshydrogénase ou de la fumarate réductase. Cependant, une faible proportion de ROS est produite par ces enzymes à cause de l'hydrophobicité de leur membrane interne réduisant l'entrée des ROS au sein du site actif et du faible potentiel d'oxydoréduction de leur cofacteur diminuant le taux de transfert des électrons. Par conséquent, chez *E. coli*, une faible proportion des ROS dérive de l'autoxydation des ménaquinones de la chaîne respiratoire (Imlay, 2008) (Imlay, 2013).

II. 2. Sources extracellulaires de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène

II. 2. 1. Sources extracellulaires de superoxyde

Le superoxyde est une espèce chargée qui ne peut pas traverser les membranes, mais certaines plantes ou bactéries peuvent induire la production de superoxyde chez leurs compétiteurs en produisant des composés redox actifs qui vont entrer dans la cellule et engendrer la production de superoxyde. Les macrophages peuvent aussi être une source de superoxyde, grâce à la NADH oxydase, pour tuer les bactéries pathogènes (Korshunov and Imlay, 2002) (Imlay 2008). Les composés à activité redox cyclique sont aussi appelés métabolites secondaires, terme qui historiquement désignait les composés qui avaient une activité antibiotique. Aujourd'hui, ils définissent les métabolites non requis pour la croissance bactérienne. Ils sont synthétisés pendant la phase stationnaire ou lors de conditions de carence. Il existe différents types de composés redox actifs sécrétés par de nombreux organismes dont les viologènes, les phénazines ou les quinones. Pour illustrer le rôle des composés redox actifs, nous nous intéresserons uniquement aux phénazines.

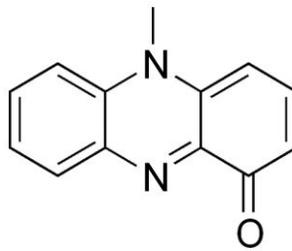


Figure 5 : Base structurale d'une molécule de phénazine.

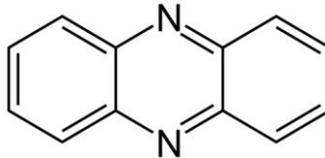


Figure 6 : Molécule de pyocyanine.

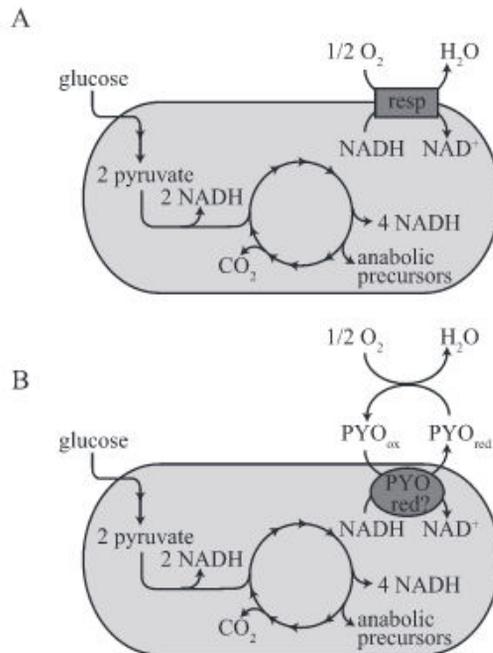


Figure 7 : Réduction de la pyocyanine pour le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire chez *P. aeruginosa* en conditions d'oxygène limitantes.

(A) En conditions de croissance normale, la chaîne respiratoire utilise l'oxygène pour oxyder le NADH qui a été réduit lors du cycle de Krebs. Le cycle de Krebs est alimenté par le pyruvate provenant de la glycolyse (consommation du glucose pour produire du pyruvate). (B) Lorsque les accepteurs terminaux d'électrons sont limités, (ex : limitation en oxygène en phase stationnaire de croissance) *P. aeruginosa* peut réduire la pyocyanine pour oxyder le NADH (d'après Price-Whelan, 2007).

Les phénazines constituent un large groupe de composés hétérocycles portant un atome d'azote. Leurs propriétés physiques et chimiques varient en fonction du type et de la position du groupe fonctionnel (Figure 5). Grâce à leur structure aromatique, les phénazines ont la capacité d'accepter ou de donner des électrons en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction et du potentiel des autres molécules, avec qui, les phénazines vont échanger des électrons. Le plus ancien phénazine naturel connu est la pyocyanine (Figure 6), composé bleu, produit par la bactérie *Bacillus pyocyaneus* et découvert par Gessard en 1882. Depuis, plus de cent composés de phénazines provenant de différents microbes ont été décrits dans la littérature et 6000 composés ont été synthétisés par l'homme. Pour certaines espèces bactériennes les phénazines ont un rôle bénéfique en servant de molécule de signalisation ou de régulateurs. Pour d'autres espèces, elles représentent un danger pour la cellule et deviennent une arme toxique (Mavrodi et al., 2006).

a. Rôle bénéfique des phénazines

Les phénazines n'ont pas de fonction évidente pour la croissance cellulaire, et ne servent pas de source d'énergie ou de substrat de réserve. Toutefois, il a été montré que les phénazines ont un rôle dans le développement du biofilm en augmentant la disponibilité du fer, en contrôlant l'homéostasie redox intracellulaire ou en ayant un rôle de molécule signal. Au sein du biofilm, les bactéries deviennent plus résistantes aux antibiotiques. Les phénazines augmentent la disponibilité du fer en réduisant le fer ferrique en un fer ferreux soluble et métabolisable. La disponibilité du fer ferrique est extrêmement limitée dans l'environnement cellulaire. Cette limitation provient du fait qu'en aérobie et à pH neutre le Fe^{3+} est très insoluble ou lié à des protéines de séquestration. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le fer est non seulement nécessaire à sa croissance, mais aussi à la formation du biofilm puisqu'il est le signal du passage d'une forme motile à une forme sessile. Par exemple, pendant l'infection la pyocyanine produite par *P. aeruginosa* est capable de libérer le Fe^{3+} des transferrines humaines en le réduisant en Fe^{2+} (Wang et al., 2011) (Ratledge and Dover, 2000). Les phénazines facilitent aussi l'homéostasie redox intracellulaire. Les bactéries peuvent rencontrer des conditions où les accepteurs terminaux d'électrons sont limités, réduisant la croissance et la production d'énergie, ce qui a comme conséquence un ratio $NADH/NAD^+$ élevé. *P. aeruginosa* est capable de maintenir un ratio $NADH/NAD^+$ à un faible niveau grâce à la production de pyocyanine qui sert d'accepteur terminal d'électron alternatif pour réoxyder le $NADH$ en NAD^+ (Figure 7). L'oxydation du $NADH$ couplée à la réduction de la phénazine permettrait de subvenir au besoin de la cellule quand les accepteurs terminaux

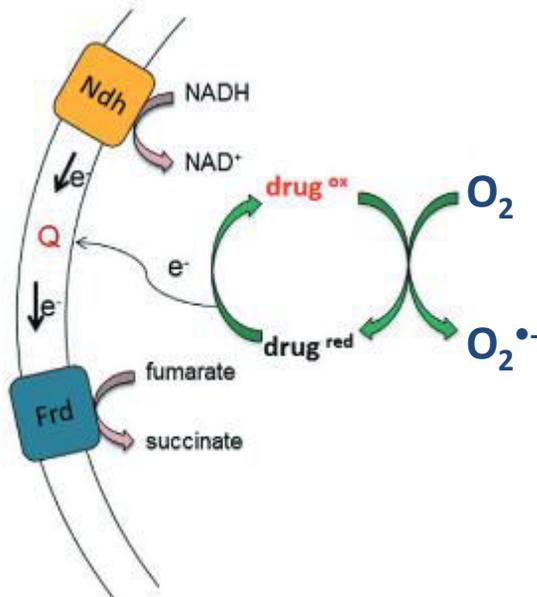


Figure 8 : Mécanisme de production du superoxyde à partir des composés redox actifs. La chaîne respiratoire provoque l'oxydation du pool de quinones qui vont à leur tour oxyder les composés redox actifs réduits. Les composés redox actifs oxydés transfèrent un électron à la molécule d'oxygène ce qui entraîne la formation du superoxyde. Ndh : NADH ubiquinone oxydoréductase ; Frd : succinate ubiquinone oxydoréductase ; Q : quinone ; drug^{ox} : composé redox actif oxydé ; drug^{red} : composé redox actif réduit (d'après Imlay, 2011).

d'électrons ne sont pas disponibles. Le transfert d'électrons aux phénazines représente une adaptation permettant aux bactéries de moduler l'état redox intracellulaire (Price-Whelan et al., 2007) (Wang et al., 2010). Enfin, les phénazines ont un rôle de signal au sein de la population bactérienne, en influençant le quorum sensing qui permet de coordonner l'expression génétique par la sécrétion de molécules. La pyocyanine est le signal cellulaire final dans la cascade du quorum sensing de *P. aeruginosa*. Les phénazines contribuent donc au développement de la communication entre les bactéries (Okegbe et al., 2011).

b. Toxicité des phénazines

Dans l'environnement, les phénazines sont utilisées pour éliminer les bactéries compétitrices. Leur toxicité est attribuée à leurs propriétés redox et à leur capacité à former des formes réactives de l'oxygène. Les phénazines pénètrent à l'intérieur des cellules et tout comme l'oxygène, elles attirent des électrons des flavines réduites, des centres métalliques ou des quinones de la chaîne respiratoire. La drogue réduite peut ensuite transférer l'électron à une molécule d'oxygène pour générer du superoxyde (Figure 8) (Hassan et Fridovich, 1979). Le processus de toxicité des composés redox actifs a été mis en évidence en 1978 quand Hassan et Fridovich ont décrit que le paraquat, un composé redox actif appelé aussi méthyl viologen, était toxique chez *E. coli* en présence d'oxygène. La toxicité du paraquat était augmentée en bloquant la synthèse des superoxydes dismutases, et une grande quantité d'électrons était nécessaire pour que son effet toxique soit maximal. Ainsi, l'étude sur le paraquat a montré que les composés redox actifs sont réduits dans la cellule puis oxydent l'oxygène pour donner du superoxyde (Hassan et Fridovich, 1978).

La pyocyanine produite par *P. aeruginosa* joue un rôle important dans la virulence de la bactérie lors de l'infection des cellules épithéliales des poumons. En effet, la pyocyanine est réduite par la glutathione et le NADH, puis réagit avec l'oxygène entraînant l'augmentation du niveau d'oxydation des cellules hôtes. Pour se défendre, les cellules épithéliales utilisent des oxydases, enzymes qui produisent des oxydants « doux » pour éliminer les bactéries pathogènes sans endommager ses propres molécules. Cependant, la pyocyanine produite par *P. aeruginosa* rentre en compétition avec les oxydases pour l'utilisation du NADPH, aggravant encore plus le niveau de ROS dans les cellules épithéliales. La pyocyanine aurait aussi un rôle dans la persistance des bactéries pathogènes pendant l'infection (Pierson et Pierson, 2010). Les phénazines pourraient aussi provoquer des dommages indépendamment du superoxyde. En effet, *E. coli* est sensible aux composés redox actifs même en anaérobiose, conditions où le superoxyde ne peut pas être produit. Il a été montré que les phénazines

inactivent directement la NADH déshydrogénase II de la chaîne respiratoire, *in vivo*, en oxydant la protéine (Imlay et Fridovich, 1991). Il a aussi été montré que les phénazines oxydent directement la protéine SoxR *in vitro*. Enfin en attirant les électrons du NADPH pour les transmettre à la chaîne respiratoire, les phénazines diminuent le niveau de NADPH de la cellule et interfèrent potentiellement avec des processus de biosynthèse qui ont besoin du NADPH (Gu et Imlay, 2011).

II. 2. 2. Sources extracellulaires de peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène pouvant traverser les membranes, les bactéries sont rapidement intoxiquées lorsque la concentration extracellulaire d'H₂O₂ est élevée. Les bactéries peuvent rencontrer du peroxyde d'hydrogène dans leur environnement naturel lors de processus chimiques comme l'oxydation du métal (comme le soufre) se produisant quand des sédiments anaérobies rencontrent l'oxygène. Le peroxyde d'hydrogène est aussi formé lors de mécanismes photochimiques utilisant les flavines ou d'autres chromophores. Ce phénomène est responsable de l'augmentation du stress oxydatif dans les milieux utilisés au laboratoire lorsque ceux-ci sont exposés au soleil. D'autre part, les bactéries lactiques peuvent produire du peroxyde d'hydrogène pour empoisonner leurs compétiteurs grâce aux pyruvates et lactates oxydases. Enfin, de la même façon que pour le superoxyde, les macrophages peuvent produire du peroxyde d'hydrogène grâce à leur NADPH oxydases (Imlay 2008) (Imlay 2013).

II. 3. Source de NO

Le NO, sous produit du cycle de l'azote, est produit lorsque les bactéries respirent sur du nitrate. Les bactéries réduisent le nitrate (N₂O) en nitrite (N₂) dans le but d'acquérir de l'énergie ou de maintenir l'état redox de la cellule durant la respiration anaérobie. La réduction du nitrite entraîne la formation du NO. Ce processus est effectué par des nitrites réductases. Le NO est aussi produit par des NO synthases qui catalysent la conversion de l'arginine en NO. Les NO synthases sont des métalloprotéines d'abord identifiées chez les mammifères comme la source du NO pouvant avoir un rôle de signal ou de protection contre le stress oxydant. Plus tard, des homologues de ces protéines ont été identifiés chez certains procaryotes notamment chez des bactéries à Gram positif. Cependant, le rôle de cette production chez les procaryotes reste flou et varie selon les espèces bactériennes. Chez *E. coli* aucune enzyme de type NO synthase n'a été identifiée (Crane et al., 2010).

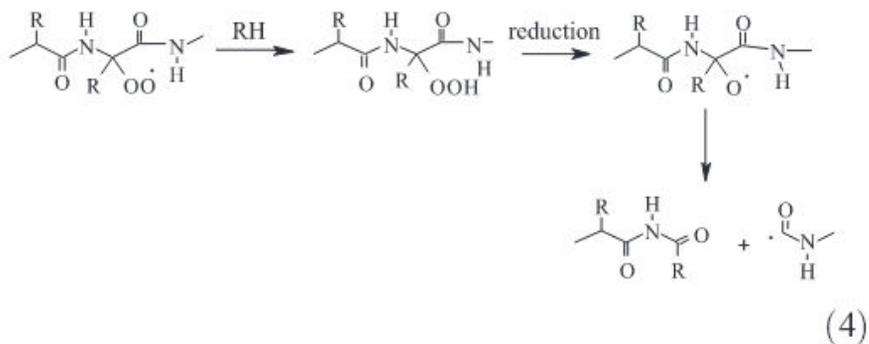
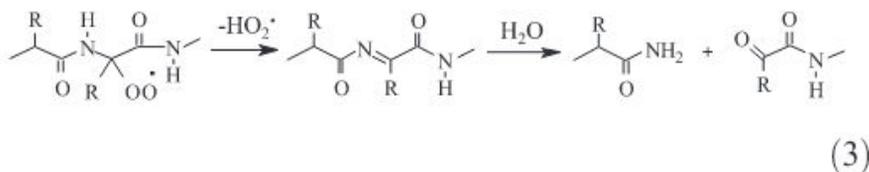
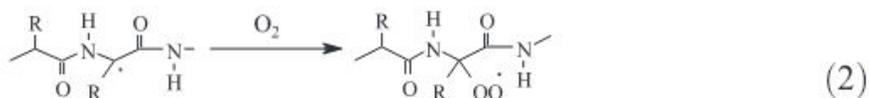
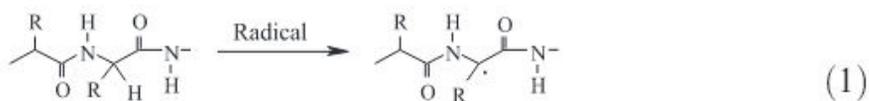


Figure 9 : Oxydation de la chaîne polypeptidique.

L'oxydation du C α aboutit à la formation d'un radical carboné (C \cdot) (1) qui réagit avec une molécule d'oxygène (O $_2$) pour former un radical peroxyde (ROO \cdot R) (2). Le radical peroxyde peut emprunter deux voies : dans la première, le radical peroxyde forme une imine en relarguant un hydroperoxyde (HO $_2\cdot$) qui par réaction avec une molécule d'eau (H $_2$ O) aboutit à la fragmentation du polypeptide (3). Dans la deuxième, le radical peroxyde attire un atome d'hydrogène (H) provenant d'un autre site sur la chaîne polypeptidique ce qui entraîne la formation d'un hydroperoxyde (ROOH) puis la fragmentation du polypeptide (4) (d'après une revue d'Imlay, 2013).

III. Cibles du superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyle

Les formes réactives de l'oxygène causent des dommages qui se traduisent par un défaut de croissance et un taux de mutagenèse élevé pouvant entraîner la mort cellulaire. Les trois grandes classes de molécules, protéines, lipides et ADN, peuvent être touchées.

III. 1. Les protéines

De part leur abondance dans la cellule, les protéines sont les cibles principales des ROS. La plupart des dommages protéiques sont irréparables et conduisent à l'inactivation de la protéine. Les ROS en général peuvent réagir au niveau de la chaîne latérale, du résidu amino-terminal de la protéine ou au niveau du cofacteur métallique de la protéine. Les conséquences de l'oxydation des protéines sont la fragmentation, la dimérisation, la création de nouvelles formes réactives de l'oxygène et le changement conformationnel qui peut conduire à la perte de fonction de la protéine. Plus l'oxydant est puissant, moins il est sélectif concernant son site d'attaque. Ainsi le radical hydroxyle peut agir à peu près partout sur une protéine alors que le peroxyde d'hydrogène est plus sélectif. Les polypeptides liant du fer sont la cible des radicaux hydroxyles produits par la réaction de Fenton (Berlett et Stadtman, 1997).

III. 1. 1. La chaîne polypeptidique

Parmi les ROS, ce sont les radicaux (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$) qui réagissent le plus avec la base polypeptidique. L'attaque se fait par attraction de l'hydrogène du carbone α (carbone de fixation de la chaîne latérale) et aboutit à la formation d'un radical carboné (C^\bullet). Ce dernier peut réagir avec l'oxygène pour donner un radical peroxyde et entraîne l'hydrolyse et la fragmentation du polypeptide (Figure 9). Le radical peroxyde peut aussi attirer un atome d'hydrogène fixé sur un autre site de la protéine, aboutissant à la formation d'un hydroperoxyde (ROOH), puis à la fragmentation de la protéine (Berlett et Stadtman, 1997).

III. 1. 2. La chaîne latérale des acides-aminés

Les chaînes latérales des acides aminés peuvent être oxydées par les attaques radicalaires, certains étant plus réactifs que d'autres comme les chaînes aromatiques ou soufrées. Ainsi les acides aminés les plus touchés sont l'histidine, la proline, le tryptophane, l'arginine, la tyrosine, la lysine, la méthionine et la cystéine. Le radical hydroxyle quant à lui, peut oxyder toutes les chaînes latérales.

L'attaque des chaînes latérales aliphatiques (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine,

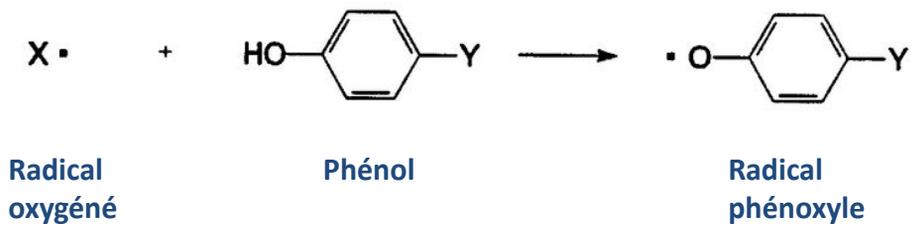


Figure 10 : L'attaque d'un phénol par un radical oxygéné entraîne la formation d'un radical phénoxy.

L'attaque des chaînes aromatiques, comme celle appartenant à la tyrosine, par un radical oxygéné (superoxyde ou radical hydroxyl) se fait au niveau du phénol et aboutît à la formation d'un radical phénoxy.

proline, méthionine) suit la même réaction que celle de la base polypeptidique. L'oxydant attire un atome d'hydrogène pour donner un radical carboné. La différence est que le radical carboné peut se dimériser avec un autre radical ce qui aboutit à la formation des liaisons intra- et inter-chaînes polypeptidiques et a pour conséquence l'agrégation des protéines. Le radical carboné peut aussi donner un radical peroxyde par réaction avec l'oxygène qui en attirant un atome d'hydrogène peut former un hydroperoxyde.

Parmi l'attaque des chaînes aromatiques, la plus courante est l'attaque de la tyrosine qui entraîne la formation d'un radical phénolyle et aboutit à la formation de liaisons intra- et inter-chaînes (Figure 10).

Enfin, une lésion couramment retrouvée est la carbonylation des protéines qui est formée par attaque du groupe amine des acides aminés proline, arginine, lysine et thréonine. Cette oxydation entraîne la formation de cétones ($RC(=O)R'$) ou d'aldéhydes ($RC=OH$) qui aboutissent à la formation du 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). Ce dommage est de nature irréversible. La carbonylation des protéines augmente quand les bactéries sont cultivées en présence d'une grande concentration de fer, en présence de peroxyde d'hydrogène ou en présence de drogues du cycle redox (Suzuki et al., 2010) (Berlett et Stadtman, 1997).

III. 1. 3. Cas particulier des cystéines et des méthionines

L'oxydation des cystéines et des méthionines est effectuée au niveau de l'atome de soufre et entraîne la formation d'un intermédiaire acide sulfénique ($R-SOH$). Cet intermédiaire étant instable, il réagit très rapidement avec d'autres protéines à thiol aboutissant à la formation d'un pont disulfure intra- ou inter-moléculaire ($R_1-S-S-R_2$). L'acide sulfénique peut aussi réagir avec un groupe amine voisin aboutissant à la formation de groupes sulfenamides ($RSNR'_2$), sulfinamides ($RS(O)NR'_2$) ou sulfonamides ($RSN(O)_2NR'_2$). Enfin, l'acide sulfénique peut être oxydé de façon irréversible en acide sulfinique ($R-SO_2-H$) ou acide sulfonique ($R-SO_3-H$) entraînant la dégradation des protéines. De la même façon, les méthionines peuvent être oxydées de façon irréversible en méthionine sulfone et méthionine sulfoximine entraînant aussi la dégradation des protéines (Dahl et al., 2015) (Leichert et al., 2008).

III. 1. 4. Les protéines à centre FeS

En 1986 Carlioz et Touati décrivent le phénotype des mutants des superoxydes dismutases. Ces mutants présentaient un défaut de croissance en aérobie mais pas en anaérobie et étaient incapables de croître dans un milieu non supplémenté en acides aminés branchés, aromatiques ou soufrés (Carlioz et Touati, 1986). Ces observations ont mis en évidence la perturbation des

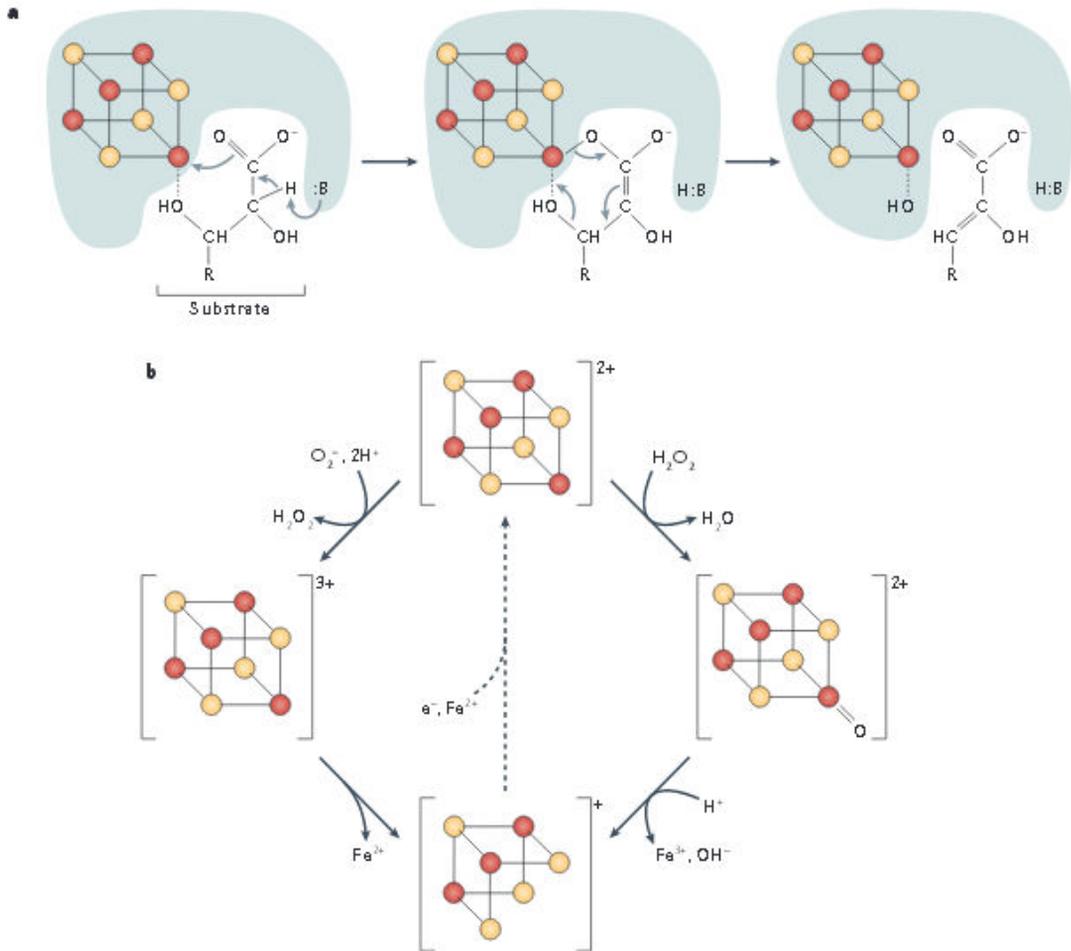


Figure 11 : Le rôle des déshydratases à centre FeS et leur sensibilité aux ROS.

(a) Les enzymes de la famille des DHAD déshydratent l'acide α,β - dihydroxy et relarguent un produit énol (représenté) qui se tautomérise en acide α -keto (non représenté). Le centre FeS de la DHAD se fixe au substrat par l'intermédiaire des groupements β -hydroxyl et du groupement carboxylate. La déprotonation du substrat par un polypeptide proche (:B) entraîne l'attraction de l'hydroxyde par l'atome de fer catalytique ce qui entraîne une déshydratation. Les flèches grises représentent le transfert des électrons à travers tous les partenaires de la réaction. **(b)** Les deux voies d'oxydation des centres FeS sont représentées. A gauche, le centre FeS exposé au solvant est oxydé par le superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ce qui entraîne la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et la conversion du centre en une forme $[\text{4Fe-4S}]^{3+}$ suivi de la libération d'un atome de Fe^{2+} . La perte de l'atome de fer abolit l'activité de l'enzyme. A droite, le centre FeS est oxydé par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formant un intermédiaire ferryl qui attire un électron du centre FeS relarguant un atome de Fe^{3+} (d'après Imlay, 2013).

voies de biosynthèse des acides aminés par le superoxyde. Kuo et Fridovich ont ensuite montré que l'auxotrophie pour les acides aminés branchés des mutants des superoxydes dismutases était due à la défaillance d'une étape de biosynthèse des acides aminés catalysée par l'acide dihydroxy déshydratase à centre [4Fe-4S], IlvD (Kuo et al., 1987). IlvD catalyse deux réactions : la conversion des acides 2,3- dihydroxy-isovalérate en 2-keto-isovalérate et la conversion du 2,3-dihydroxy-3-méthylvalérate en acide 2-keto-3-méthyl-valérate qui sont nécessaires pour la biosynthèse des acides aminés branchés, valine isoleucine et leucine. De la même façon que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est aussi capable de déstabiliser la protéine IlvD, et les mutants des catalases et peroxydases d'*E. coli* sont également auxotrophes pour les acides aminés branchés.

D'autres enzymes de la famille des DHAD qui catalysent des réactions similaires sont sensibles aux ROS, comme les aconitases A et B qui réalisent l'isomérisation du citrate en isocitrate, et les fumarases A et B qui catalysent l'hydratation du fumarate en L-malate dans le cycle de Krebs. Le centre [4Fe-4S] des protéines de la famille des DHAD joue le rôle d'acide de lewis (susceptible d'accepter un doublet d'électrons pour créer une liaison covalente) dans la réaction de déshydratation et sert de liaison avec le substrat de l'enzyme.

Un des atomes de fer du centre FeS des protéines de la famille des DHAD n'est pas coordonné par la protéine et est exposé au solvant. Le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène pénètrent dans le site actif des déshydratases et se lient au centre [4Fe-4S] pour attirer un électron. L'oxydation au niveau de l'atome de fer du centre FeS conduit à une forme [4Fe-4S]³⁺ instable. L'atome de Fe²⁺ est ensuite relargué entraînant la formation d'un centre [3Fe-4S]⁺ inactivant ainsi l'enzyme (Figure 11). L'atome de Fe²⁺ relargué alimente la réaction de Fenton pour produire du radical hydroxyle. Les dommages causés aux déshydratases à centre FeS par le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont importants. Quelques micromolaires de ROS suffisent à les détruire. La plupart des autres protéines à centre FeS ne sont pas déstabilisées par les ROS car le centre FeS est pleinement coordonné par le polypeptide (Imlay 2013).

III. 1. 5. Les protéines à Fer mononucléaire

E. coli possède plus de 100 enzymes non redox qui utilisent du fer comme co-facteur. C'est le cas des épimérasés, de certaines déshydrogénases, des déformylases et des déaminases. L'atome de fer lie directement le substrat de l'enzyme et permet de catalyser la réaction. Ces enzymes peuvent être attaquées par le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène au niveau de leur atome de fer. En effet, le centre métallique des enzymes à fer mononucléaire

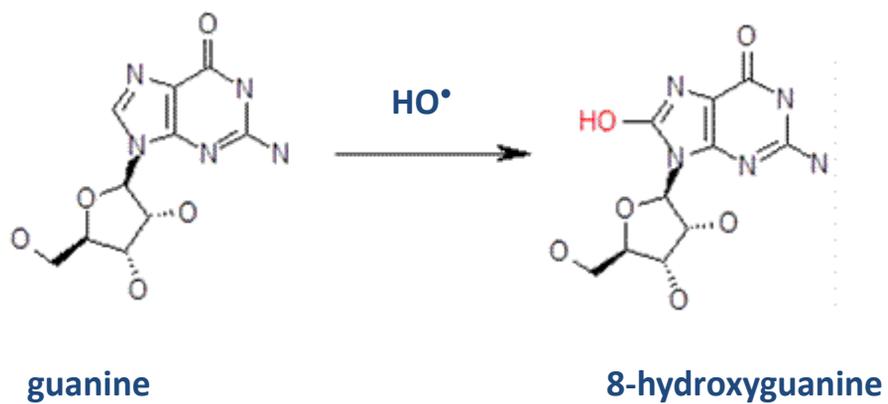


Figure 12 : Oxydation de la guanine en 8-hydroxyguanine.

La guanine est la base qui subit le plus de dommages lors du stress oxydant. L'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle (HO^\bullet) entraîne la formation d'une 8-hydroxyguanine, composé hautement mutagène.

étant chargé positivement, le superoxyde peut former une liaison électrostatique avec l'atome de fer du site actif. L'inactivation par le peroxyde d'hydrogène implique la réaction de Fenton alimentée par l'atome de fer de l'enzyme. Le radical hydroxyle généré oxyde irréversiblement les acides aminés de l'enzyme et la re-métallation ou l'élimination du stress ne permettent pas une réactivation de l'enzyme (Anjem et Imlay, 2012) (Sobota et Imlay, 2011). Dans le cas du superoxyde, la réaction avec l'atome de fer de l'enzyme n'entraîne pas la formation du radical hydroxyle. Cependant, le risque est ici la mismétallation qui résulte du remplacement du fer par un métal alternatif abondant *in vivo* comme le zinc. Toutefois, le zinc est moins efficace que le fer pour catalyser la réaction des enzymes (Gu et Imlay, 2013).

III. 2. Les lipides

La peroxydation lipidique est un processus universel chez les eucaryotes mais son existence est moins évidente chez les bactéries. En effet, elle implique que les lipides soient polyinsaturés. Or, la plupart des bactéries contiennent des acides gras saturés ou mono-insaturés (Nichols et McMeekin, 2002) (Bielski et al., 1983). Une étude récente suggère que *Borrelia burgdorferi* est une exception puisque cette bactérie, pathogène intracellulaire, peut acquérir et incorporer des acides gras de son hôte eucaryote. De façon intéressante, cette espèce est sensible à la peroxydation lipidique (Boylan et al., 2008). D'autres études ont mis en évidence l'existence de la peroxydation lipidique chez les bactéries mais des études supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer ces résultats.

III. 3. L'ADN

Une des conséquences majeures du stress oxydant est la mutagenèse. Le peroxyde d'hydrogène est incapable de causer directement des dommages à l'ADN, mais le fait indirectement *via* les radicaux hydroxyles produits lors de la réaction de Fenton. En effet, une partie du pool de fer libre intracellulaire est associée à l'ADN, et une fois formé, le radical hydroxyle réagit directement avec les molécules se trouvant près de son lieu de formation donc au niveau de l'ADN. Lorsque la concentration en fer intracellulaire est élevée, comme dans un mutant Δfur , le taux de dommage à l'ADN augmente (Touati et al., 1995). L'oxydation des bases ou du ribose de l'ADN entraîne la formation de différents types de lésions (Henle et al., 1999). La guanine est la base qui subit le plus de dommages car elle a un faible potentiel d'oxydoréduction. Et même quand c'est une adénine qui subit l'attaque du radical hydroxyle l'électron est transféré à un résidu guanine situé à proximité. L'un des produits de l'oxydation de la guanine est la 8-hydroxyguanine (Figure 12). Ce composé est

hautement mutagène puisqu'en s'appariant avec une adénine il ne crée pas de déformation de l'ADN et ne bloque pas l'ADN polymérase ce qui introduit une mutation de type transversion G-C-->T-A après réplication (Hogg et al., 2005). L'oxydation d'une thymine produit une lésion qui bloque la progression de la polymérase ce qui entraîne des cassures de l'ADN (Demple et al., 1986). Enfin, l'oxydation des riboses entraîne une cassure de l'ADN simple brin avec des résidus 3' glycolates qui bloquent la polymérase.

La contribution du superoxyde à l'augmentation de la mutagenèse est due à l'augmentation du pool de fer intracellulaire *via* le recyclage du fer oxydé en fer ferreux et le relargage du fer provoqué par la destruction des centres FeS (Keyer and Imlay, 1996) (Imlay, 2008) (Imlay, 2013).

IV. Cibles du NO

Le NO est toxique pour la cellule dû à sa réactivité avec une large gamme de cibles. Le NO peut nitrosyler les acides aminés, en particulier ceux qui ont un groupement thiol. Les lésions provoquées peuvent entraîner la formation des liaisons inter- et intrachânes polypeptidiques. Le NO peut également s'attaquer aux co-facteurs métalliques et en particulier les protéines à centre FeS. De plus, le NO peut provoquer des dommages à l'ADN par réaction avec les amines ce qui entraîne la formation d'un dérivé N-nitroso instable (-N-N=O) qui aboutît à la déamination. Ainsi, l'adenine est déaminée en hypoxanthine, la guanine en xanthine et la cytosine en uracile (Crack et al., 2015).

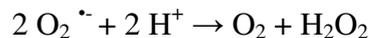
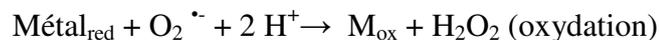
V. Moyens de défense contre le stress oxydant

V. 1. Elimination des formes réactives de l'oxygène

Les enzymes qui éliminent les formes réactives de l'oxygène sont ubiquitaires chez les organismes vivants en aérobie ce qui montre que les ROS sont couramment rencontrées dans les bactéries.

V. 1. 1. Les superoxydes dismutases

En 1969 Mc Cord et Fridovich ont révélé l'existence des superoxydes dismutases SodA et SodB. Leur importance *in vivo* a été mise en évidence quand les mutants des superoxydes dismutases cytoplasmiques ont été montrés comme ayant un défaut de croissance en aérobie mais pas en anaérobie. Les superoxydes dismutases sont des enzymes qui effectuent la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène. La dismutation du superoxyde catalysée par les SODs peut être écrite par deux demi-réactions faisant intervenir le superoxyde à la fois comme réducteur et comme oxydant vis-à-vis du métal du site actif (Klug et al., 1972) :



avec Métal = Cu, Fe ou Ni

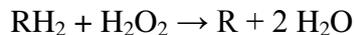
E. coli contient trois superoxydes dismutases. Deux d'entre elles sont retrouvées dans le cytoplasme. La première a un atome de fer (SodB) et la deuxième a un atome de manganèse (SodA) comme cofacteur. Les métaux sont présents dans le site actif de SodA et SodB. Bien que les deux enzymes soient homologues, SodA et SodB sont spécifiques pour le métal qui constitue leur site actif. Par exemple l'atome de fer de SodB peut être remplacé par du manganèse mais l'enzyme n'est pas active pour autant. Cependant, les deux métaux sont en compétition pour l'occupation du site actif. Certaines bactéries anaérobies facultatives ont une superoxyde dismutase dite cambialistique car elle accepte dans son site actif du fer ou du manganèse tout en conservant son activité enzymatique. Une autre superoxyde dismutase à cofacteur à cuivre-zinc est présente dans le périplasma (SodC) (Benov et Fridovich, 1994). SodC forme un homodimère qui contient du cuivre et du zinc liés dans le site actif au niveau d'une structure imidazole (C₃H₄N₂). Le cuivre (Cu²⁺) est utilisé comme métal catalytique

puisque son interaction avec le superoxyde provoque sa réduction (Cu^{1+}) et la rupture de sa liaison avec l'imidazole. Le zinc quant à lui joue un rôle structural en maintenant l'imidazole en place pendant le cycle catalytique.

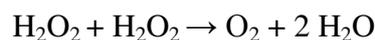
La raison pour laquelle *E. coli* possède trois superoxydes dismutases est que le superoxyde produit dans le cytoplasme et dans le périplasma ne diffuse pas à travers les membranes bactériennes. Ainsi, les enzymes qui éliminent le superoxyde doivent être retrouvées dans le compartiment qu'elles doivent protéger. La formation du superoxyde périplasmique a été observée principalement lors de la phase stationnaire de croissance et aucun phénotype n'a été reporté chez des bactéries dépourvues de la superoxyde dismutase à cuivre-zinc (Gort et al., 1999) (Imlay, 2013) (Fridovich, 2013).

V. 1. 2. Les catalases et hydrogènes peroxydases

Trois enzymes sont importantes pour la dégradation du peroxyde d'hydrogène. L'alkyl hydroperoxyde réductase (AhpCF), et les catalases G et E (KatG) et (KatE) (Seaver et Imlay, 2001) (Loew, 1900). Ahp est une NADH peroxydase à thiol à deux composants, AhpC et AhpF. Elle transfère les électrons du NADH au peroxyde d'hydrogène ce qui entraîne la réduction de ce dernier en molécule d'eau selon la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène oxyde la cystéine 46 de AhpC en acide sulfénique qui, après condensation avec la cystéine 165, aboutit à la formation d'un pont disulfure. Le pont disulfure est réduit et déplacé vers une autre cystéine de AhpC avant que la flavoprotéine AhpF utilise le NADH pour réduire le pont disulfure. KatG possède une activité catalase et une activité peroxydase et KatE a uniquement une activité catalase. Les catalases KatG et KatE utilisent une molécule de peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électron et une deuxième molécule d'hydrogène comme donneur d'électron pour catalyser la réaction de dismutation suivante qui produit de l'oxygène et de l'eau :



La raison pour laquelle *E. coli* possède de multiples enzymes pour éliminer le peroxyde d'hydrogène réside dans le fait que chaque enzyme agit à une concentration différente en peroxyde d'hydrogène dans la cellule. Ahp est l'enzyme utilisée quand la concentration en peroxyde d'hydrogène est faible. En effet, la vitesse de dégradation du peroxyde d'hydrogène dépend de la vitesse à laquelle la cellule lui fournit du NADH. Ahp fonctionne mal quand la

concentration intracellulaire dépasse 20 μM de peroxyde d'hydrogène ou que le NADH devient rare. Lorsque la concentration en peroxyde d'hydrogène est élevée, les catalases prennent le relai. En effet ces enzymes ne dépendent pas du NADH et peuvent donc agir plus rapidement. Les catalases semblent à première vue présenter tous les avantages de l'enzyme idéale. Cependant leur cycle catalytique se déroule en deux étapes avec un intermédiaire sous forme de radical « ferryl ». Cette espèce est un oxydant potentiel pour la cellule et s'il n'est pas éliminé rapidement il peut attirer des électrons des biomolécules (Putnam et al., 2000). Pour diminuer ce risque, KatE lie le NADPH pour utiliser sa capacité de réducteur et KatG possède un tunnel dans sa structure protéique qui permet à de nombreux métabolites de rentrer au sein de la protéine pour réduire le radical ferryl (Díaz et al., 2012) (Imlay, 2013).

V. 2. Contrôle du niveau de fer intracellulaire

Lors d'un stress oxydatif, la présence de fer est dangereuse pour la cellule car le fer réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former les radicaux hydroxyles. Pour éviter ce problème, la cellule limite la concentration en fer intracellulaire. Pour cela des protéines de stockage du fer sont produites par la cellule (Neilands, 1993). L'homéostasie du fer est contrôlée par la protéine Fur, un répresseur activé par liaison avec son cofacteur, un atome de fer. Dans une souche mutante Δfur le niveau de fer intracellulaire augmente d'un facteur 5 à 10 augmentant le taux de mutagenèse et les dommages à l'ADN provoqués par le peroxyde d'hydrogène (Touati et al., 1995). Quand Fur est lié au fer, il se fixe à la région promotrice des opérons et réprime l'expression des gènes qui codent pour des protéines d'acquisition du fer (voir chapitre régulation par Fur) (Park et al., 2005).

V. 3. Contrôle du niveau de manganèse intracellulaire

Le manganèse joue un rôle dans la défense contre le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. En effet, l'ajout de manganèse peut supprimer la sensibilité de mutants SOD au superoxyde et au peroxyde d'hydrogène chez *E. coli* (Al-Maghrebi et al., 2002). Le transporteur du manganèse, MntH est essentiel pour une croissance en aérobie chez les mutants des catalases et peroxydases et MntH est induit par une exposition au peroxyde d'hydrogène (Anjem and Imlay, 2012). Il a été proposé que, durant un stress *E. coli* a pour stratégie de remplacer l'atome de fer de certaines enzymes par du manganèse. Le manganèse pourrait rentrer en compétition avec le fer et aurait l'avantage d'assurer la réaction catalytique en empêchant la réaction de Fenton.

V. 4. Efflux des composés redox actifs

Un des moyens de défense contre les composés redox actifs, source de superoxyde, est la diminution de leur entrée et l'augmentation de leur sortie. La diminution de l'entrée des drogues dans la cellule est effectuée par MicF, un petit ARN non codant qui bloque l'expression du gène codant pour OmpF, une porine de la membrane externe. L'augmentation de la sortie des drogues de la cellule est effectuée grâce à la pompe à efflux AcrAB-TolC. AcrA est une protéine de la membrane périplasmique et AcrB de la membrane cytoplasmique. Les deux protéines sont reliées à TolC, et permettent l'efflux d'une grande variété de composés dont les composés redox actifs (Imlay, 2008).

V. 5. Réparation des dommages causés par les formes réactives de l'oxygène

V. 5. 1. Réparation des protéines

L'oxydation des protéines est pour la plupart du temps irréversible. La dégradation protéolytique est la solution utilisée par la cellule pour éliminer les polypeptides endommagés. Cependant, il existe des systèmes permettant de réduire les acides aminés soufrés oxydés et d'autres systèmes de réparation peuvent intervenir lorsque c'est un cofacteur qui a été oxydé.

a. Réparation des cystéines et des méthionines oxydées

Lors de l'oxydation des cystéines ou des méthionines, l'acide sulfénique formé réagit avec des antioxydants à thiol de nature non protéique comme le glutathion (GSH) ou avec la cystéine libre (non incorporée dans les protéines). Cette interaction entraîne la formation d'un mélange de S-glutathionylation (R-S-S-GSH), dans le cas de la réaction avec le glutathion, et de S-cystéinylation, dans le cas de la réaction avec la cystéine (R-S-S-R_{cys}).

Les ponts disulfures formés par oxydation des cystéines et des méthionines sont également réversibles grâce à l'intervention des enzymes de la famille des oxydoréductases qui sont des enzymes associées à des coenzymes (FAD, le FMN ou le NAD) catalysant des réactions d'oxydoréduction en transférant des protons et des électrons. Les oxydoréductases réduisent les thiols oxydés par échange direct entre le groupement thiol oxydé et le groupe disulfide de l'oxydoréductase. Dans la famille des oxydoréductases sont retrouvées des glutaredoxines et des thioredoxines. Les thioredoxines réduisent les ponts disulfures mais peuvent également réduire les acides sulféniques. Les glutaredoxines, quant à elles, réduisent préférentiellement les ponts disulfures. Après réduction, la thioredoxine et la glutaredoxine deviennent à leur tour oxydées. La thioredoxine est réduite par la thioredoxine réductase et la glutaredoxine est

réduite par le glutathion dont le produit (GSSG) est prit en charge par la glutathione oxydoréductase. Chacune de ces réductions nécessite du NADPH comme équivalent réducteur.

Dans le cas des méthionines, la réduction des méthionines sulfoxyde est prise en charge par les méthionines sulfoxyde réductases (MSR) (Imlay, 2013).

b. Réparation des protéines à centre FeS et à fer mononucléaire

L'oxydation des centres [4Fe-4S] des déshydratases par le superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène entraîne la formation d'un centre [3Fe-4S]⁺. Après oxydation, les protéines de la famille des DHAD peuvent être réactivées par réduction et re-métallation, sauf si l'oxydation de l'enzyme est effectuée de façon irréversible par le radical. *In vitro* la réparation du cofacteur nécessite uniquement la réduction du centre FeS par du dithiotréitol et la re-métallation par un atome de Fe²⁺. *In vivo*, les protéines YggX et YtfE seraient impliquées dans le processus de réparation du centre FeS mais le mécanisme n'est pas caractérisé. YtfE serait aussi impliqué dans la réparation des centres FeS quand ils sont nitrosylés lors d'un stress NO (Justino et al., 2007) (Gralnick and Downs, 2001) (Pomposiello et al., 2003). La machinerie de biogenèse des protéines à centre FeS SUF assure l'assemblage *de novo* des centres FeS pendant un stress oxydant, mais il a aussi été suggéré qu'elle puisse jouer un rôle dans la réparation des protéines à centres FeS (Jang et Imlay, 2010). Les enzymes à fer mononucléaire peuvent être réactivées par simple re-métallation à moins que le radical hydroxyle déstabilise l'enzyme irréversiblement.

V. 5. 2. Réparation de l'ADN

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la réparation des dommages causés à l'ADN. Les protéines MutM, Fpg (Formamidopyrimidine DNA glycosylases) et les endonucléases IV et VIII entraînent l'excision des bases oxydées (Jiang et al., 1997) (Saito et al., 1997) (Tchou et al., 1991). Les endonucléases III et IV excisent les riboses endommagés et restaurent l'amorce en 3' pour que l'ADN polymérase puisse commencer la réparation (Demple et al., 1986). Quand les systèmes d'excision n'arrivent pas à reconnaître une lésion, ou quand une fourche de réplication n'est pas réparée, le processus de réparation nécessite une étape de recombinaison. Lors de la croissance en aérobie, le taux de lésions à l'ADN est tel que ces systèmes de réparation sont des fonctions cruciales. Les souches qui ont un problème dans le système de recombinaison (les mutants *recA*), ou le système d'excision (les mutants *xth*) sont affectées dans leur croissance. La protéine RecA contrôle également l'expression du système SOS qui comprend le gène *sfiA*. Il code pour une protéine qui est capable de suspendre la

septation des cellules jusqu'à ce que les dommages soient réparés et que la réplication reprenne. Une alternative à la réparation est d'utiliser des polymérase qui ne sont pas arrêtées par certaines lésions afin de continuer la réplication de l'ADN. Cependant, une conséquence est l'augmentation de la mutagenèse. Ce processus est assuré par des polymérase de translésions telles que Pol IV et V (Napolitano et al., 2000) dont les gènes *dinB* et *umuDC*, codant respectivement pour Pol IV et V, sont régulés par le système SOS. L'expression de ces protéines est induite tardivement. En effet la mutagenèse est la dernière option prise par la cellule quand tous les autres systèmes ont échoués dans la réparation de l'ADN. De façon intéressante le gène *nfo* codant pour l'endonucléase IV est la seule enzyme de réparation de l'ADN qui est contrôlé par le régulon SoxRS (Imlay 2013).

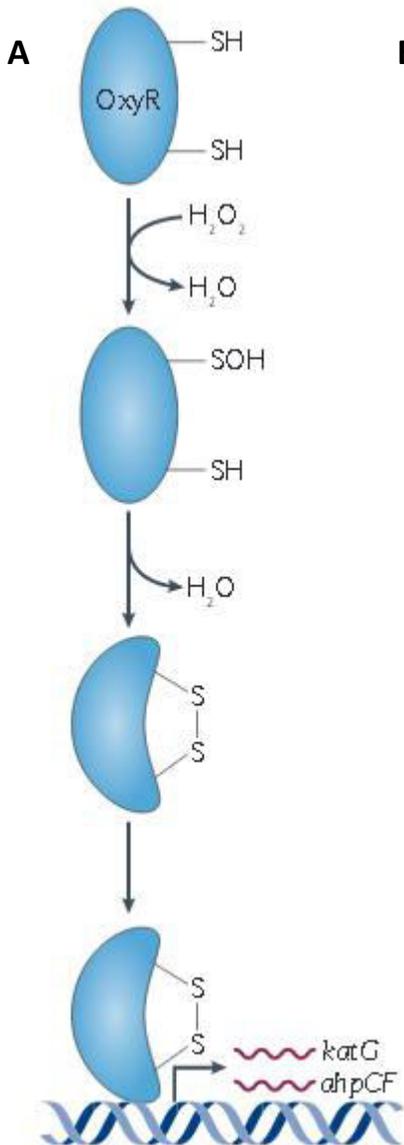


Figure 13 : Activation d'OxyR par le peroxyde d'hydrogène et les protéines codées par les gènes du régulon OxyR.

(A) L'activation d'OxyR se produit quand du peroxyde d'hydrogène réagit avec la cystéine du régulateur, formant l'acide sulfénique qui se condense avec une deuxième cystéine pour former un pont disulfure. Le pont disulfure entraîne un changement conformationnel qui permet à OxyR d'activer la transcription des membres du régulon OxyR.

(B) Les principales protéines codées par les gènes du régulon OxyR chez *E. coli* (d'après une revue d'Imlay, 2013).

VI. Régulateurs du stress oxydant

VI. 1. OxyR

La protéine OxyR, fait partie de la famille des régulateurs transcriptionnels LysR. Chez *E. coli*, OxyR agit comme un activateur de la transcription en recrutant l'ARN polymérase. En présence de peroxyde d'hydrogène la cystéine 199 de OxyR est oxydée en acide sulfénique (-SOH) permettant son rapprochement avec la cystéine 208 et la formation d'un pont disulfure (Figure 13). La cystéine de la protéine OxyR est sensible puisqu'elle détecte quelques micromolaires de peroxyde d'hydrogène en quelques secondes. Cette oxydation provoque un changement conformationnel de la protéine. OxyR activé se fixe près de la région -35 des gènes cibles et stimule la transcription par contact avec l'ARN polymérase (Tao et al., 1993) (Zheng et al., 2001). L'oxydation d'OxyR est réversible car après élimination du stress, la glutaredoxine1 (GrxA) réduit le pont dissulfure entre la cystéine 199 et la cystéine 208. La glutaredoxine 1 fait partie du régulon OxyR avec la glutathione réductase et la thioredoxine C dont l'implication dans la réduction de OxyR est mineure (Imlay, 2013).

Chez *E. coli*, le régulon OxyR comprend une douzaine de gènes codant pour des protéines intervenant à plusieurs niveaux de la défense contre le peroxyde d'hydrogène. Pour diminuer la concentration en peroxyde d'hydrogène, OxyR induit la peroxydase AhpCF et la catalase KatG. Ensuite, plusieurs protéines permettent de contrôler l'homéostasie du fer comme la protéine de séquestration du fer Dps qui prend en charge le fer non incorporé, la protéine Fur qui inhibe l'import du fer, et la ferrochétalase qui synthétise des hèmes. En limitant le niveau de fer intracellulaire, la cellule réduit la quantité de radical hydroxyle produit et donc les dommages à l'ADN. Le système d'import MntH importe le manganèse qui va remplacer le fer en tant que cofacteur catalytique des enzymes métalliques. Enfin, le régulon OxyR induit la machinerie de biogenèse des centres FeS, SUF, qui permet l'assemblage des protéines à centre FeS lors d'une limitation en fer ou lors d'un stress au peroxyde d'hydrogène (Imlay, 2015).

VI. 2. SoxR

Le système SoxRS est activé par les composés redox actifs (Figure 14). Il est composé de SoxR, un senseur qui active la transcription d'un seul gène, *soxS*. Ce dernier code pour un régulateur transcriptionnel qui, à son tour, va activer l'expression d'une centaine de gènes. Parmi ces gènes on retrouve ceux codant pour des protéines impliquées dans la défense contre

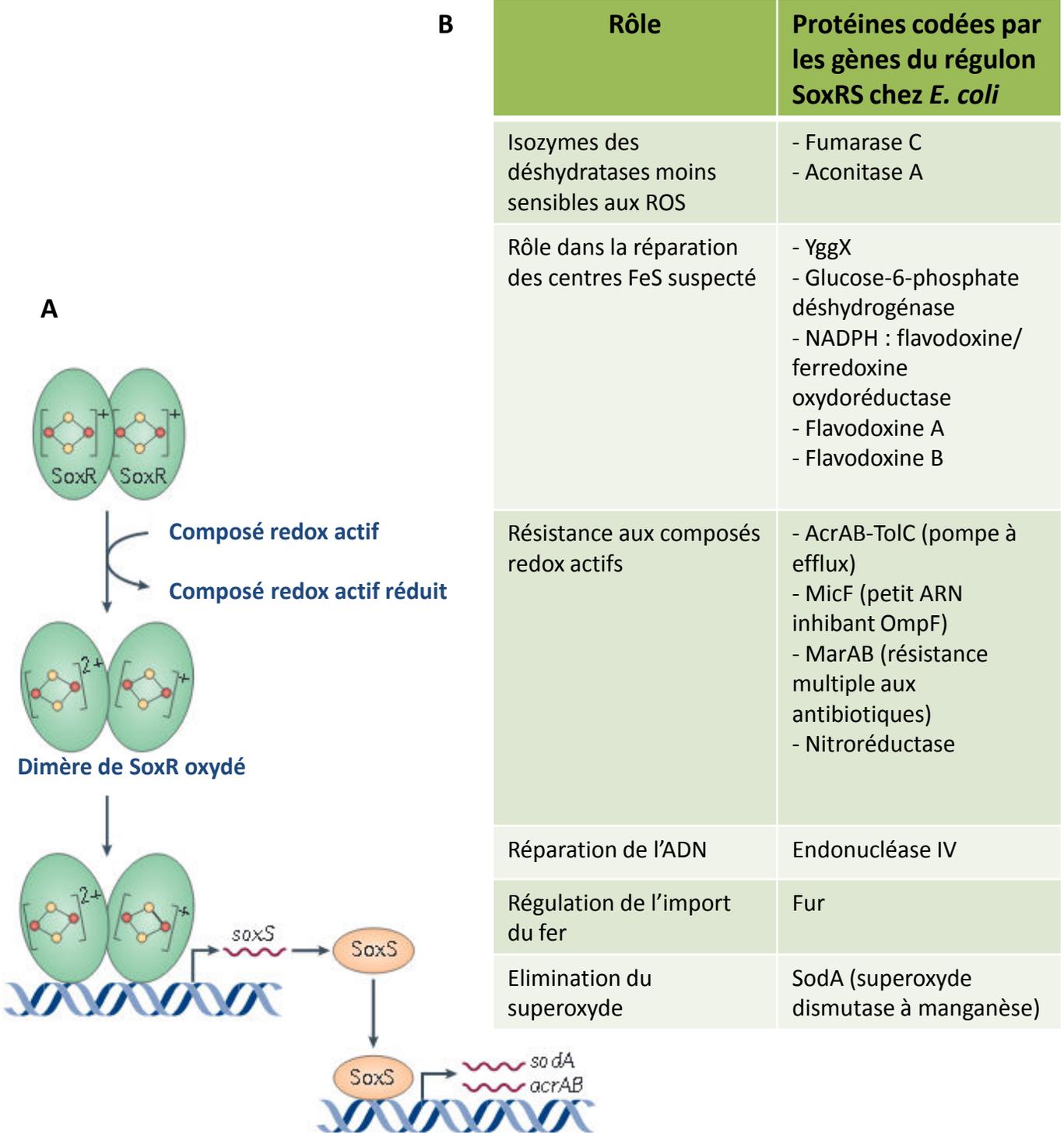


Figure 14 : Activation de SoxR par les composés redox actifs et les protéines codées par les gènes du régulon SoxRS.

(A) L'activation de SoxR se produit quand des composés redox actifs oxydent son centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$ en un centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$. L'oxydation entraîne un changement conformationnel permettant à SoxR d'activer la transcription du gène *soxS*. La protéine SoxS est un régulateur transcriptionnel qui active à son tour les membres du régulon SoxRS. (B) Les principales protéines codées par les gènes du régulon OxyR chez *E. coli* (d'après une revue d'Imlay, 2013).

le superoxyde, dans le maintien du ratio NADH/NAD^+ , et dans la défense contre les antibiotiques et les composés redox actifs. Le régulon SoxRS comprend la superoxyde dismutase à manganèse (SodA) qui permet d'éliminer le superoxyde intracellulaire, mais pas la superoxyde à fer (SodB). En effet, en présence d'oxygène, le Fe^{2+} de SodB est oxydé en Fe^{3+} qui est insoluble alors que le manganèse est stable en aérobie. SodB, assure un niveau basale d'élimination du superoxyde. Elle est produite en aérobie et en anaérobie alors que SodA est produit uniquement en aérobie comme moyen de défense quand le niveau de superoxyde est élevé. En présence de superoxyde, la synthèse des acides-aminés branchés, aromatiques et le cycle de Krebs sont très perturbés car les enzymes déshydratases à centre [4Fe-4S] sont déstabilisés par le superoxyde. Comme moyen de défense, SoxR active des gènes codant pour des déshydratases plus résistantes au superoxyde comme l'aconitase A (AcnA) qui remplace l'aconitase B, ou des gènes codant pour des enzymes sans centre FeS comme la fumarase C (FumC) qui va remplacer les fumarases A et B. La protéine YggX, impliquée dans la réparation des centres FeS, est également induite par le régulon SoxRS. D'autres protéines sont impliquées dans le maintien du ratio NADH/NAD^+ comme la glucose 6-phosphate déshydrogénase et la NADPH ferredoxine oxydoreductase. Une particularité du régulon SoxRS par rapport à OxyR réside en l'activation de nombreuses protéines impliquées dans la résistance aux antibiotiques. Certaines protéines font sortir les antibiotiques de la cellule comme celles formant la pompe à efflux AcrAB-TolC. D'autres protéines limitent l'entrée des antibiotiques comme WaaY, qui en modifiant le LPS réduit la perméabilité de l'enveloppe cellulaire. Le petit ARN antisens MicF participe également à la résistance aux antibiotiques en réprimant la synthèse d'OmpF, la porine de la membrane externe (Lee et al., 2009a) (Aiba et al., 1987). Enfin, certaines protéines modifient les antibiotiques comme NfsA, YgfZ et NfnB (Liochev et al., 1999) (Lin et al., 2010) (Imlay, 2013) (Imlay, 2015).

VI. 3. FuR

En plus de son rôle dans l'homéostasie du fer, le régulateur Fur régule la transcription d'acteurs importants pour le stress oxydant. En effet, Fur réprime l'expression de la superoxyde dismutase à manganèse SodA qui fait partie du régulon SoxRS, et bloque la synthèse de la machinerie de biogenèse des centres FeS, SUF, qui fait partie du régulon OxyR (Tardat and Touati, 1991). La désactivation de Fur par le stress oxydant ou une carence en fer entraîne la transcription de RyhB. Ce petit ARN non codant entraîne la dégradation de l'ARNm de la superoxyde dismutase à fer SodB (Massé and Gottesman, 2002). La régulation

par Fur inclut également l'induction de MntH qui est une protéine impliquée dans l'import du manganèse dans la cellule (Kehres et al., 2002). Les superoxydes dismutases sont donc régulées aussi en fonction du niveau de fer intracellulaire. L'expression de *fur* est induite par OxyR et SoxR (Zheng et al., 1999) (Imlay, 2013).

**La biogenèse des protéines à
centre FeS chez *E. coli***



Figure 15 : La structure du centres FeS.

Les centres FeS sont formés d'atomes de fer (en rouge) liés à des atomes de sulfures inorganiques (en jaune). Les centres FeS sont liés dans la majorité des cas à des atomes de sulfures de résidus cystéines (SR) appartenant à la chaîne polypeptidique de la protéine. L'atome de fer peut aussi être coordonné par une histidine, une arginine, un aspartate ou à une sérine. Les deux formes les plus rencontrées dans la cellule sont représentées : à gauche un centre [2Fe-2S] et à droite un centre [4Fe-4S] (d'après la revue de Py et Barras, 2010).

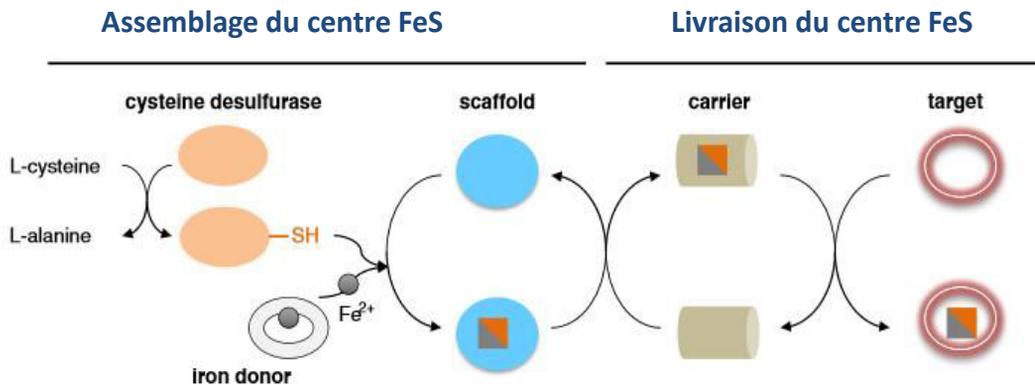


Figure 16 : Principe général de la biogenèse des centres FeS.

Le centre FeS (carré gris et orange) est assemblé sur une protéine d'échafaudage (en bleu) qui reçoit un atome de soufre d'une cystéine désulfurase (en rose) et un atome de fer (rond gris) d'une source encore non identifiée. Le centre FeS est ensuite transféré à une protéine de transport (en beige) qui délivre le centre FeS à l'apoprotéine cible (d'après la revue de Roche, 2013).

Introduction

Les protéines à centre FeS sont ubiquitaires et participent à de nombreuses fonctions cellulaires importantes comme la respiration, la photosynthèse, la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription, le métabolisme central ou encore la biosynthèse des acides aminés (Beinert, 2000) (Barras et al., 2005). Au sein des protéines, les centres FeS peuvent participer à la réaction catalytique, jouer un rôle structural ou servir de senseur (Kiley and Beinert, 2003) (Fontecave, 2006) (Py et al., 2011). *In vitro*, les atomes de Fe²⁺ et de S²⁻, peuvent s'assembler spontanément et former un centre FeS (Malkin and Rabinowitz, 1966). Cependant, la réaction est très lente et génère des centres FeS polymériques différents de ceux retrouvés dans la cellule. *In vivo*, des systèmes enzymatiques sont nécessaires pour effectuer l'assemblage des centres FeS et la maturation des protéines à centre FeS (Ayala-Castro et al., 2008) (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008) (Lill, 2009) (Roche et al., 2013). *E. coli* possède plus de 150 protéines à centre FeS (Estellon et al., 2014) (Barras et al., 2005). Leur groupe prosthétique peut prendre des tailles et des géométries différentes. Les plus couramment rencontrées sont les formes planes [2Fe-2S] et cubiques [4Fe-4S] (Figure 15). Dans la plupart des protéines, les centres FeS sont maintenus par des résidus cystéines ou plus rarement par des résidus histidines (Beinert, 2000).

L'assemblage des centres FeS comprend les étapes suivantes. Une cystéine désulfurase produit du soufre à partir de L-cystéine. Ce soufre est transféré sur une protéine d'échafaudage, sur laquelle est assemblé le centre FeS. L'acheminement du fer jusqu'à la protéine d'échafaudage est une étape encore mal caractérisée. Le centre FeS ainsi formé est transféré de la protéine d'échafaudage aux protéines de transport. Les protéines de transport assurent la livraison des centres FeS aux protéines cibles (Figure 16).

Trois systèmes multi protéiques de biogenèse des centres FeS ont été identifiés chez les bactéries. Le système NIF (pour nitrogen iron fixation), ISC (pour iron-sulfur cluster) et SUF (pour sulfur mobilization) (Rubio and Ludden, 2008) (Ayala-Castro et al., 2008) (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008) (Roche et al., 2013). Les eucaryotes possèdent une autre machinerie, appelée CIA (pour cytosolic iron sulfur assembly), qui n'a pas d'équivalent procaryote (Sharma et al., 2010) (Netz et al., 2014). Le système NIF est spécifique de la maturation des nitrogénases, et les système ISC et SUF sont des systèmes généraux maturant l'ensemble des protéines à centre FeS. Les machineries ISC et SUF sont présentes chez *E. coli*, et ne sont pas de simples duplications l'une de l'autre. Ainsi, durant l'évolution,

plusieurs solutions ont été sélectionnées de façon à subvenir aux besoins en centres FeS de différents organismes.

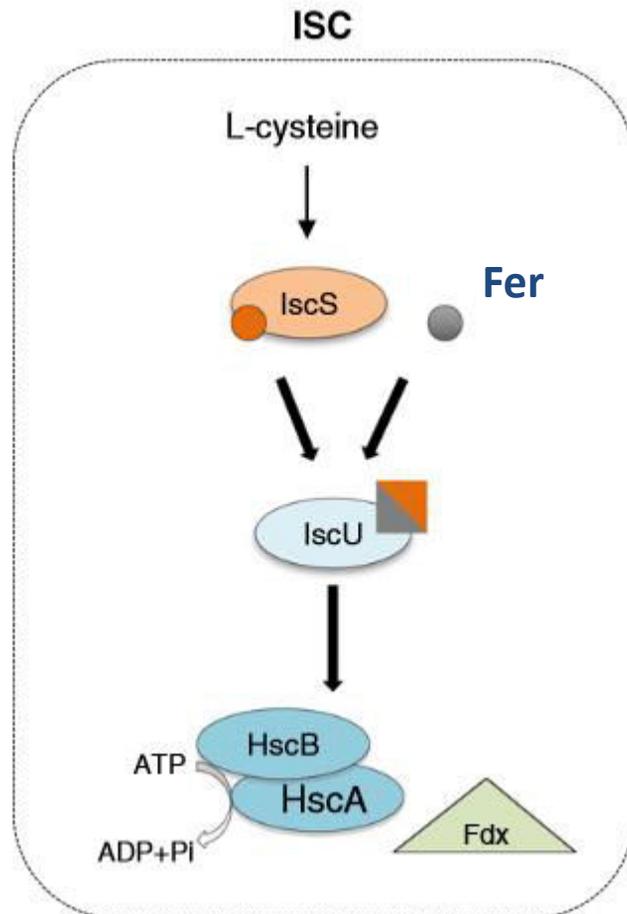


Figure 17 : L'assemblage des centres FeS par la machinerie ISC chez *E. coli*.

L'assemblage du centre FeS (carré gris et orange) est effectué sur la protéine d'échafaudage IscU. L'atome de soufre provient de la cystéine désulfurase IscS et l'atome de fer provient d'une source encore inconnue. Le relargage du centre FeS est catalysé par le duo co-chaperonne/chaperonne HscB et HscA. Le rôle de la protéine Fdx est un sujet de discussion (d'après la revue de Roche et al, 2013).

I. Le système ISC

Les composants du système ISC sont codés par les gènes de l'opéron *iscRSUA-hscBA-fdx-iscX*. IscR est un régulateur transcriptionnel, IscS une cystéine désulfurase, IscU une protéine d'échafaudage, IscA un transporteur, HscB et HscA des chaperonnes, Fdx une ferredoxine, et IscX un composé dont le rôle est encore mal caractérisé (Blanc et al., 2015). La machinerie ISC est retrouvée chez un grand nombre de procaryotes, et une machinerie homologue eucaryote est présente dans les mitochondries (Lill, 2009) (Figure 17).

I. 1. La cystéine désulfurase IscS

La cystéine désulfurase IscS est une enzyme de 45 kDa ayant comme cofacteur un dérivé de la vitamine B6, le phosphate de pyridoxal (PLP). IscS catalyse la transformation de la cystéine en alanine et stocke le soufre libéré sous forme d'un persulfure (Mihara et al., 2000) (Figure 18). Sous cette forme l'atome de soufre est mobilisable et non toxique. L'atome de soufre est lié au résidu cystéine catalytique (Cys 328) de la protéine IscS jusqu'à son transfert sur la protéine d'échafaudage IscU (Smith et al., 2001) (Urbina et al., 2001). Les protéines IscS et IscU forment un complexe dans lequel on trouve aussi la protéine CyaY (décrite ci dessous) (Shi et al., 2010). L'analyse de la structure cristallographique de IscS, a révélé que la cystéine catalytique 328 est localisée dans une boucle partiellement ordonnée (Cupp-Vickery et al., 2003). Au sein du complexe IscS-IscU, la cystéine catalytique de IscS est éloignée des trois cystéines de coordination du centre FeS de la protéine IscU (Cys 37, Cys 63 et Cys 106), suggérant qu'un mouvement de la boucle catalytique de la protéine IscS est requis lors du transfert du soufre vers IscU (Shi et al., 2010). En plus de son rôle dans la biogenèse des centres FeS, IscS fournit aussi du soufre à d'autres voies de biosynthèse comme pour la biosynthèse de la thiamine, la synthèse du cofacteur à molybdène ou la thiolation des ARNt (Mueller, 2006). IcsS a donc un rôle pléiotropique dans la cellule.

I. 2. La protéine d'échafaudage IscU

La protéine d'échafaudage IscU interagit avec la cystéine désulfurase IscS. IscU reçoit le soufre et le fer, et fournit un environnement favorable à l'assemblage du centre FeS, *in vivo* et *in vitro* (Agar et al., 2000) (Raulfs et al., 2008).

La protéine IscU possède trois résidus cystéines nécessaires à la fixation du centre FeS, l'identité du quatrième ligand du centre FeS est encore incertaine, mais il pourrait s'agir de l'histidine 105 (Ramelot et al., 2004). IscU existe principalement sous forme de dimère (Agar et al., 2000). *In vitro*, IscU reconstitue forme des centres FeS d'une manière séquentielle ;

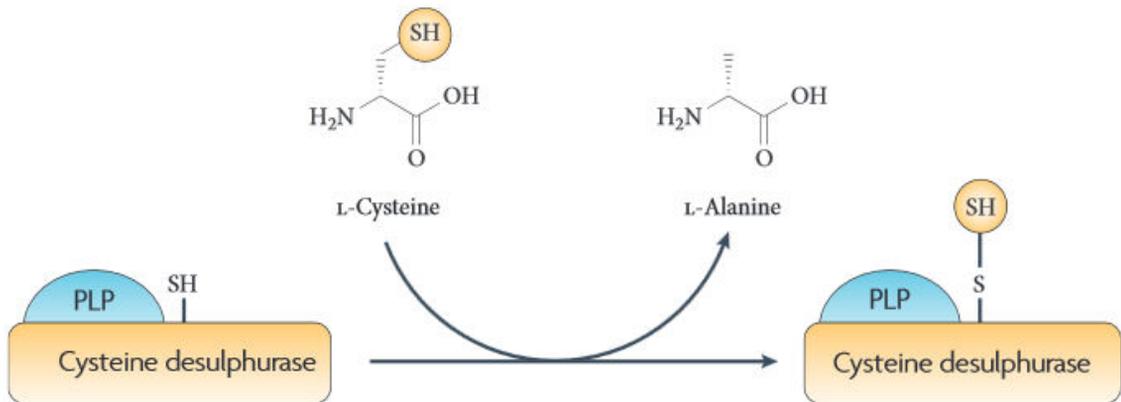


Figure 18 : La source du soufre pour la formation du centre FeS chez *E. coli*.

Les atomes de soufre pour l'assemblage des centres FeS proviennent de la cystéine désulfurase ayant comme cofacteur du phosphate de pyridoxal (PLP). La cystéine désulfurase catalyse la conversion d'une L-cytéine en L-alanine. Le site catalytique de la cystéine désulfurase contient une cystéine catalytique conservée (Cys328 pour IscS et Cys364 pour SufS) à qui est transféré l'atome de soufre pour générer un intermédiaire persulfide (SSH). L'atome de soufre sur IscS est transféré directement à la protéine d'échafaudage dans le cas de IscS. Dans le cas de la machinerie SUF, l'atome de soufre est transféré à la cystéine 51 de la protéine SufE avant d'être transféré à la protéine d'échafaudage (d'après la revue de Py et Barras, 2010).

d'abord un centre [2Fe-2S] sur un des monomères du dimère de IscU, puis un centre [2Fe-2S] sur chacun des monomères, et enfin un centre [4Fe-4S] par dimère. Ces différentes formes de holo-IscU sont en équilibre, la forme contenant un centre [2Fe-2S] pourrait être celle utilisée *in vivo*. La protéine IscU existe sous deux conformations qui sont interconvertibles, une forme désordonnée (D) qui correspond à la forme apo, et une forme structurée (S) étant la forme holo (Kim et al., 2009). Ceci suggère que des changements conformationnel ont lieu durant l'étape d'assemblage et après le transfert du centre FeS de IscU, et qu'ils pourraient influencer les interactions de IscU avec ses différents partenaires (Kim et al., 2012) (Markley et al., 2013) (Yan et al., 2014).

I. 3. Le système co-chaperonne/chaperonne HscB/HscA

Les protéines HscB et HscA forment un duo co-chaperonne/chaperonne dont la fonction est spécifiquement dédiée à la biogenèse des centres FeS, en facilitant le relargage du centre FeS assemblé sur IscU (Chandramouli and Johnson, 2006). HscA (66 kDa) est un membre de la famille des protéines « heat shock » Hsp70, dont le membre le plus connu chez *E. coli* est DnaK qui participe au repliement et à l'assemblage des protéines (Kampinga and Craig, 2010). Les propriétés biochimiques de HscA, comme son activité ATPase et sa capacité à lier un peptide sont similaires à celles des protéines de la famille Hsp70 (Hoff et al., 2000) (Genevaux et al., 2007) (Vickery and Cupp-Vickery, 2007). Cependant, le seul substrat de HscA est IscU, qu'elle reconnaît grâce au motif conservé LPPVK présent sur la protéine d'échafaudage. HscB (20 kDa) est un membre de la famille des co-chaperonnes de type-J à laquelle appartient DnaJ (Genevaux et al., 2007). Dans le modèle de fonctionnement du duo HscA/HscB, HscB interagit avec IscU, *via* des résidus hydrophobes, et stabilise l'interaction IscU/HscA en stimulant l'activité ATPase de HscA (Vickery and Cupp-Vickery, 2007) (Fuzery et al., 2008) (Fuzery et al., 2011). L'hydrolyse de l'ATP a lieu en présence d'une apo protéine, et s'accompagne de la libération du centre FeS de IscU, suite à la conversion de IscU d'une forme de forte affinité (S) pour le centre FeS en une forme de faible affinité (D). Le remplacement spontané de l'ADP par l'ATP, fixé sur HscA, permet la libération d'IscU.

I. 4. La ferredoxine Fdx

La ferredoxine est une protéine de 12 kDa possédant quatre résidus cystéines (C42, C48, C51, C87) capables de lier de façon stable un centre [2Fe-2S]. Fdx interagit directement avec la protéine IscS, et la ferredoxine a été proposée pour fournir les deux électrons nécessaires dans l'étape de réduction du persulfure formé sur IscS (Lange et al., 2000). *In vitro*, Fdx peut

également fournir les électrons nécessaires lors de la conversion des deux centres [2Fe-2S] de IscU, en un centre [4Fe-4S] (Chandramouli et al., 2007). Fdx interagit aussi avec HscA et IscA, suggérant qu'en plus d'intervenir dans l'étape de transfert de soufre et à l'étape d'assemblage du centre FeS, Fdx pourrait participer à l'étape de transfert du centre FeS (Tokumoto et al., 2002) (Ollagnier-de-Choudens et al., 2001).

I. 5. La protéine de transport IscA

La protéine IscA est une petite protéine de 12 kDa capable de fixer un centre [2Fe-2S] ou [4Fe-4S]. Après reconstitution *in vitro*, les analyses biochimiques et spectroscopiques indiquent que la forme holo de IscA est un dimère, qu'il y a un seul centre FeS par dimère, et que le centre FeS est entièrement ligandé par des cystéines (Ollagnier-de-Choudens et al., 2001) (Krebs et al., 2001). IscA possédant seulement trois cystéines conservées (Cys 35, 99 et 101), il a donc été proposé que le centre FeS est à l'interface du dimère de IscA et qu'il est ligandé par des cystéines des deux monomères. Le motif formé par les trois cystéines, CX₆₃₋₆₅CXC, est typique de IscA et des autres protéines de la famille de protéines appelées ATC (A-Type Carrier). IscA possède également la capacité de fixer le fer avec une forte affinité (Ding et Clark, 2004). Suivant ces différentes caractéristiques biochimiques, plusieurs rôles ont été attribués à IscA, protéine d'échafaudage, protéine de transport et donneur de fer. Des approches génétiques et biochimiques ont permis de rejeter l'hypothèse de IscA comme protéine d'assemblage et de valider le rôle de IscA en tant que protéine de transfert (Tokumoto and Takahashi, 2001) (Lu et al., 2008) (Vinella et al., 2009) (Vinella et al., 2013). Quant à son rôle comme donneur de fer, cette possibilité est encore en débat.

I. 6. La protéine CyaY

La protéine CyaY est l'homologue bactérien de la frataxine eucaryote (Adinolfi et al., 2009). Chez l'homme, une déficience en frataxine cause de nombreuses perturbations métaboliques et est responsable de l'ataxie de Friedrich, une maladie neurodégénérative (Pastore and Puccio, 2013). A l'inverse, chez *E. coli*, les premières études du mutant *cyaY* n'ont pas mis en évidence de phénotypes, et les baisses d'activité des enzymes à centre FeS sont faibles, comparées à celles observées dans les mutants *isc* (Li et al., 1999) (Pohl et al., 2007). De plus, le gène *cyaY* ne fait pas partie de l'opéron *isc*. Pour ces raisons, l'implication de CyaY dans la biogénèse des centres FeS n'allait pas de soi chez *E. coli*. Cependant, CyaY interagit avec le complexe IscS/IscU et, *in vitro*, CyaY inhibe la formation du FeS sur IscU, indiquant que CyaY avait un lien avec la machinerie ISC (Adinolfi et al., 2009) (Shi et al., 2010) (Iannuzzi

et al., 2011). Récemment, une étude a montré que, *in vivo*, CyaY est bel et bien un acteur de la machinerie ISC (Roche et al., 2015a). La raison de la différence d'impact entre les phénotypes liés à l'absence de CyaY/frataxine chez les procaryotes et les eucaryotes a été élucidée. En effet, CyaY est rendu essentiel en remplaçant le résidu isoleucine 108 par un résidu méthionine – la méthionine étant habituellement retrouvée à cette position dans les IscU eucaryotes (Roche et al., 2015b). Ainsi, le degré d'importance de CyaY pour de la machinerie ISC est dicté par IscU. Il a été proposé que le rôle de CyaY est d'agir sur le complexe IscS/IscU afin de diriger le flux de soufre vers la biogénèse des centres FeS.

I. 7. La protéine IscX

IscX est une protéine de 7,7 kDa, dont le gène correspondant est le dernier gène de l'opéron *isc*. IscX interagit avec IscS et a été montrée récemment pour moduler l'activité cystéine désulfurase de IscS, et interagir avec IscU (Tokumoto et al., 2002) (Kim et al., 2014). Ces caractéristiques ainsi que la capacité de IscX à fixer du fer, font de IscX une protéine qui ressemble à CyaY. Récemment, une étude *in vivo* a montré le rôle positif de IscX dans la biogénèse des centres FeS, ainsi qu'une interaction génétique entre *iscX* et *cyaY* (Roche et al., 2014). Il a donc été proposé que IscX et CyaY puisse exercer le même rôle au sein de la machinerie ISC (Roche et al., 2015a).

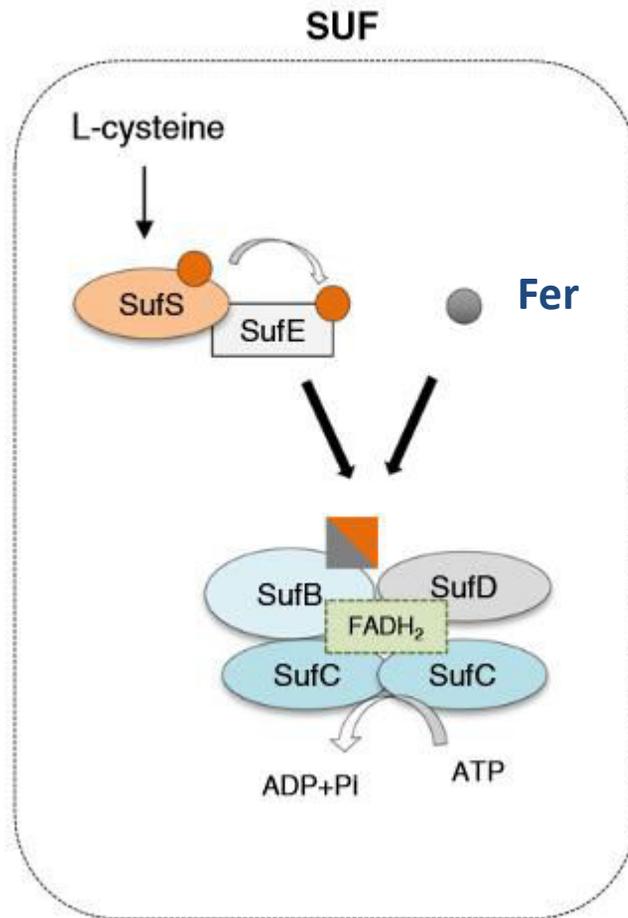


Figure 19 : L'assemblage des centres FeS par la machinerie SUF chez *E. coli*.

L'assemblage du centre FeS (carré gris et orange) est effectué sur la protéine d'échafaudage SufB qui forme un complexe avec les protéines SufC et SufD. Le complexe SufBC₂D fixe une molécule de FADH₂ qui fournirait une source d'électrons mais son rôle dans l'assemblage du centre FeS est encore inconnu. L'atome de soufre provient de la cystéine désulfurase SufS qui le transfère à la protéine d'échafaudage par l'intermédiaire de la protéine SufE. L'atome de fer provient d'une source encore inconnue (d'après la revue de Roche, 2013).

II. Le système SUF

La machinerie SUF est codée par l'opéron *sufABCDSE*. Elle est formée par deux sous-complexes protéiques, le complexe SufSE qui a une activité cystéine désulfurase, et le complexe SufBCD qui permet l'assemblage du centre FeS. La protéine SufA est la protéine de transport. Une machinerie homologue à la machinerie SUF procaryote est retrouvée chez les eucaryotes où elle est localisée dans les chloroplastes (Figure 19) (Balk and Schaedler, 2014).

II. 1. Le complexe cystéine désulfurase SufSE

Le complexe SufSE a un rôle de donneur de soufre pour l'assemblage du centre FeS. La protéine SufS est l'homologue d'IscS. C'est une cystéine désulfurase qui mobilise le soufre à partir de L-cystéine (Mihara et al., 2000). En interagissant avec IscS, SufE augmente l'activité de cystéine désulfurase et reçoit, sur la cystéine 51, le persulfure de IscS (Loiseau et al., 2003) (Outten et al., 2003). A la différence de IscS, SufS fournit du soufre uniquement à la biogenèse des centres FeS et ne serait pas impliquée dans la biosynthèse d'autres molécules soufrées. De façon intéressante, la structure tridimensionnelle de SufE est similaire à celle de IscU, mais SufE ne possède pas les caractéristiques nécessaires à la liaison d'un centre FeS (Goldsmith-Fischman et al., 2004). L'activité cystéine désulfurase du complexe SufSE a été montrée, *in vitro*, pour être aussi stimulée par la présence du complexe SufBCD (Outten et al., 2003) (Layer et al., 2007).

II. 2. Le complexe d'échafaudage SufBCD

Le complexe SufBCD peut lier et transférer un centre FeS. Il n'a aucune ressemblance structurale avec des composants de la machinerie ISC mais ressemble aux transporteurs de type ABC. SufB reçoit le soufre et assemble le centre FeS dont on ignore comment il est ligandé (Layer et al., 2007) (Wollers et al., 2010) (Chahal et al., 2009). La protéine SufC est une ATPase homologue au domaine d'hydrolyse du nucléotide des protéines de la famille des transporteurs de type ABC (ATP-Binding Casette). La protéine SufD est un paralogue de SufB et pourrait être nécessaire à l'interaction entre SufB et le complexe SufSE. Des études *in vitro* ont montré que le complexe SufBCD existe majoritairement sous une forme SufBC₂D, mais d'autres formes du complexe comme la forme SufB₂C₂ qui est plus efficace pour assembler le centre FeS. Le complexe SufB₂C₂ possède la particularité de lier une molécule de FADH₂ qui servirait de donneur d'électrons pour mobiliser le fer ferrique, source de fer pour la formation du centre FeS (Wollers et al., 2010).

II. 3. La protéine de transport SufA

La protéine SufA est homologue à IscA et contient également le motif typique des ATC. Un des arguments en faveur du rôle des ATC comme transporteur de centre FeS vient du fait que SufA isolée d'extraits cellulaires fixe un centre [2Fe-2S].

III. Autres protéines de transport des centres FeS

Chez *E. coli* il existe des gènes localisés en dehors de l'opéron *isc* et *suf* codant pour d'autres protéines de transport des centres FeS. Parmi ces protéines on retrouve ErpA et NfuA (Vinella et al., 2009) (Angelini et al., 2008) (Py et al., 2012).

III. 1. ErpA, une troisième ATC

ErpA est une protéine qui contient le motif typique des transporteurs ATCs. Elle est capable de lier un centre [2Fe-2] ou [4Fe-4S]. Elle est donc, avec IscA et SufA, la troisième ATC. Des études phylogénomiques ont montré que les ATCs ont émergées dans le dernier ancêtre commun des bactéries (Vinella et al., 2009). La plupart des organismes possèdent plus d'une ATC. Chez *E. coli*, les trois ATCs sont biochimiquement interchangeables, mais pas entièrement redondante *in vivo* (Loiseau et al., 2007) (Pinske and Sawers, 2012a) (Pinske and Sawers, 2012b). Par exemple, une mutation du gène *erpA* est létale en aérobie, mais pas en anaérobie, tant que le gène *iscA* est présent. Aussi, le double mutant *iscA sufA* est létal en aérobie mais pas en anaérobie, tant que le gène *erpA* est présent. Ces études ont permis de montrer que la route utilisée par le centre FeS pour aller de la protéine d'échafaudage à la protéine cible dépend des conditions environnementales. La route empruntée par le centre FeS dépend aussi de la protéine cible. En effet, parmi les différentes voies de maturation de IscR, il y en a une spécifique à IscR qui ne nécessite pas la présence d'une ATC (Vinella et al., 2013).

III. 2. NfuA, une ATC atypique

La protéine NfuA est une ATC atypique car elle résulte de la fusion entre un domaine ATC dégénéré et un domaine Nfu (Angelini et al., 2008) (Py et al., 2012). Le domaine ATC est dit dégénéré car il est similaire à celui d'un ATC, mais il ne possède pas les cystéines du motif CX₆₃₋₆₅CXC. Le domaine Nfu contient un domaine avec le motif CXXC requis pour fixer le centre [4Fe-4S] de NfuA. NfuA est capable de recevoir un centre FeS des protéines d'échafaudage des machineries ISC et SUF, et de le transférer aux protéines cibles. Il a donc été proposé que NfuA intervienne à l'étape de livraison des centres FeS. NfuA est requis en

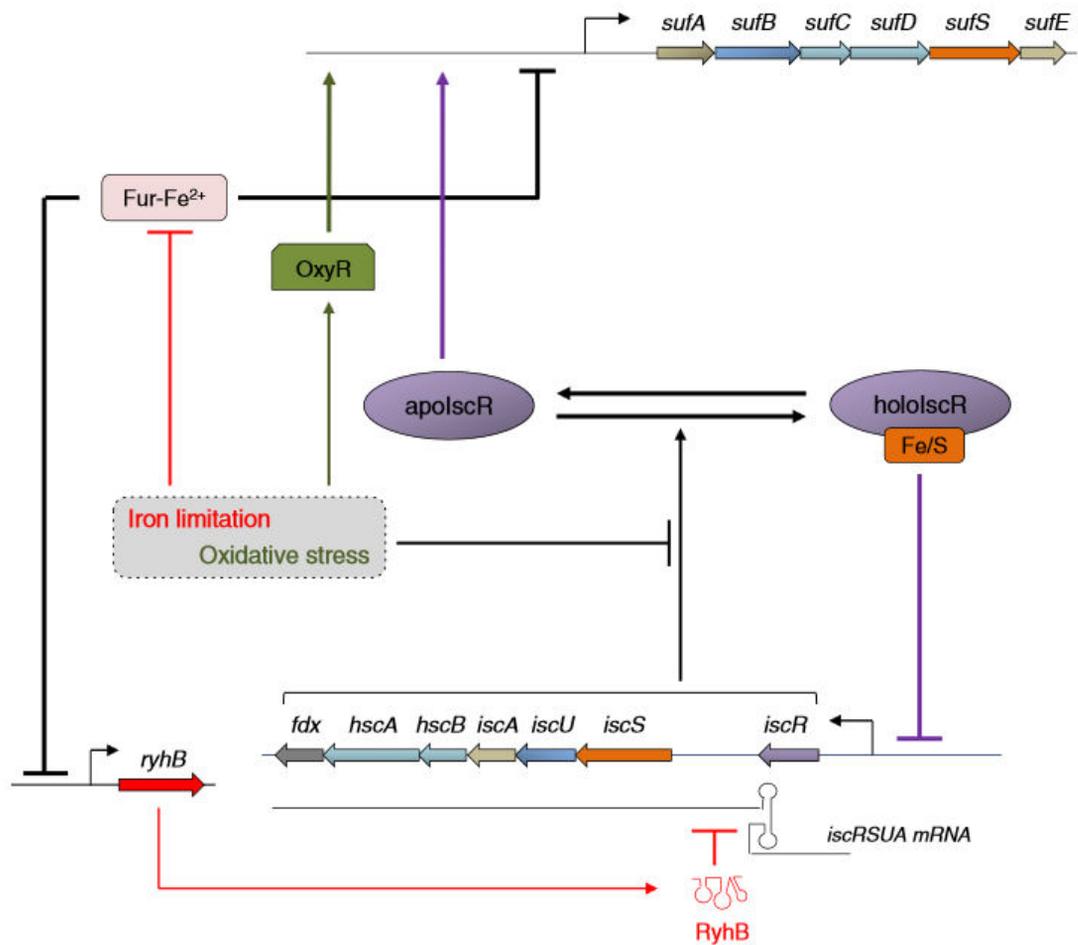


Figure 20 : La régulation de l'homéostasie des centres FeS chez *E. coli*.

L'opéron *suf* est représenté en haut du schéma et l'opéron *isc* en bas du schéma. L'expression de l'opéron *suf* est sous le contrôle des régulateurs Fur, OxyR et IscR. L'expression de l'opéron *isc* est sous le contrôle du régulateur IscR et du petit ARN non codant, RyhB. Dans des conditions normales de croissance, le régulateur IscR est mûré par la machinerie ISC et réprime l'expression de l'opéron *isc*. Dans ces conditions *ryhB* n'est pas exprimé. En carence en fer, l'opéron *suf* est activé par la levée de la répression par Fur et par l'activation par apo-IscR. L'activation par apo-IscR est possible car l'expression de *ryhB* en carence en fer entraîne la dégradation de l'ARNm de *iscSUA*. En absence de la machinerie ISC, la protéine IscR est sous forme apo. En conditions de stress oxydant, OxyR et apoIscR activent l'opéron *suf*. En conditions de stress oxydant IscR est sous forme apo car le système ISC n'est pas fonctionnel (d'après la revue de Roche, 2013).

conditions de stress, et suivant la protéine cible NfuA intervient aussi en condition normale de croissance. Ceci illustre de nouveau la plasticité des routes de transport du centre FeS.

IV. Régulation des systèmes ISC et SUF

Le seul régulateur transcriptionnel connu de l'opéron *isc* est IscR qui, sous forme holo, réprime l'expression de l'opéron *isc* (Figure 20). Son fonctionnement est détaillé dans le chapitre suivant (partie II) (Schwartz et al., 2001) (Mettert and Kiley, 2015). IscR sent la capacité de la cellule à produire suffisamment de centre FeS pour en assurer la demande. Un niveau bas en holo-IscR traduit un besoin en centre FeS, ce qui est corrigé par la dérégulation de l'opéron *isc*. Différentes conditions causent une demande accrue en centre FeS, comme un stress oxydant et une carence en fer. Dans ces conditions l'opéron *isc* est induit. Cependant, en cas de carence en fer, se surimpose la régulation par le petit ARN non codant, RyhB, qui entraîne la dégradation partielle de l'ARNm polycistronique *iscRSUA*. La régulation de l'opéron *suf* dépend de trois facteurs de transcription, OxyR, IscR, et Fur (Nachin et al., 2001) (Outten et al., 2004) (Lee et al., 2004) (Yeo et al., 2006) (Mettert and Kiley, 2015). OxyR est un senseur du peroxyde d'hydrogène, et active l'opéron *suf* en stress oxydant (voir chapitre stress oxydant). L'induction par OxyR de l'expression au niveau du promoteur P_{sufA} requiert la protéine IHF (intégration host factor). IHF est une petite protéine basique qui appartient à la famille des protéines histone-like, responsables de la compaction de l'ADN dans les cellules bactériennes. La liaison d'IHF à l'ADN est nécessaire pour rapprocher le site de fixation de la protéine OxyR du site de fixation de l'ARN polymérase. En effet le site de fixation de OxyR - situé entre les positions -236 et -196 par rapport au +1 de transcription - est éloigné du site de fixation de l'ARN polymérase.

IscR a un rôle majeur dans l'induction des gènes de l'opéron *suf* en réponse à un stress oxydant et à la carence en fer. Cette régulation ne requiert pas la forme holo-IscR comme celle de l'opéron *isc*. En effet, le site de fixation de IscR - situé entre les positions -56 et -35 par rapport au site de démarrage de la transcription- est un site de type 2, sur lequel se fixe les deux formes de IscR, holo et apo.

De façon intéressante, le site de fixation de IscR est chevauchant avec celui de Fur – centré entre les éléments -10 et -35 du promoteur. En condition normale de croissance, Fur ayant une affinité plus grande, qu'IscR, pour P_{sufA} , Fur agit comme anti activateur en bloquant IscR, en plus d'empêcher la reconnaissance par l'ARN polymérase. Les stress qui inactivent Fur affectent aussi la biogénèse des centres FeS, il en résulte une accumulation d'apo-IscR qui peut alors activer la transcription des gènes *suf*.

V. La biogenèse des protéines à centre FeS en conditions de stress

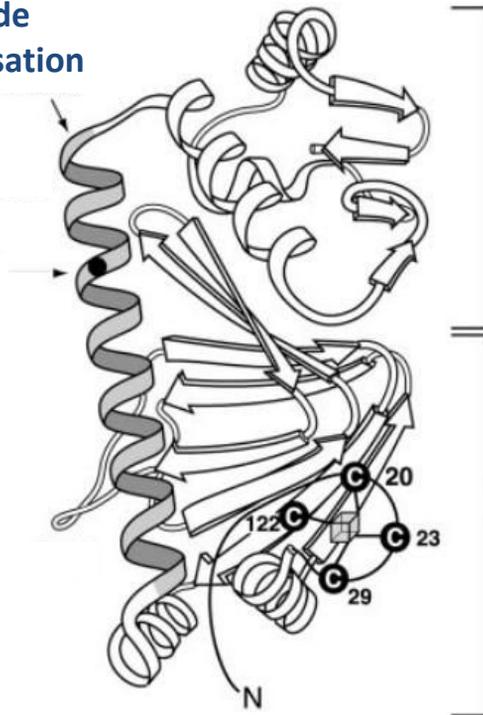
La conservation de deux systèmes de biogenèse des centres FeS chez *E. coli* suggérait qu'ils puissent être utilisés dans des conditions différentes. Les différentes stratégies de régulation contrôlant l'expression des opérons *isc* et *suf* ont confirmé cette hypothèse, avec la transcription des gènes *suf* maintenue à un niveau très bas en condition normale de croissance. De façon cohérente, l'analyse des mutants *isc* et *suf* a montré que la machinerie ISC est utilisée pendant des conditions normales de croissance, alors que la machinerie SUF est adaptée à des conditions de croissance en stress comme une carence en fer ou un stress oxydant. L'opéron *suf* a d'ailleurs été identifié chez *E. coli* lors d'un screen en carence en fer visant à chercher les facteurs intervenant dans la stabilité de la réductase à centre FeS, FhuF, impliquée dans l'utilisation de la ferrioxamine B et de l'acide rhodotorulic comme source de fer (Patzner and Hantke, 1999). Le défaut de croissance des mutants *suf* en carence en fer n'est pas seulement causé par la perte de l'activité de la protéine FhuF, mais serait aussi le résultat d'un problème plus général. Par exemple, l'activité de la glucose 6-phosphogluconate déshydrogénase est également réduite dans un mutant *suf* pendant une carence en fer. La croissance des mutants *suf* d'*Erwinia chrysanthemi* est aussi affectée en conditions limitantes en fer, et ils sont également affectés dans l'utilisation de sidérophores (Nachin et al., 2003) (Outten et al., 2004). En absence de la machinerie SUF, *Erwinia chrysanthemi* est hypersensible au phénazine méthosulfate, un générateur de stress superoxyde (Nachin et al., 2001). Dans le mutant Hpx d'*E. coli*, chez lequel la concentration intracellulaire de peroxyde d'hydrogène est élevée, en absence des gènes *suf*, l'activité des déshydrogénases à centre FeS est drastiquement réduite (Jang and Imlay, 2010). Compte tenu des stress imposés à la bactérie dans les systèmes hôte/pathogène, il n'est pas étonnant que la machinerie SUF ait été montrée pour jouer un rôle clé dans la virulence de pathogènes comme *Erwinia chrysanthemi* et *Mycobacterium tuberculosis* (Nachin et al., 2001) (Huet et al., 2005).

En conditions de carence en fer la cellule passe de l'utilisation de la machinerie ISC à celle de SUF, plutôt que d'accumuler les deux. Une hypothèse est que la machinerie SUF est plus efficace pour acquérir le fer que la machinerie ISC. En conditions de stress oxydant les deux machineries sont présentes mais la machinerie ISC serait empoisonnée par les formes réactives de l'oxygène. De façon intéressante, il a été montré que l'étape d'acquisition du soufre par le complexe SufSE est plus résistante au peroxyde d'hydrogène que celle impliquant IscS (Dai and Outten, 2012). Plus récemment, le centre [2Fe-2S] de SufB a été montré pour être plus stable que le centre [2Fe-2S] de IscU, en présence de peroxyde

d'hydrogène, d'oxygène et de chélateur de fer (Blanc et al., 2014). Plusieurs protéines SUF, intervenant à différentes étapes de la biogénèse des centres FeS, auraient donc des caractéristiques leur permettant de fonctionner en conditions de stress. Une possibilité est que, dans les composés SUF, les réactions aient lieu dans un contexte protéique moins accessible aux formes réactives de l'oxygène que dans les composés ISC.

Les régulateurs transcriptionnels à centre FeS chez *E. coli*

Hélice de dimérisation



Domaine C-terminal de liaison à l'ADN

Domaine N-terminal de fixation du centre FeS

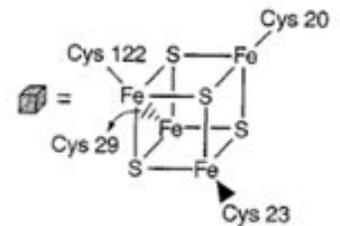


Figure 21 : Les différents domaines de la protéine FNR et son centre [4Fe-4S]. Le domaine N-terminal est composé de 29 acides aminés et contient trois des quatre résidus formant le centre [4Fe-4S] (cys 20, cys 23 et cys 29). La cystéine 122 sert à la liaison entre le centre [4Fe-4S] et le reste de la protéine. Le domaine C-terminal permet la liaison à l'ADN. L'hélice de dimérisation permet de lier deux monomères de FNR. La représentation a été effectuée en se basant sur la protéine CRP. Le centre FeS est représenté en détail sur la droite (d'après Moore et Kiley, 2001).

Les protéines à centre FeS qui régulent l'expression des gènes sont répandues dans le monde vivant. La réactivité chimique de leur co-facteur en font d'excellents candidats pour sentir les signaux environnementaux et générer une réponse adaptative. *E. coli* possède quatre types différents de régulateurs transcriptionnels à centre FeS, FNR, IscR, NsrR et SoxR. Un cinquième régulateur à centre FeS a été identifié chez *E. coli*. Le régulateur YeiL, homologue à CRP et FNR est peu caractérisé et ne sera pas abordé dans ce chapitre (Anjum et al., 2000).

I. FNR

Le gène codant pour FNR a été mis en évidence en 1970 par John Guest et ses collaborateurs lors de la caractérisation de mutants incapables de réduire le nitrate et le fumarate. Cette caractéristique lui a donné son nom, FNR pour « fumarate and nitrate reduction ». *E. coli* adapte son métabolisme en fonction des accepteurs terminaux d'électrons qui sont disponibles. La molécule d'oxygène est l'accepteur terminal d'électron préférentiel et lorsqu'il est présent, les autres types de respiration cellulaire sont réprimés. En absence d'oxygène, la respiration anaérobie se met en place et d'autres accepteurs terminaux d'électron sont utilisés. FNR est un senseur de l'oxygène et un régulateur global de l'expression des gènes du métabolisme anaérobie. L'activation de FNR est provoquée par des conditions limitantes en oxygène et permet à la cellule d'utiliser la respiration anaérobie. FNR est largement distribuée chez les protéobactéries et les bacilles, et le cœur du régulon FNR est conservé parmi les bactéries anaérobies facultatives (Mettert and Kiley, 2015).

I. 1. La protéine FNR : ses caractéristiques et son mécanisme de régulation

FNR est une protéine de 30 kDa largement distribuée chez les protéobactéries. Elle fait partie de la famille CRP (cAMP receptor protein) (Matsui et al., 2013). Elle comporte deux domaines protéiques. Le premier domaine en, C-terminal, contient une hélice de liaison à l'ADN. Le deuxième domaine, en N-terminal, est capable de lier un centre [4Fe-4S] et [2Fe-2S]. Le centre FeS est relié à quatre ligands cystéines en position 20, 23, 29 et 122 qui sont essentiels à l'activité de la protéine (Figure 21) (Kiley and Beinert, 1998). La capacité de FNR à agir comme un activateur transcriptionnel dépend de l'intégrité de son centre [4Fe-4S] puisque celui-ci permet la dimérisation de FNR nécessaire à la fixation à l'ADN de façon sites spécifiques.

Sur l'ADN, le site de fixation de FNR est une séquence palindromique conservée de 22 pb.

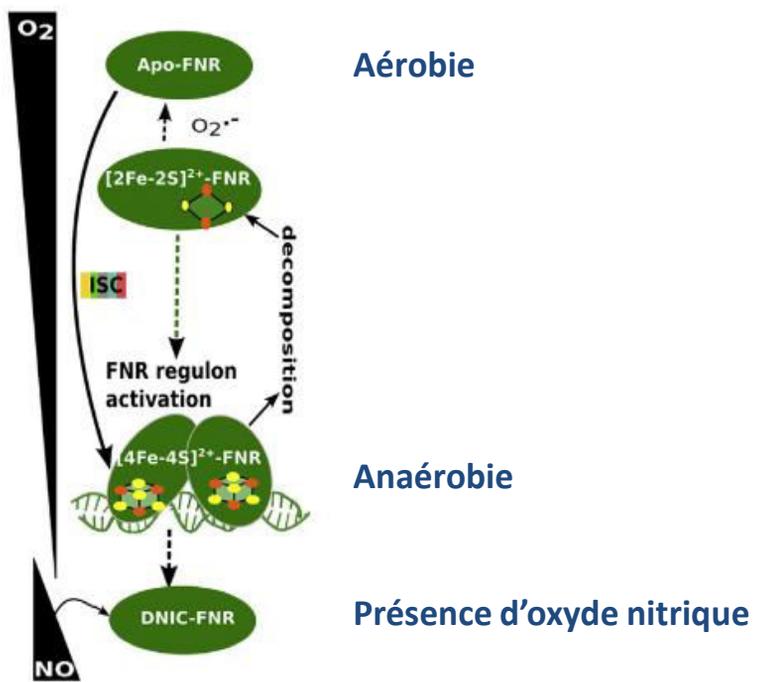


Figure 22 : Modèle de régulation par la protéine FNR.

En anaérobie, FNR est sous forme $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ce qui entraîne sa dimérisation et sa fixation à l'ADN. En aérobie, le centre FeS de FNR est oxydé ce qui transforme le centre FeS en $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$. L'oxydation du centre $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ par le superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), entraîne la perte du centre FeS et la formation de la forme apo-FNR. La réaction du NO avec la protéine FNR entraîne la formation d'un complexe dinitrosyl-fer-cystéine (DNIC) (d'après Santos, 2015).

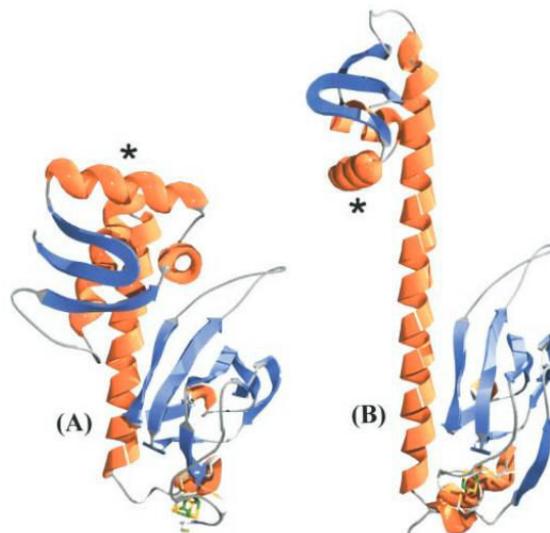


Figure 23 : Modèle représentant la structure de FNR lié à l'ADN ou non lié à l'ADN.

La modélisation de FNR a été effectuée en utilisant la protéine CRP comme modèle. Le signe * représente la face de liaison à l'ADN. Le centre FeS est représenté en jaune et vert. (A) Quand FNR est sous forme $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, une interaction entre le domaine C-terminal et le domaine N-terminal se produit ce qui expose le domaine de liaison à l'ADN à la surface de la protéine. (B) Le changement de FNR en une forme $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ rompt l'interaction entre le domaine C-terminal et le domaine N-terminal ce qui entraîne l'allongement du domaine de dimérisation. Dans cette conformation FNR ne peut plus se lier à l'ADN (d'après Crack, 2003).

Chaque monomère de la protéine FNR reconnaît une moitié de la séquence *via* un motif TTGAT. Les résidus sérine 212 et glutamine 209 de la protéine FNR sont essentiels à la reconnaissance de l'ADN. Le résidu glutamine interagit avec la paire de base GC du motif TTGAT et le résidu sérine avec la paire de base TA située en 5'. De façon intéressante, le remplacement de la valine 208 de FNR par une arginine permet à FNR de reconnaître, en plus de ses propres sites de fixation à l'ADN, d'autres sites de fixation des régulateurs de la famille CRP (Spiro et al., 1990).

L'activation de la transcription se fait par contact avec l'ARN polymérase. Pendant l'activation trois régions exposées à la surface de la protéine FNR (AR1, AR2 et AR3) sont nécessaires pour que FNR et l'ARN polymérase rentrent en contact et pour promouvoir la transcription. La région AR1 rentre en contact avec la sous unité α , la région AR2 avec la sous unité σ^{70} , et AR3 avec le domaine α -NTD de l'ARN polymérase. Les résidus thréonine 118 et sérine 187 ; lysine 49 et lysine 50 ; aspartate 86, isoleucine 81 et glycine 85 sont respectivement importants pour les trois régions AR1, AR2 et AR3.

En anaérobie FNR fixe un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ et forme un dimère capable de se fixer aux promoteurs cibles pour réguler la transcription. En aérobie, la présence d'oxygène entraîne la conversion du centre FeS en une forme $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, ce qui abolit la dimérisation et la fixation à l'ADN (Figure 22) (Green et al., 1996) (Lazazzera et al., 1996). La forme $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ est obtenue par la perte de deux atomes de Fe^{2+} et deux atomes de S^{2-} , en passant par un intermédiaire $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$. Le peroxyde d'hydrogène peut amplifier l'oxydation des centres FeS par relargage d'un atome de Fe^{2+} oxydé en Fe^{3+} . La conversion du centre FeS d'une forme cubique $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ en une forme plane $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ diminue l'activité de liaison à l'ADN probablement *via* un changement conformationnel important. Il s'avère que l'intermédiaire $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ est un élément clé de ce réarrangement puisqu'un résidu cystéine est libéré puis à nouveau coordonné pour former le $[2\text{Fe-2S}]$. Un modèle a été proposé pour décrire ce réarrangement conformationnel. Quand FNR est sous forme $[4\text{Fe-4S}]$, une interaction est possible entre son domaine C-terminal de fixation à l'ADN et son domaine senseur en N-terminal grâce à un repliement de l'hélice. Dans cette conformation le site de reconnaissance de l'ADN est exposé à la surface de la protéine. Le changement conformationnel entre la forme $[4\text{Fe-4S}]$ à $[2\text{Fe-2S}]$ brise l'interaction entre le domaine supérieur et inférieur. Ainsi l'hélice centrale de dimérisation s'allonge et balance le domaine de fixation de l'ADN au milieu de la structure protéique empêchant la reconnaissance du promoteur cible (Figure 23) (Crack et al., 2004) (Kiley and Beinert, 1998) (Mettert and Kiley, 2015) (Khoroshilova et al., 1997).

En condition d'exposition prolongée à l'oxygène, la forme $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ est dégradée ce qui entraîne la perte du centre FeS avec l'obtention d'une protéine apo-FNR (Sutton et al., 2004). Cette réaction peut être provoquée par le superoxyde qui est un sous produit du métabolisme aérobie. La protéolyse de la forme apo-FNR éviterait son accumulation inutile en aérobie et empêcherait la reconversion de FNR en une forme $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ qui engendrerait une réponse inadaptée (Popescu et al., 1998) (Mettert and Kiley, 2007). La protéine FNR est reconnue par la protéase ClpX grâce à deux séquences d'acides aminés retrouvées en N-terminal (résidus 5 à 11) et en C-terminal (résidus 249 à 250) (Flynn et al., 2003). Lors d'une croissance en anaérobie, la dimérisation de FNR masque au moins un des sites de liaison rendant le régulateur inaccessible à la protéase (Mettert and Kiley, 2005).

Le mécanisme par lequel *E. coli* sent l'oxygène via la protéine FNR est conservé. Cependant quelques exceptions existent chez les bactéries Gram positives comme *Bacillus subtilis* ou *Bacillus cereus*. Dans le cas de *Bacillus subtilis*, le centre FeS n'est pas nécessaire à la dimérisation de FNR quelque soit l'environnement aérobie ou anaérobie. Cependant, il reste indispensable à sa liaison à l'ADN (Reents et al., 2006) (Mettert and Kiley, 2015).

En plus de son rôle principal de senseur de l'oxygène, FNR est capable de sentir et de répondre au NO. En effet, il a été montré *in vitro* que le NO dégrade le centre FeS de FNR et entraîne une diminution de la fixation de FNR à l'ADN. Le NO réagit avec le centre FeS par une réaction qui produit un complexe dinitrosyl-fer-cystéine. Cette activité de senseur du NO est en accord avec le fait que la protéine FNR régule des gènes impliqués dans le métabolisme du NO, un sous produit de la respiration anaérobie avec le nitrate. Ainsi, FNR réprime le gène *hmp* d'*E. coli* qui code pour une flavohaemoglobine qui détoxifie le NO et le gène *nar* qui code pour une nitrate réductase qui transforme le nitrate en nitrite. La fonction de senseur du NO est secondaire puisque le nombre de gènes induits en réponse au NO est inférieur à ceux induits en présence d'oxygène (Crack et al., 2013) (Cruz-Ramos et al., 2002).

I. 2. Le régulon FNR

FNR contrôle l'expression d'environ 200 gènes impliqués dans le changement du métabolisme énergétique lors du passage d'un environnement aérobie à anaérobie. De façon générale, il réprime des gènes de la respiration aérobie et active des gènes de la respiration anaérobie. Mais FNR régule aussi la transcription de gènes liés à d'autres fonctions cellulaires.

Parmi les gènes activés on retrouve ceux impliqués dans le transport et l'oxydation anaérobie des sources de carbones, ou la réduction des accepteurs terminaux d'électron

alternatifs à l'oxygène comme le nitrate, le fumarate ou le DMSO (Salmon et al., 2003) (Kang et al., 2005) (Constantinidou et al., 2006). L'effet de l'oxygène sur l'activité de la protéine FNR a été modélisé et prédit à un réseau de régulation complexe. Alors qu'une partie du régulon nécessite uniquement la présence de FNR pour leur expression, il semble qu'une autre partie ferait intervenir, soit des protéines associées aux nucléoides (NAPs) comme H-NS, IHF ou Fis, soit des facteurs de transcription répondant à des conditions environnementales spécifiques (CRP, NarL et NarP). Le régulon est donc malléable selon les changements de conditions de croissance rencontrées par la cellule. Cette stratégie de régulation par l'action combinée de plusieurs facteurs de transcription rappelle la régulation globale par CRP-AMP ou les systèmes de régulation des eucaryotes (Mettert and Kiley, 2015).

I. 3. Maturation de la protéine FNR

En 2008, Mettert et collaborateurs ont décrit la maturation du régulateur FNR en comparant des conditions de croissance aérobies ou anaérobies. La capacité de FNR à activer l'expression d'un gène qui fait partie de son régulon a été utilisé comme rapporteur de son niveau de maturation.

En anaérobie et en absence de la machinerie ISC, la maturation de la protéine FNR est diminuée de 60 %. L'absence de la machinerie SUF n'a aucun effet sur la maturation de FNR. Ceci indique qu'en absence d'oxygène, la protéine FNR acquiert son centre FeS principalement *via* le système ISC. Plusieurs points montrent cependant que la machinerie SUF est biochimiquement capable de maturer FNR. Premièrement, même en absence de la machinerie ISC, FNR conserve un niveau d'activité de 40 %. Ensuite, la surproduction du système SUF dans un mutant Δisc restaure entièrement l'activité de FNR. En aérobie c'est le système ISC et lui seul qui mature FNR. En effet, en absence de la machinerie ISC l'activité de la protéine FNR est totalement abolie. Pour étudier la maturation de la protéine FNR en présence d'oxygène, les auteurs ont été contraints d'utiliser une forme mutée pour stabiliser la forme [4Fe-4S] de FNR. La mutation introduite est une substitution d'une leucine en histidine, en position 28. Dans ces conditions, la surproduction de la machinerie SUF ne parvient pas à restaurer le défaut d'activité FNR d'un mutant Δisc . Pour conclure, la maturation de la protéine FNR est principalement effectuée par le système ISC. Si ce dernier est absent, le système SUF peut prendre le relai mais uniquement en anaérobie. La machinerie SUF étant connue pour maturer les protéines à centre FeS dans des conditions de stress oxydant, il est étonnant de constater que la machinerie SUF puisse remplacer la machinerie ISC en anaérobie

mais pas en aérobie. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cela. Tout d'abord, la présence de l'oxygène augmente le besoin de la machinerie SUF pour la maturation de l'ensemble des protéines à centre FeS de la cellule. Il est aussi possible que SUF ait une meilleure reconnaissance ou affinité pour d'autres cibles produites en présence d'oxygène. Alors que la machinerie ISC est indispensable à la maturation de FNR en aérobie, la protéine de transport des centres FeS, IscA, peut être remplacée par SufA, une protéine homologue à IscA, que ce soit en présence ou en absence d'oxygène. Il s'agit là d'un cas classique où les transporteurs des centres FeS des deux machineries de biogenèse des centres FeS sont interchangeables (Mettert et al., 2008).

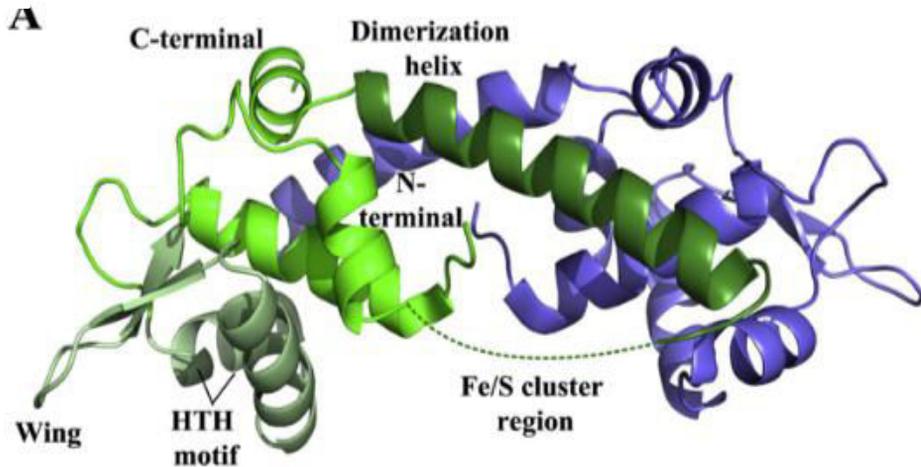


Figure 24 : Les différents domaines de la protéine IscR.

La structure 3D de apo-IscR sous forme de dimère (apo-IscR^{Ec} PDB ID : 4HF0) est représentée. IscR contient une hélice de dimérisation (vert foncé), un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal (vert fluo), lié à un motif (HTH) (vert). IscR fixe le centre [2Fe-2S] en C-terminal (non représenté). L'un des monomères d'IscR est représenté en bleu (d'après une revue de Santos, 2015).

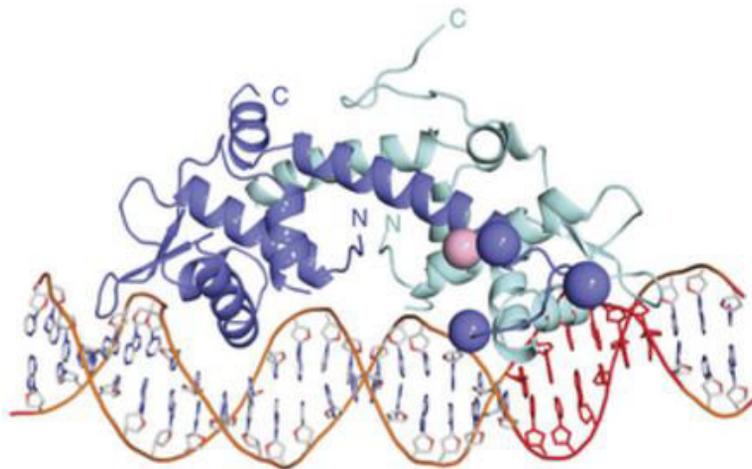


Figure 25 : Structure de IscR liée au promoteur du gène *hya*.

Un monomère de la protéine IscR est représentée en mauve et l'autre en bleu. La représentation de l'ADN est schématique avec en rouge le promoteur du gène *hya*. Les sphères représentent les résidus de coordination du centre FeS : les trois cystéines en position 92, 98 et 104 sont représentées en mauve et l'histidine 107 en rose. La région de fixation du centre FeS d'un monomère est proche de l'hélice de fixation à l'ADN de l'autre monomère (d'après Rajagopalan, 2013).

II. IscR

La protéine IscR, pour iron-sulfur cluster regulator, a été décrite par Schwartz et collaborateurs en 2001 comme une protéine régulant négativement la transcription de l'opéron *isc*. IscR est codée par un gène se trouvant juste en amont de ceux de la machinerie ISC (Schwartz et al., 2001). Le régulateur IscR perçoit le besoin en centre FeS de la cellule *via* sa capacité à fixer un centre [2Fe-2S]. Lorsque IscR est sous forme apo il réprime l'expression des gènes codant pour le système de biogenèse des centres FeS ISC. IscR était jusqu'à présent uniquement décrit chez les bactéries Gram négatives mais il a été trouvé des homologues putatifs chez les bactéries Gram positives, ainsi qu'un orthologue fonctionnel de la protéine IscR chez *Thermicola potens* (André et al., 2010) (Santos et al., 2014).

II. 1. La protéine IscR : ses caractéristiques et son mécanisme de régulation

La protéine IscR est une protéine de (17 kDa) de la superfamille de Rrf2. La structure de la protéine IscR n'est pas connue mais comme les membres de la famille Rrf2, IscR possède deux domaines. Le domaine N-terminal possède une hélice de liaison à l'ADN et le domaine C-terminal est le domaine senseur grâce à la présence du centre [2Fe-2S] (Figure 24). IscR coordonne son centre FeS grâce à trois résidus cystéines en position 92, 98 et 104, et à une histidine en position 107 (Figure 25) (Fleischhacker et al., 2012).

La plupart des régulateurs transcriptionnels à centre FeS utilisent leur centre FeS comme senseur dont l'assemblage est indispensable à l'activité du régulateur. Dans le cas de IscR, la protéine est capable de réguler l'expression de gènes qu'elle soit sous forme apo ou holo (Nesbit et al., 2009). Le centre [2Fe-2S] est retrouvé majoritairement sous une forme réduite [2Fe-2S]¹⁺ mais il peut être oxydé pour donner un centre [2Fe-2S]²⁺. Cependant, son état d'oxydation n'influence ni son affinité pour l'ADN, ni son activité régulatrice. Enfin, la protéine IscR est principalement retrouvée sous forme de dimère en solution et l'absence du centre FeS n'affecte pas la dimérisation.

IscR a la capacité à reconnaître deux motifs de l'ADN distincts, le motif de Type 1 (reconnu par la forme holo comme dans le cas de l'opéron *isc*) et le motif de Type 2 (reconnu par les formes apo et holo comme dans le cas de l'opéron *suf*). Les deux sites de Type 1 et 2 ressemblent à des palindromes imparfaits de 25 pb mais diffèrent dans leur séquence.

Comment IscR qui possède un seul domaine hélice de liaison à l'ADN peut reconnaître deux types de motifs? Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer que le changement de la forme apo- à la forme holo-IscR permette un changement de reconnaissance de l'ADN. D'une part le site de liaison du centre FeS d'un monomère est proche du site de liaison de

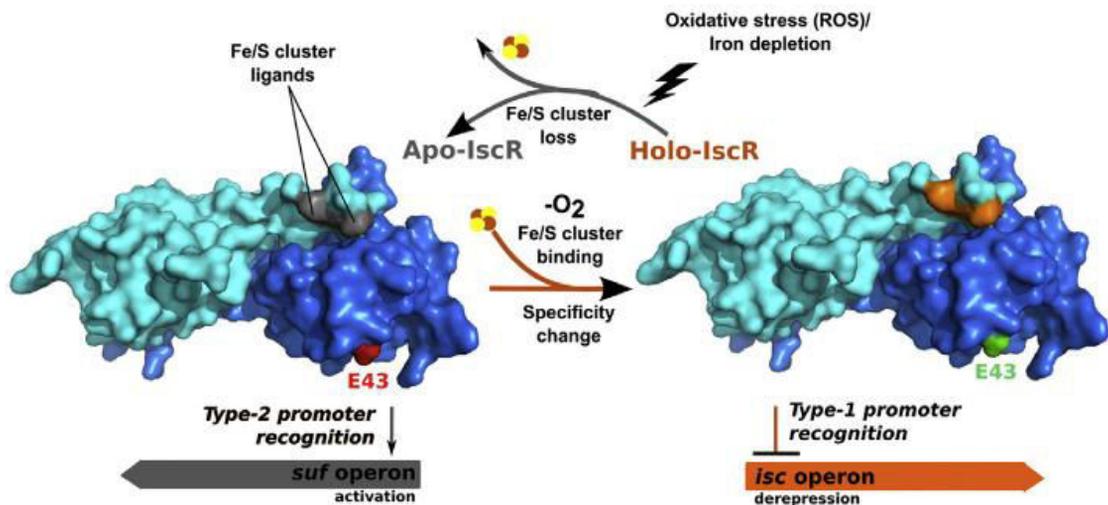


Figure 26 : Modèle de régulation par la protéine IscR.

La protéine IscR utilise le glutamate 43 (E43) (rouge) comme moyen de sélection entre le motif de liaison de l'ADN de Type 1 (opéron *isc*) (orange) et le motif de liaison à l'ADN de Type 2 (opéron *suf*) (gris). La liaison du centre FeS à la protéine IscR (flèche orange) supprime l'effet négatif du glutamate 43 dans la reconnaissance du promoteur de Type 1 ce qui permet à IscR de réprimer l'opéron *isc*. Le stress oxydant et la carence en fer (flèche grise) entraînent la perte du centre FeS et l'accumulation de la forme apo-IscR permettant l'interaction avec le promoteur de Type 2 ce qui entraîne l'activation de l'opéron *suf* (d'après une revue de Santos, 2015).

l'ADN de l'autre monomère ce qui peut influencer la conformation du dimère de protéine. D'autre part, la protéine IscR contient un glutamate (Glu 43) dans son site de liaison à l'ADN, résidu montré comme important pour la discrimination entre le type 1 et le type 2 (Rajagopalan et al., 2013). IscR est donc un nouveau type de régulateur qui peut changer de conformation pour reconnaître différents motifs de l'ADN.

Sous forme holo, la protéine IscR réprime la transcription de l'opéron *isc* en se fixant à son propre promoteur (Figure 26) (Schwartz et al., 2001). La répression nécessite la fixation d'holo-IscR à deux sites de liaison appelés site A et site B. Ces deux sites coïncident avec les séquences -10 et -35 de reconnaissance du facteur sigma 70 de l'ARN polymérase. Ainsi, une fois lié à l'ADN, IscR empêche l'attachement de l'ARN polymérase. Un troisième site de fixation appelé site C a été identifié mais son absence n'entraîne pas de changement dans le niveau d'expression de l'opéron *isc in vivo*. La forme holo-IscR a une plus forte affinité pour les sites A et B que la forme apo-IscR. Le centre FeS a donc un rôle crucial dans la fonction de IscR en tant que répresseur.

Des conditions environnementales peuvent augmenter le besoin en centre FeS de la cellule et nécessitent l'intervention de la protéine IscR pour y répondre. Ce besoin en centre FeS provoque une entrée en compétition de la protéine IscR avec les autres cibles protéiques maturés par la machinerie ISC. De par la coordination inhabituelle de son centre FeS et son exposition au solvant, IscR serait un substrat peu affin pour le système ISC et serait la dernière protéine de la cellule à être maturée. Les caractéristiques de la structure protéique d'IscR sont en accord avec ce rôle puisque l'exposition de son centre FeS au solvant est favorable à son acquisition ou sa perte. Ainsi, suite à l'augmentation du niveau d'apo-IscR dans la cellule, l'opéron *isc* est déréprimé (Giel et al., 2013) (Santos et al., 2015).

Sous sa forme apo, IscR agit comme un activateur de l'opéron *suf* qui code pour la machinerie de biogenèse des centres FeS activé dans des conditions de stress oxydant (Figure 26) (Yeo et al., 2006).

Le besoin en centre FeS de la cellule peut notamment augmenter en conditions de stress oxydant. En effet certains centres FeS sont dégradés dans ces conditions ce qui augmente la quantité de protéines devant être maturées. IscR peut sentir que la demande en centre FeS n'est pas satisfaite. Cependant on ne peut pas exclure, que les formes réactives de l'oxygène agissent directement sur la protéine holo IscR en provoquant la dégradation de son centre FeS (Outten et al., 2004) (Lee et al., 2008) (Mettert and Kiley, 2015).

II. 2. Le régulon IscR

IscR contrôle l'expression de plus de quarante gènes chez *E. coli* dont vingt ont été prédis comme faisant partie d'opérons. En plus des opérons *isc* et *suf* on retrouve des gènes impliqués dans la biogenèse des centres FeS comme *erpA* et *nfuA*. D'autres gènes codent pour des enzymes à co-facteur à centre FeS dont les enzymes impliquées dans la respiration anaérobie comme la nitrate réductase périplasmique codé par l'opéron *nap* et les hydrogénases 1 et 2 codée par les opérons *hya* et *hyb*. Ces dernières sont liées à la membrane et permettent à la cellule d'utiliser le dihydrogène comme source d'énergie. La nitrate réductase quant à elle permet de convertir le nitrate en nitrite (Giel et al., 2006) (Giel et al., 2013). De façon intéressante, ces enzymes sont régulées par le niveau en centre FeS de la cellule *via* IscR en plus de la régulation par l'oxygène *via* FNR.

Enfin, IscR est également impliquée dans la régulation de gènes intervenant dans la formation du biofilm, de facteurs de colonisation, la production de la colicine ou encore dans le métabolisme de l'ARN, mais le lien avec les centres FeS reste mal compris (Wu and Outten, 2009) (Butala et al., 2012) (Otsuka et al., 2010) (Haines et al., 2015).

II. 3. Maturation de la protéine IscR

La maturation de la protéine IscR a été décrite par Vinella et al en 2013. L'activité répresseur de IscR a été mesurée grâce à une fusion transcriptionnelle où le promoteur de IscR a été fusionné au gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase. Alors que dans un mutant *suf* l'activité répresseur d'IscR n'est pas affectée, l'absence d'un des composants de la machinerie ISC (IscU, IscAU, HscA, HscB, Fdx) entraîne la diminution de sa maturation. Une activité résiduelle est cependant détectée, ce qui signifie que la machinerie SUF peut aussi maturer IscR. De plus, la surproduction de SUF dans un mutant *isc* permet de retrouver le niveau d'activité de IscR ce qui montre que si la machinerie SUF est surproduite, alors elle est capable de maturer IscR. Pour conclure, l'étude montre qu'en aérobie la maturation de la protéine IscR est effectuée majoritairement par la machinerie ISC.

Les protéines IscA et ErpA participent à la maturation de la protéine IscR. Elles font partie d'une même voie puisque l'absence des deux protéines n'a pas d'effet additif sur la maturation d'IscR par rapport à l'absence d'une seule protéine. En revanche, la protéine SufA ne joue aucun rôle dans la maturation d'IscR. De façon surprenante, la maturation de la protéine IscR peut se faire sans ATC puisque son activité diminue uniquement de trois fois dans le triple mutant $\Delta iscA \Delta erpA \Delta sufA$. Une hypothèse est que le centre FeS peut être transféré directement à partir de la protéine d'échafaudage. La maturation d'IscR en carence

en fer a également été étudiée en utilisant le 2,2'-dipyridyl (DIP) comme chélateur. Il a été montré qu'en présence de DIP l'activité répresseur d'IscR diminue très rapidement. Son centre FeS est donc très instable probablement à cause de son exposition au solvant. Dans ces conditions, ni la machinerie ISC ni la machinerie SUF ne sont suffisamment efficaces pour maintenir un niveau élevé de holo-IscR. Le régulateur IscR peut donc aussi être considéré comme un senseur de la carence en fer (Vinella et al., 2013).

III. NsrR

Le régulateur NsrR a été mis en évidence en 2006 par Spiro et ses collaborateurs (Bodenmiller and Spiro, 2006). NsrR est impliqué dans la réponse et la défense contre les formes réactives de l'azote. Le monoxyde d'azote est un intermédiaire du cycle de l'azote d'une importance majeure en biologie produit par de nombreux organismes comme molécule signal ou de défense. La protéine NsrR est largement distribuée chez les beta- et les gamma-protéobactéries mais aussi chez les bactéries Gram positives.

III. 1. La protéine NsrR : ses caractéristiques et son mécanisme de régulation

La protéine NsrR fait partie de la même superfamille des répresseurs transcriptionnels Rrf2 que IscR. La structure de la protéine NsrR n'est pas connue mais comme les membres de la famille Rrf2, NsrR possède deux domaines. Le premier contient une hélice de liaison à l'ADN en N-terminal et le deuxième est le domaine senseur liant un centre FeS en C-terminal. Chez *S. coelicor*, *B. subtilis* et *N. gonorrhoeae* le centre FeS est coordonné par 3 résidus cystéines en position 93, 99 et 105. La nature du quatrième ligand n'est pas encore connue. Le centre FeS est central dans l'activité répresseur puisqu'une mutation dans l'une de ces trois cystéines entraîne la perte du centre FeS, la perte de la liaison à l'ADN et de l'activité régulatrice assurée par NsrR. Comme les membres de la famille Rrf2, il a été prédit que la nature de son co-facteur est un centre de type [2Fe-2S]. C'est le cas pour NsrR de *N. gonorrhoeae* (Isabella et al., 2009). Cependant la protéine NsrR purifiée chez *B. subtilis* contient un centre [4Fe-4S] (Yukl et al., 2008). Cette différence pourrait venir des conditions de purification. En effet, la purification de NsrR de *B. subtilis* a été faite en anaérobie alors que celle de NsrR de *N. gonorrhoeae* a été réalisée en aérobie.

Holo-NsrR peut se lier à deux classes de site de fixation à l'ADN. La première classe consiste en deux motifs de 11 pb qui sont séparés par 1 pb et forment une séquence palindromique. La deuxième classe possède uniquement un des deux motifs. Il a été suggéré que les deux types de sites soient occupés par NsrR dans différents états oligomériques. La différence d'affinité pour les sites de fixation à l'ADN n'est pas connue mais il semblerait que dans le cas de la première classe, les deux motifs soient nécessaires pour son activité maximale de répresseur (Partridge et al., 2009). La protéine NsrR pourrait donc lier l'ADN sous forme d'un monomère pour la classe 2 ou d'un homodimère pour la classe 1. Il a été proposé que NsrR puisse avoir différents niveaux de répression selon le nombre de sites de fixation à l'ADN (Crack et al., 2012) (Rodionov et al., 2005). Des études sont en cours pour déterminer

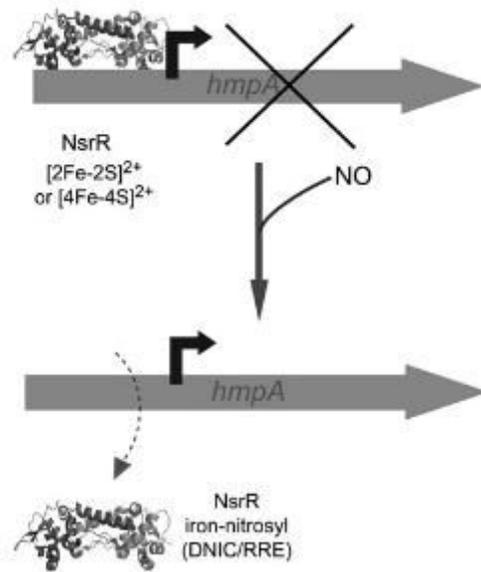


Figure 27 : Modèle de régulation par la protéine NsrR.

La structure de NsrR n'étant pas disponible, la représentation schématique de NsrR utilise la protéine CymR qui fait partie de la famille des régulateurs transcriptionnels Rrf2. Le gène *hmpA* code pour une enzyme de détoxification du NO. NsrR réprime le gène *hmpA*. En présence du NO, la nitrosylation du centre FeS (DNIC) de NsrR entraîne la dépression du gène *hmpA* (d'après Crack, 2012).

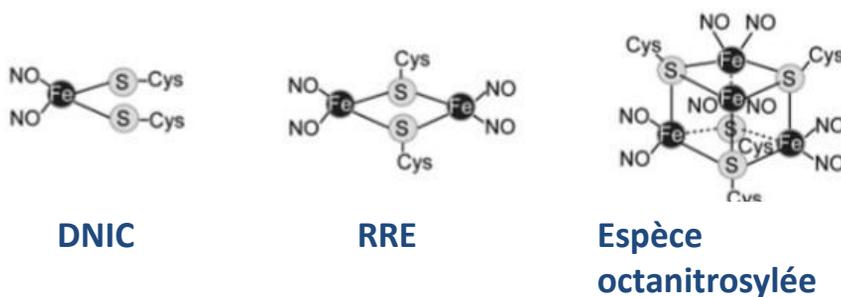


Figure 28 : Les formes nitrosylées du fer.

La réaction du NO avec les centres FeS des régulateurs transcriptionnels entraîne la formation d'au moins deux espèces nitrosylées du fer : le complexe dinitrosyle (DNIC) représenté à gauche, et la forme ester rouge de Roussin (RRE) représentée au centre. Représentée à droite, la formation d'une nouvelle forme de centre FeS oxydée par le NO, octanitrosylée, a fait l'objet d'une discussion récente (d'après Crack, 2012).

l'affinité du régulateur pour ces différents sites de fixation.

Le mécanisme par lequel NsrR est régulé par le NO n'a pas encore été résolu. On sait cependant que le centre FeS de la protéine NsrR peut être nitrosylé par le monoxyde d'azote ce qui entraîne la perte du centre FeS et abolit l'activité de liaison à l'ADN (Figures 27 et 28). NsrR pourrait bloquer la liaison de l'ARN polymérase en chevauchant la séquence -10 du promoteur ou le site d'initiation de la transcription (Tucker et al., 2008a).

III. 2. Le régulon NsrR

Chez *E. coli*, NsrR contrôle un régulon d'environ 60 gènes codant pour des protéines de fonctions très diverses impliquées aussi bien dans le métabolisme, la motilité et la dégradation protéique que dans l'attachement aux surfaces, la réponse au stress, le transport transmembranaire le développement de biofilm, la virulence ou encore la symbiose bactérie hôte (Mettert and Kiley, 2015).

Les gènes les plus induits sont ceux codant pour des protéines impliquées dans la détoxification du NO et la réparation des dommages causés par celui-ci. C'est le cas de la NO dioxygénase Hmp, une flavohaemoglobine qui permet de transformer le NO en nitrate de façon oxygène dépendante. La protéine Hmp protège notamment *E. coli* du NO produit par les macrophages (Gilberthorpe et al., 2007) (Bang et al., 2006) (Stevanin et al., 2002) (Stevanin et al., 2007). Une nitrite réductase périplasmique (NrfA) utilise le NO pour la transformation du nitrite (NO_2^-) en ammonium (NH_4^+). Dans le régulon NsrR sont aussi retrouvés les gènes *hcp* et *hcr* qui codent respectivement pour une protéine à centre FeS et une NADH-oxydoréductase. Les protéines codées par ces deux gènes pourraient former un complexe impliqué dans la conversion de l'hydroxylamine (H_3NO) en ammonium (NH_4^+) et joueraient un rôle contre le stress oxydant (Almeida et al., 2006) (Heurlier et al., 2008) (Tucker et al., 2010) (Justino et al., 2007).

Chez d'autres espèces bactériennes, le régulon NsrR est plus réduit. C'est le cas de *N. gonorrhoeae* qui ne contient pas d'homologue du gène *hmp* codant pour la flavohaemoglobine. Chez la plupart des bactéries, une mutation dans le gène *hmp* diminue fortement la survie en présence de NO. Cela suggère que *N.gonorrhoeae* possède des systèmes de détoxification en plus de NsrR. En revanche, on retrouve dans le régulon le gène *dnrN* impliqué dans la réparation des centres FeS endommagés par les formes réactives de l'azote et de l'oxygène, et *mobA* un gène impliqué dans la biosynthèse d'une molybdoptérine guanine dinucléotide. Le régulon NsrR de *S. coelicor* est quant à lui constitué de trois gènes uniquement. Il contient deux homologues du gène codant pour la protéine Hmp, *hmpA1* et

hmpA2 et le gène *nsrR* lui-même. Ainsi, le régulon NsrR de *S. coelicolor* contrôle la détoxification du NO.

III. 3. Maturation de la protéine NsrR

Comme pour la protéine IscR, la maturation de la protéine NsrR a été décrite par Vinella et al en 2013. Elle a été effectuée en aérobic en mesurant la capacité de holo-NsrR à réprimer le promoteur du gène *hmpA*.

La machinerie ISC assure la maturation de la protéine NsrR. Ainsi, l'absence de la machinerie SUF n'a aucun impact sur l'activité répresseur de NsrR. A l'inverse, dans un mutant *isc* l'activité de NsrR est diminuée de 15 fois. Cependant, une partie de l'activité est conservée ce qui traduit qu'une partie de NsrR reste sous forme holo. La surproduction de SUF dans un mutant *isc* permet de retrouver le niveau d'activité de NsrR ce qui montre que la machinerie SUF est capable de maturer NsrR si elle est surproduite.

Les transporteurs ErpA et IscA sont importants pour la maturation de NsrR contrairement au transporteur SufA dont l'absence n'a aucun effet. Donc contrairement à IscR, la maturation de NsrR dépend de certains ATCs.

Enfin, la maturation de NsrR en carence en fer a été étudiée en utilisant le dipyridyl comme chélateur. Premièrement il a été constaté qu'un pourcentage de l'activité NsrR est conservée en carence en Fer. Contrairement à IscR, NsrR continue à obtenir son centre FeS dans des conditions où le Fer est limitant. Dans ces conditions la machinerie SUF est nécessaire à la maturation de NsrR puisque l'activité de NsrR est drastiquement réduite dans un mutant *suf*.

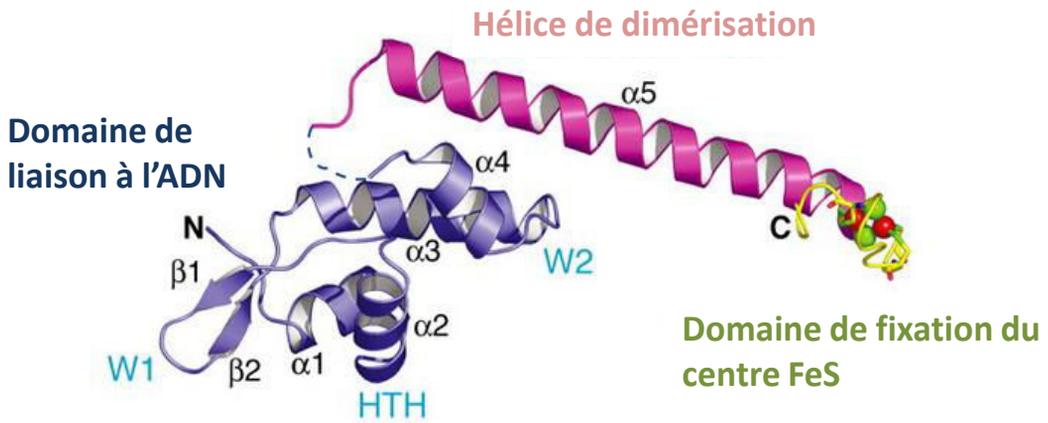


Figure 29 : Les différents domaines de la protéine SoxR.

SoxR est représentée sous forme de monomère. SoxR possède en N-terminal un domaine de liaison à l'ADN (en mauve) et en C-terminal une hélice de dimérisation (en rose) et un site de fixation d'un centre [2Fe-2S] (sphères rouges et vertes) (d'après Watanabe, 2008).

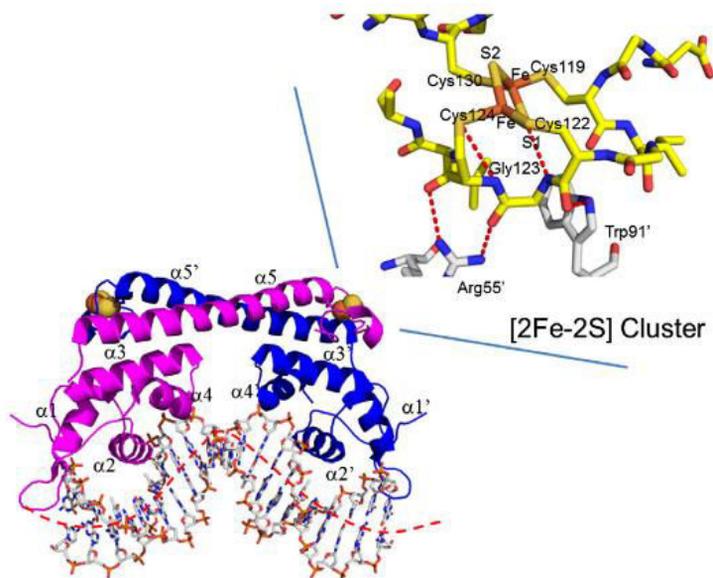


Figure 30 : La structure de SoxR sous forme de dimère lié à l'ADN et son centre [2Fe-2S].

SoxR est représentée sous forme de dimère (un monomère en bleu et un autre monomère en rose) liée au promoteur du gène *soxS*. Le centre FeS (sphères rouges et jaunes) est représenté en détail en haut à droite. Le centre FeS est coordonné par quatre résidus cystéines (Cys 119, Cys 122, Cys 124 et Cys 130). La glycine 123 et le tryptophane 91 seraient importants pour le changement conformationnel de SoxR après son oxydation. L'arginine 55 serait importante pour la liaison à l'ADN (d'après Kobayashi, 2014).

IV. SoxR

La protéine SoxR pour *superoxide response regulator* est un régulateur transcriptionnel impliqué dans la réponse adaptatrice des bactéries aux composés redox actifs. Chez les entérobactéries, le gène régulé par SoxR est *soxS*, qui code lui-même pour un régulateur transcriptionnel. Les gènes régulés par SoxS sont impliqués dans la défense contre le stress oxydant comme la superoxyde dismutase SodA ou l'endonucléase IV, ou de protéines de résistance aux antibiotiques comme la pompe à efflux de la membrane externe AcrAB-TolC. SoxR a été le premier régulateur transcriptionnel à centre FeS à être identifié. Parmi le groupe des régulateurs transcriptionnels à centre FeS SoxR est unique puisque contrairement aux autres régulateurs son activité est contrôlée par le changement de l'état d'oxydoréduction de son centre FeS et non par l'assemblage et le désassemblage de son centre [2Fe-2S] (Gaudu and Weiss, 1996).

IV. 1. La protéine SoxR : ses caractéristiques et son mécanisme de régulation

SoxR est une protéine de 17 kDa de la famille MerR dont les membres sont impliqués dans la réponse à différents stress environnementaux, comme les formes réactives de l'oxygène ou les antibiotiques. SoxR, comme les autres protéines de la famille MerR, possède un domaine N-terminal formant une hélice de fixation à l'ADN, un domaine C-terminal constitué d'une hélice impliquée dans la dimérisation et du site de fixation du centre [2Fe-2S] (Figure 29). SoxR est toujours retrouvée sous forme de dimère et chaque monomère fixe un centre [2Fe-2S] (Hidalgo and Demple, 1994). Les deux hélices de dimérisation sont positionnées de façon antiparallèle stabilisant le dimère.

Le centre [2Fe-2S] est coordonné à la surface de la protéine par quatre résidus cystéines (Cys 119, Cys 122, Cys 124 et Cys 130) (Figure 30). Il est intéressant de noter que l'un des atomes de soufre et deux atomes de fer sont exposés au solvant. Cette exposition pourrait permettre le transfert rapide des électrons et l'interaction avec les divers agents oxydants activant SoxR. Une caractéristique inhabituelle du motif CX₂CXCX₅C de SoxR est la présence d'une glycine 123 conservée entre deux cystéines qui pourrait être importante pour coupler le changement conformationnel de SoxR et la courbure de l'ADN. En effet, la glycine 123 interagit avec un atome de soufre du centre [2Fe-2S], avec la cystéine 124 coordinatrice du centre [2Fe-2S] et l'arginine 55 appartenant au domaine de fixation à l'ADN (Figure 30). Le changement conformationnel redox dépendant de la protéine SoxR serait la conséquence d'un environnement asymétrique du centre [2Fe-2S]. Il existe notamment une liaison hydrogène

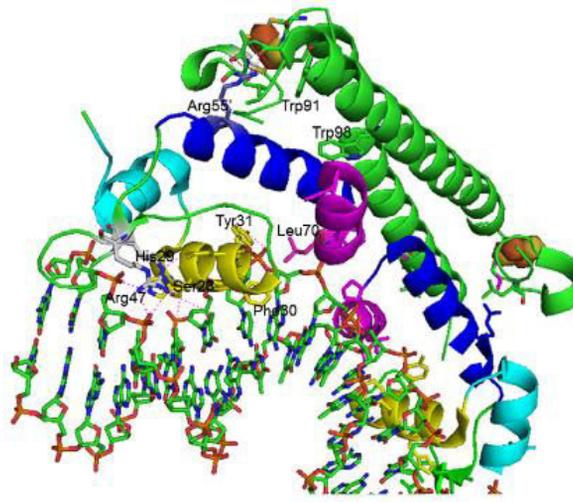


Figure 31 : Interaction de SoxR avec l'ADN.

La partie de SoxR se fixant à l'ADN est représentée (d'après une revue de Kobayashi, 2014).

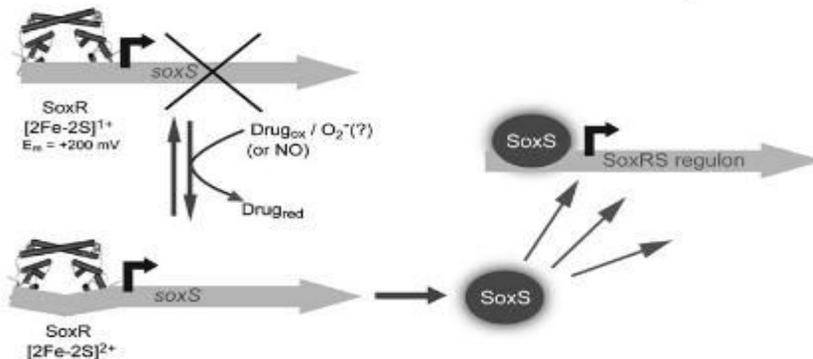


Figure 32 : Mécanisme d'activation de SoxR.

L'oxydation de la forme $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ par les composés redox actifs, le NO ou le superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en une forme $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ entraîne un changement conformationnel de la protéine qui se propage à l'ADN et permet l'activation de l'expression du gène *soxS*. Le gène *soxS* code pour un régulateur transcriptionnel qui active un régulon d'une centaine de gènes (d'après Crack, 2012).

qui pourrait être importante pour le signal redox de SoxR entre le tryptophane 91 de l'hélice de dimérisation et la cystéine 119 de coordination du centre FeS. Après oxydation, l'environnement du tryptophane 91 deviendrait hydrophile et son interaction avec le centre [2Fe-2S] serait modifiée.

Le site de fixation reconnu par SoxR a les mêmes caractéristiques que celui reconnu par les membres de la famille MerR. SoxR reconnaît une séquence de 19 ou 20 pb qui sépare les motifs -10 et -35 du promoteur. Cependant la structure du promoteur est inhabituelle puisque la plupart des promoteurs bactériens ont un espacement optimal de 17 pb entre leur éléments -10 et -35. SoxR est lié à l'ADN que la protéine soit sous forme holo ou apo enzyme (Watanabe et al., 2008).

Lorsque SoxR se lie à l'ADN, le domaine de fixation à l'ADN et le domaine de liaison du centre FeS subissent une rotation provoquant un éloignement entre les hélices de liaison à l'ADN de chaque monomère (Figure 31). Ce changement de conformation est communiqué aux hélices de dimérisation qui changent à leur tour de positionnement. Les changements observés concernent les tyrosines 49 et 31 du domaine de liaison à l'ADN. En effet, lorsque SoxR se fixe à l'ADN, la tyrosine 31 subit une rotation ce qui crée une liaison hydrogène entre la glycine 64 et un phosphate de l'ADN. Une autre liaison hydrogène entre la tyrosine 49 et l'arginine 47 est clivée ce qui provoque une nouvelle liaison hydrogène entre l'arginine 47 avec un autre phosphate de l'ADN. Ces deux liaisons sont importantes pour stabiliser la liaison de SoxR à l'ADN (Watanabe et al., 2008).

Le potentiel redox de SoxR est de -290 mV ce qui signifie que de nombreux oxydants cellulaires peuvent théoriquement l'activer. Lorsque SoxR se fixe à l'ADN son potentiel redox passe de -290 mV à +200 mV suggérant que l'environnement d'exposition au solvant et la structure électronique du centre [2Fe-2S] sont altérés. On peut envisager que SoxR soit oxydée uniquement lorsque la protéine est liée à l'ADN limitant le nombre de ses oxydants potentiels.

L'oxydation du centre [2Fe-2S]⁺ de SoxR en une forme [2Fe-2S]²⁺ provoque un changement structural de la protéine entraînant un réarrangement dans le promoteur de *soxS* permettant d'initier sa transcription (Figure 32) (Ding et al., 1996) (Fujikawa et al., 2015). Le changement structural résulte d'une réorganisation interdomaine entre le domaine de liaison du centre [2Fe-2S] et le domaine de liaison à l'ADN. Le mécanisme par lequel SoxR entraîne le réarrangement de l'ADN après son oxydation n'est qu'hypothétique puisque la structure de SoxR sous forme [2Fe-2S]⁺ inactive et lié à l'ADN n'est pas disponible. Cependant, des calculs théoriques suggèrent que lorsque le centre [2Fe-2S] est réduit, les

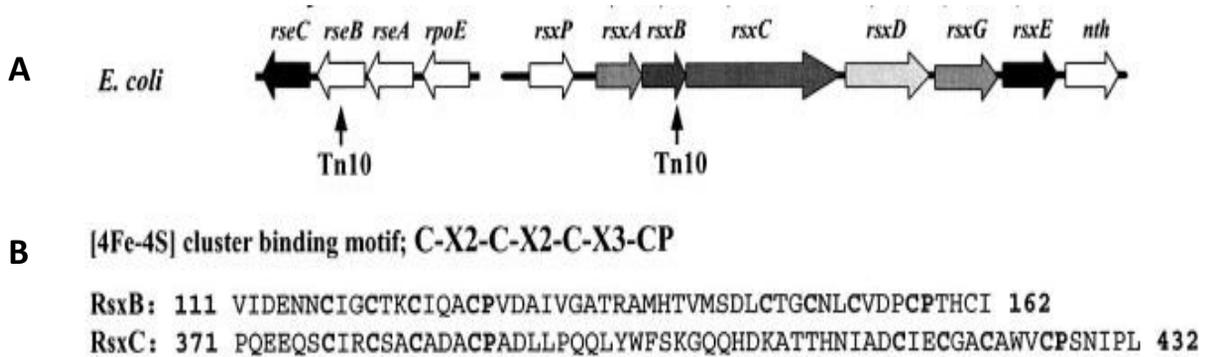


Figure 33 : Le système de réduction de SoxR chez *E. coli*.

(A) La structure du génome des opérons *rsxABCDGE* et *rpoE-rseABC* qui codent pour le système de réduction de SoxR chez *E. coli* est représentée. (B) Les protéines RsxB et RsxC contiennent un motif conservé de fixation d'un centre FeS (CX₂-CX₂-CX₃-CP) (d'après Crack, 2012).

charges sont distribuées de façon homogène entre la cystéine et l'atome de soufre du centre [2Fe-2S]. L'addition d'une charge négative supplémentaire sur l'atome de soufre augmente la répulsion électrostatique de la cystéine 119 (cystéine de coordination du centre FeS) résultant en un changement conformationnel. Ce changement affecte la glycine 123 du domaine de liaison du centre [2Fe-2S] provoquant le changement de position de l'arginine 55 dans l'hélice de liaison à l'ADN (Figure 31). Pour conclure, SoxR utilise le changement de l'état redox de son centre FeS pour exercer son activité transcriptionnelle ce qui est une caractéristique unique par rapport aux autres type de régulateurs à centre FeS d'*E. coli*. En effet, le centre FeS n'est requis ni pour maintenir sa conformation ni pour maintenir sa fixation à l'ADN. Contrairement à d'autres régulateurs, le centre FeS de SoxR doit rester sous forme holo même dans des conditions de stress oxydant pour répondre rapidement aux changements environnementaux (Kobayashi et al., 2014) (Imlay, 2015) (Mettert and Kiley, 2015).

IV. 2. Les systèmes de réduction de SoxR

En aérobic et dans des conditions de croissance dites normales, le centre FeS de SoxR est réduit à 95%. Cela suggère qu'*in vivo* SoxR est maintenu réduit par des enzymes. En effet, quand le stress oxydant SoxR est éliminé, la protéine retourne à son état réduit *via* un système de réduction impliquant le gène *rse* et l'opéron *rsxABCDGE* (Figure 33). L'opéron *rsxABCDGE* d'*E. coli* présente des similarités avec l'opéron *rnfABCDGE* de *R. capsulatus* impliqué dans la réduction des nitrogénases. L'arrangement des gènes dans l'opéron est identique mis à part l'absence de *rnfH* et la présence, en plus, du gène *rsxP*.

Les protéines R_{sx} pourraient former un complexe multi-protéiques dans la membrane comme leurs homologues chez *R. capsulatus*. Des prédictions d'hydrophobicité suggèrent que les protéines R_{sxA}, R_{sxD} et R_{sxE} contiennent six domaines transmembranaires et que les protéines R_{sxB} et R_{sxG} en contiennent un en N-terminal. Enfin la protéine R_{sxC} ne contient pas de région hydrophobe. De façon intéressante, les deux protéines R_{sxB} et R_{sxC} contiennent un motif putatif (C-X₂-C-X₂-C-X₃-CP) de liaison d'un centre [4Fe-4S]. La protéine R_{sxC} contient également un motif de fixation d'un NADH qui est conservé chez son homologue R_{nfC}. Une hypothèse est que que *rsxABCDGE* transfère les électrons du NADPH à SoxR.

Enfin aucun rôle particulier n'a encore été attribué à la protéine R_{seC} mais elle est prédite pour être une protéine transmembranaire. Le gène *rseC* est homologue à la moitié du domaine N-terminal du gène *rnfF* de chez *R. capsulatus* et partagent de nombreux résidus en commun

notamment des résidus cystéines. L'absence de l'opéron *rsxABCDGE* ou du gène *rseC* empêche la réduction de SoxR provoquant l'expression constitutive du gène *soxS*, et constitueraient une même voie de réduction de SoxR et agissent ensemble puisque leur absence simultanée ne cause pas plus d'effet que l'absence d'un seul des deux systèmes (Koo et al., 2003).

IV. 3. Les activateurs de SoxR

La nature du signal ressenti par SoxR a été récemment redéfinie. Initialement le superoxyde était le signal attribué à l'oxydation de SoxR. La barrière bactérienne ne pouvant pas être franchie par le superoxyde, la seule façon d'en augmenter la concentration intracellulaire était d'exposer les bactéries aux composés redox actifs générateurs de superoxyde. Les expériences qui ont montré que le superoxyde est l'activateur de SoxR ont donc été effectuées par exposition des bactéries aux composés redox actifs (Hassan and Fridovich, 1978). Récemment J. Imlay a proposé que la protéine SoxR soit activée directement par les composés redox actifs plutôt que par le superoxyde (Gu and Imlay, 2011).

IV. 3. 1 Activation de SoxR par le superoxyde

Le superoxyde a été le premier signal proposé pour activer SoxR. En effet, Hassan et Fridovich ont montré en 1978 que la superoxyde dismutase à manganèse d'*E. coli* était fortement induite quand les cellules contenaient de fortes concentrations de superoxyde. Et puisque la régulation de cette enzyme est effectuée par SoxR, il paraissait plausible que ce régulateur soit activé par le superoxyde. Un faisceau d'arguments soutient cette hypothèse. Tout d'abord le régulon SoxRS contient des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la défense contre le superoxyde comme la superoxyde dismutase à manganèse (*sodA*), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (*zwf*) (cycle du NADPH), l'endonucléase IV impliquée dans la réparation à l'ADN (*nfo*) ou la fumarase résistante au stress oxydant (*fumC*) (Liochev et Fridovich, 1992). Ces gènes sont spécifiquement induits par le superoxyde et ne sont pas induits par le peroxyde d'hydrogène (Greenberg et Demple, 1989) (Nunoshiba et al., 1992). Ensuite, les enzymes du régulon SoxRS sont induites par le superoxyde. Par exemple l'induction de la fumarase C est augmentée en absence des superoxydes dismutases. Cette induction est dépendante de SoxR puisqu'elle est supprimée dans un mutant Δ *soxR*. Par ailleurs, l'expression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase est diminuée quand les superoxydes dismutases sont surproduites (Fujikawa et al., 2012).

Le superoxyde est connu pour oxyder les centres FeS des déshydratases. SoxR comme les déshydratases, possède une structure compatible avec une oxydation par le superoxyde

puisque son centre FeS est localisé à la surface de la protéine le rendant accessible. Enfin, il a été montré plus récemment par radiolyse pulsée que le superoxyde réagit avec la forme réduite de SoxR pour former du SoxR oxydé et que cette oxydation est réversible. La constante de réaction du second ordre est similaire à celle des superoxydes dismutases à manganèse et des superoxydes dismutases à fer suggérant que le superoxyde généré dans la cellule peut réagir avec la forme réduite de SoxR *in vivo*. Cependant, la concentration de superoxyde dans la cellule pourrait être trop faible pour oxyder SoxR du fait de la présence des superoxydes dismutases. Tous ces arguments soutiennent l'hypothèse que le superoxyde est le signal ressenti par le régulateur SoxR (Gu and Imlay, 2011) (Kobayashi et al., 2014).

IV. 3. 2 Activation de SoxR par les composés redox actifs

Plusieurs arguments ont conduits à reconsidérer l'hypothèse du superoxyde comme signal activant SoxR. Tout d'abord SoxR peut être activé en absence de superoxyde. En effet, SoxR peut être activé en anaérobie à condition qu'un accepteur terminal d'électron comme le nitrate ou le fumarate soit ajouté au milieu de culture. En absence d'oxygène le superoxyde ne peut pas se former. Ainsi, la respiration cellulaire, maintenue par l'oxygène ou par d'autres accepteurs terminaux d'électron est la source de l'oxydation des composés redox actifs. Le lien entre l'oxygène et l'activation de SoxR par les composés redox actifs pourrait être le recyclage des composés redox actifs en une forme active, et non la production du superoxyde. Ensuite, SoxR est faiblement activée dans les mutants des superoxydes dismutases malgré l'accumulation de suffisamment de superoxyde pour être toxique pour la cellule. De plus, un double mutant *sodAB* et un triple mutant *sodABsoxS* ont le même défaut de croissance lors d'une exposition au paraquat suggérant que la protéine SoxS n'est pas nécessaire pour lutter contre les effets toxiques du superoxyde accumulé dans ces conditions. Enfin, il a été observé que l'activation de SoxR par les composés redox actifs reste la même quand les superoxydes dismutases sont surproduites. En accord avec cette observation, la surproduction du régulon SoxRS n'améliore pas la croissance d'un mutant *sodAB* (Gort and Imlay, 1998).

Tous les arguments présentés ci-dessus ont permis de proposer que les composés redox actifs sont des signaux directement ressentis par SoxR. Ceci est aussi soutenu par le fait que le régulon SoxRS contient de nombreux gènes codant pour des enzymes impliquées dans la défense contre les composés redox actifs. De plus, des études d'oxydation du régulateur *in vitro* ont montré que le taux d'oxydation de SoxR par les composés redox actifs est très élevé comparé au taux d'oxydation par le superoxyde.

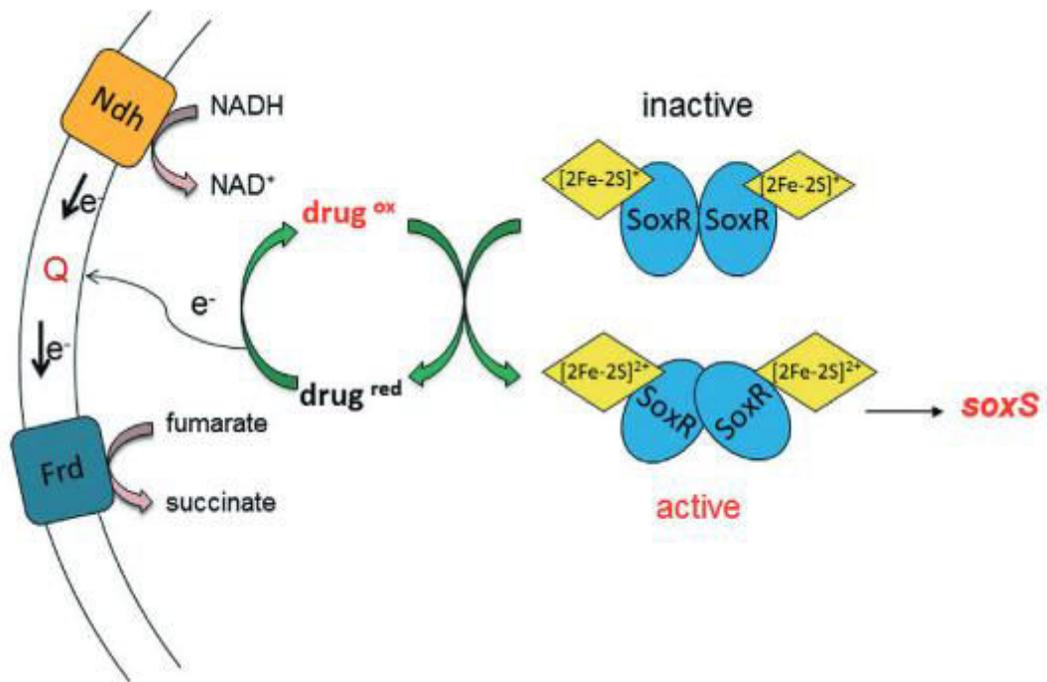


Figure 34 : Modèle de l'activation directe de SoxR par les composés redox actifs.

Les composés redox actifs (paraquat, ménadione, phénazine méthosulfate) activent directement SoxR en oxydant le centre [2Fe-2S] de SoxR. SoxR oxydée devient fonctionnelle pour l'activation transcriptionnelle du gène *soxS*. L'activation continue de SoxR par les composés redox actifs nécessite la réduction des drogues par la quinone oxydée *via* le flux d'électrons de la chaîne respiratoire (d'après Imlay, 2011).

Le mécanisme proposé pour l'activation de SoxR par les composés redox actifs est le suivant : quand les substrats de la chaîne respiratoire sont présents, les composés redox actifs transfèrent leurs électrons aux quinones. Ainsi les drogues sont recyclées ce qui leur permet d'activer la protéine SoxR d'une façon directe par l'oxydation de son centre $[2\text{Fe-2S}]^+$. Ceci aboutit à la formation d'une forme $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ (Figure 34) (Gu and Imlay, 2011) .

IV. 3. 3 Activation de SoxR par changement du pool de NADPH/NAD⁺

La protéine SoxR est maintenue à l'état réduit par des systèmes enzymatiques qui dépendent du NADPH (voir paragraphe sur les systèmes de réduction) (Koo et al., 2003) (Kobayashi et Tagawa, 1999). Il a donc été proposé que le niveau de NADPH dans la cellule affecte la réponse de SoxR. Le changement dans le pool NADPH/NADP⁺ peut notamment être provoqué par l'oxydation du NADPH (Brumaghim et al., 2003). Cette hypothèse a été testée en surproduisant dans *E. coli* des protéines qui augmentent ou diminuent le niveau de NADPH dans la cellule. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou l'enzyme malique d'*E. coli* sont connues pour réduire le NADP⁺ ce qui entraîne une accumulation de NADPH. Il a été montré que l'accumulation du NADPH inhibe le régulon SoxRS et augmente la sensibilité des cellules au paraquat. Inversement, la diminution de la concentration en NADPH *via* l'expression de la ferredoxine-NADPH-réductase provoque l'activation du régulon SoxRS ce qui entraîne une meilleure tolérance au paraquat. Ainsi, l'expression de *soxS* par l'expression de la ferredoxine peut être induite même en anaérobie.

Les résultats sur l'activation de SoxR par les composés redox actifs sont contradictoires. En effet, un mutant *zwf*, qui a un défaut dans la production de NADPH, ou les mutants des systèmes de réduction induisent très faiblement le régulon SoxRS. Les mêmes mutants exposés aux composés redox actifs ne subissent aucun changement dans l'activation de SoxR par rapport à une souche sauvage. Les différences de résultat selon les études peuvent être expliquées par la variabilité de la concentration en NADPH obtenue par chaque technique expérimentale. Mais la contribution du NADPH dans l'activation de SoxR semble mineure par rapport à l'activation de SoxR par les composés redox actifs.

Enfin, il est intéressant de noter que plusieurs gènes du régulon SoxRS et OxyR ont un lien avec le NADPH comme ceux codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la ferredoxine-NADPH réductase et la flavodoxine. Ceci suggère que l'accumulation du NADPH est nécessaire pendant un stress composés redox actifs (Pomposiello and Demple, 2000).

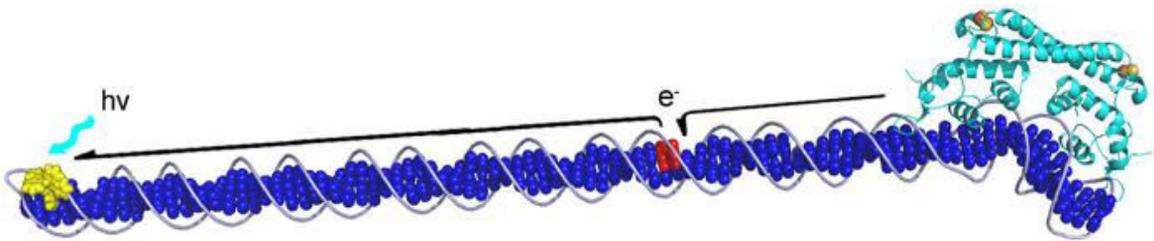


Figure 35 : Activation de SoxR par transfert de charge le long de l'ADN.

Un photooxydant (en jaune), intercalant de l'ADN (en bleu foncé) est utilisé pour oxyder la guanine (en rouge) et donner un radical guanine. Le transfert d'électron le long de l'ADN à partir de SoxR (en bleu clair), liée au promoteur cible, vers le radical guanine permet à la fois la réparation de la 8-oxoguanine et l'oxydation de SoxR. L'oxydation de SoxR active le régulateur (d'après Lee, 2009).

IV. 3. 4. Activation de SoxR par le NO

L'oxydation de SoxR peut également être provoquée par nitrosylation directe de son centre FeS. Cette modification cause habituellement l'inactivation des protéines. Cependant dans le cas de SoxR la protéine reste stable et fonctionnelle *in vitro* avec une activité similaire à celle de la forme oxydée. *In vivo*, la durée de vie de la forme nitrosylée de SoxR est courte, cette rapide disparition de SoxR nitrosylée dans la cellule suggère que des voies permettent de dégrader ou réparer SoxR (Ding and Dimple, 2000).

IV. 3. 5. Activation de SoxR par transfert des électrons sur l'ADN

Une étude récente a montrée que la protéine SoxR peut être activée par le transfert d'électrons le long de l'ADN. L'oxydation par le transfert de charge permettrait d'activer un gène à distance en utilisant les perturbations sur les paires de bases ou les lésions de l'ADN comme signaux. La protéine SoxR réduite serait capable, *in vitro*, de transférer un électron à une guanine oxydée qui se trouve à plusieurs dizaines de paires de bases. La réduction de la guanine permettrait à la fois de réparer la guanine et d'activer SoxR. Cette hypothèse est soutenue par des expériences *in vivo* montrant qu'un photooxydant intercalant de l'ADN est capable d'oxyder une guanine à distance et d'activer SoxR (Figure 35). L'activation de SoxR par transfert de charge le long de l'ADN permettrait d'induire l'expression du gène *soxS* d'une façon non négligeable comparée à son induction *via* les composés redox actifs (Lee et al., 2009b).

IV. 4. Conservation du régulon SoxRS dans le monde vivant

La protéine SoxR est largement distribuée chez les protéobactéries et les actinobactéries. Cependant, la présence de SoxS est réservée à la famille des entérobactéries, chez qui une seule boîte de fixation de SoxR en amont de *soxS* est retrouvée dans le génome. C'est le cas d'*E. coli* et *S. enterica*. Uniquement deux entérobactéries contiennent une boîte de fixation de SoxR additionnelle située en amont de gènes codant pour des dioxygénases putatives. Les organismes dépourvus de SoxS contiennent une ou plusieurs boîtes de fixation de SoxR en amont de gènes qui sont principalement classés en cinq catégories : ceux codant pour des transporteurs, des oxygénases, des déshydrogénases, de putatifs acetyl ou methyl transférases et des endoribonucléases. L'ensemble de ces gènes est potentiellement impliqué dans la transformation ou le transport de molécules antibiotiques.

Dans le monde bactérien, la majorité des régulons SoxR ne contiennent pas les gènes pour la réponse au superoxyde et l'absence de SoxR n'augmente pas la sensibilité au superoxyde (Palma et al., 2005). Cette situation est retrouvée chez des bactéries qui produisent des

composés redox actifs. Par exemple, *P. aeruginosa* a un régulon SoxR composé de gènes codant pour une pompe à efflux, de deux transporteurs et d'une monooxygénase putative. Ces gènes sont impliqués dans le transport et la modification de la pyocyanine qui est sécrétée par *P. aeruginosa* et qui sert de signal pour moduler la structure et l'organisation des communautés cellulaires (Dietrich et al., 2006). Enfin, certaines espèces peuvent répondre au stress redox actif *via* le régulon SoxRS mais en n'induisant pas les mêmes gènes que chez *E. coli*. Ainsi, lors d'une exposition au paraquat le régulon SoxRS de *S. enterica* n'induit pas la glucose 6-phosphate déshydrogénase ou la fumarase C mais induit SodA, MicF et l'endonucléase IV. La pression de sélection des différents environnements a fait évoluer *E. coli* et *S. enterica* de telle façon que le recrutement des gènes lors d'un stress redox actif ne soit pas le même pour les deux bactéries (Pomposiello and Demple, 2000). Pour conclure, la régulation de *soxS* par SoxR chez les entérobactéries apparaît être une exception évolutive. De façon intéressante, des sites de fixation de la protéine SoxR ressemblants au promoteur de *soxS* ont été retrouvés chez des bactéries qui ne contiennent pas d'homologue de SoxS. La protéine SoxS a probablement été perdue lors de l'évolution de ces organismes (Dietrich et al., 2008).

IV. 5. Différence d'activation de SoxR dans le monde vivant

Les bactéries sont exposées à une variété de composés redox actifs dans l'environnement. SoxR présente des sensibilités différentes selon l'oxydant utilisé. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence, comme le potentiel redox des drogues ainsi que leur accessibilité et leur réactivité au centre [2Fe-2S]. Ainsi, bien que la structure de SoxR des autres espèces bactériennes ait été prédite comme similaire à celle d'*E. coli*, les composés capables de d'activer SoxR sont différents. La protéine SoxR d'*E. coli* a un faible potentiel (-285 mV) ce qui provoque une forte attraction des électrons par les oxydants. De plus, son centre FeS est exposé au solvant ce qui signifie qu'une grande variété de tailles et de formes de composés redox peuvent l'approcher et l'oxyder. A la différence de la protéine SoxR d'*E. coli*, SoxR de *P. aeruginosa*, est très sélective car moins activée par certaines drogues comme le paraquat ou le ménadione. Pourtant il a été montré que son centre FeS a le même potentiel redox que celui d'*E. coli* (Ding et al., 1996) (Kobayashi and Tagawa, 2004). De façon intéressante, les composés redox actifs qui n'activent pas SoxR chez *P. aeruginosa* n'inhibent pas sa croissance. De plus, il a été montré que chez ces espèces, le paraquat et le ménadione n'induisent pas la formation des formes réactives de l'oxygène et qu'elles n'entraînent pas l'augmentation de l'oxygène consommé par la cellule. Des études précédentes ont montré que

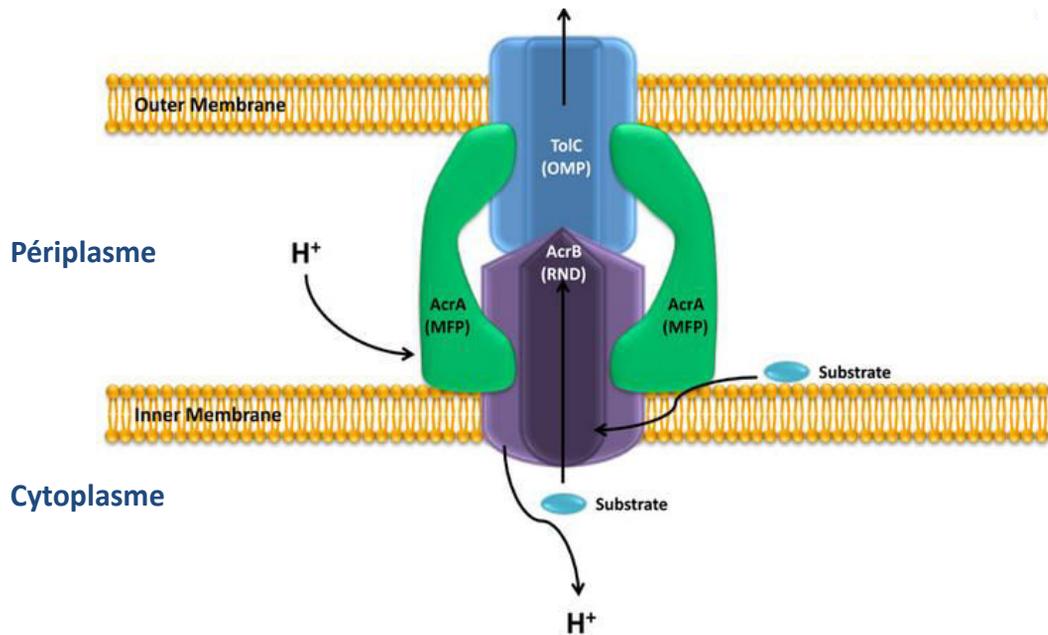


Figure 36 : Schéma représentant la pompe à efflux AcrAB-TolC.

La pompe à efflux AcrAB-TolC est codée par les gènes *acrAB* et *TolC* faisant partie du régulon SoxRS. Le système est un complexe en trois parties formé par la protéine AcrB qui se situe dans la membrane interne, la protéine TolC qui fait partie de la membrane externe et la protéine AcrA qui fait le lien entre AcrB et TolC. L'activité du complexe est couplée au gradient de proton. La pompe à efflux fait sortir les antibiotiques de la cellule (d'après Alvarez-Ortega, 2013).

chez *S. coelicolor* SoxR joue un rôle de protection contre l'actinorhodin et le plumbagin qu'elle sécrète. La sensibilité de SoxR des bactéries qui sécrètent des composés redox actifs pourrait donc être réduite à la détection de ces drogues afin de limiter la réponse de SoxR uniquement en présence des drogues. Deux acides aminés autour du centre [2Fe-2S] de SoxR seraient déterminants pour sa sensibilité aux composés redox actifs. L'arginine 127 et la proline 131 situés juste avant les quatre cystéines coordonnant le centre FeS ont été montrés comme étant important pour la sensibilité au paraquat (Chander and Demple, 2004). Les mutations de ces acides aminés chez *E. coli* entraînent une augmentation du potentiel redox suivi d'un changement de sélectivité de la protéine face aux composés redox actifs et conduit à la même réactivité que chez *S. coelicolor* et à une insensibilité au paraquat (Shin et al., 2011) (Perrin and Ichiye, 2013) (Shin et al., 2011) (Lee et al., 2015).

IV. 6. Activation de SoxR et résistance aux antibiotiques

Chez *E. coli* et *S. enterica* l'activation du régulon SoxRS confère une résistance à de multiples antibiotiques. En effet, une activation du régulon par le paraquat ou l'expression constitutive de la protéine SoxR augmente la résistance à l'ampicilline, à l'acide nalidixique, au chloramphénicol et à la tétracycline (Koutsolioutsou et al., 2001) (Koutsolioutsou et al., 2005). Des isolats cliniques d'*E. coli*, multirésistants aux antibiotiques, ont été montrés pour avoir une mutation dans le promoteur de *soxS*, ou dans le gène *soxS*, une transversion changeant une alanine en sérine (Aly et al., 2015). Une mutation dans le gène *soxR* provoque aussi une augmentation du niveau basal de SoxS en absence de stress oxydatif (détails effet sur DNA binding) (Koutsolioutsou et al., 2005).

Les gènes *micF* et *acrAB* sont les principaux effecteurs de la résistance d'*E. coli* aux antibiotiques. L'activation du régulon SoxRS entraîne l'expression de la pompe à efflux et une augmentation de la résistance aux quinolones et au chloramphénicol. La pompe à efflux AcrAB-TolC, retrouvée dans le régulon SoxRS, est l'une des pompes les plus associée à la résistance d'*E. coli* aux antibiotiques. Ce complexe de trois protéines comporte une protéine du périplasma appelé AcrA reliant deux autres protéines, AcrB le composant de la membrane interne, et TolC le tunnel de la membrane externe (Figure 36). Cette organisation permet la sortie des substrats de la cellule vers le milieu extérieur en passant par le périplasma et la membrane externe (Cristóbal et al., 2006). L'expression de l'opéron *acrAB* est aussi régulée par AcrR et AcrS et par MarA.

D'autre part, le petit ARN antisens MicF régule négativement la porine de la membrane externe, OmpF. Une augmentation de son expression par activation de SoxRS entraîne une

diminution de la perméabilité des cellules les rendant également résistantes à certains antibiotiques.

Résultats

Partie I

Etude de la maturation du régulateur transcriptionnel à centre FeS SoxR

[Ménadione] (mM)

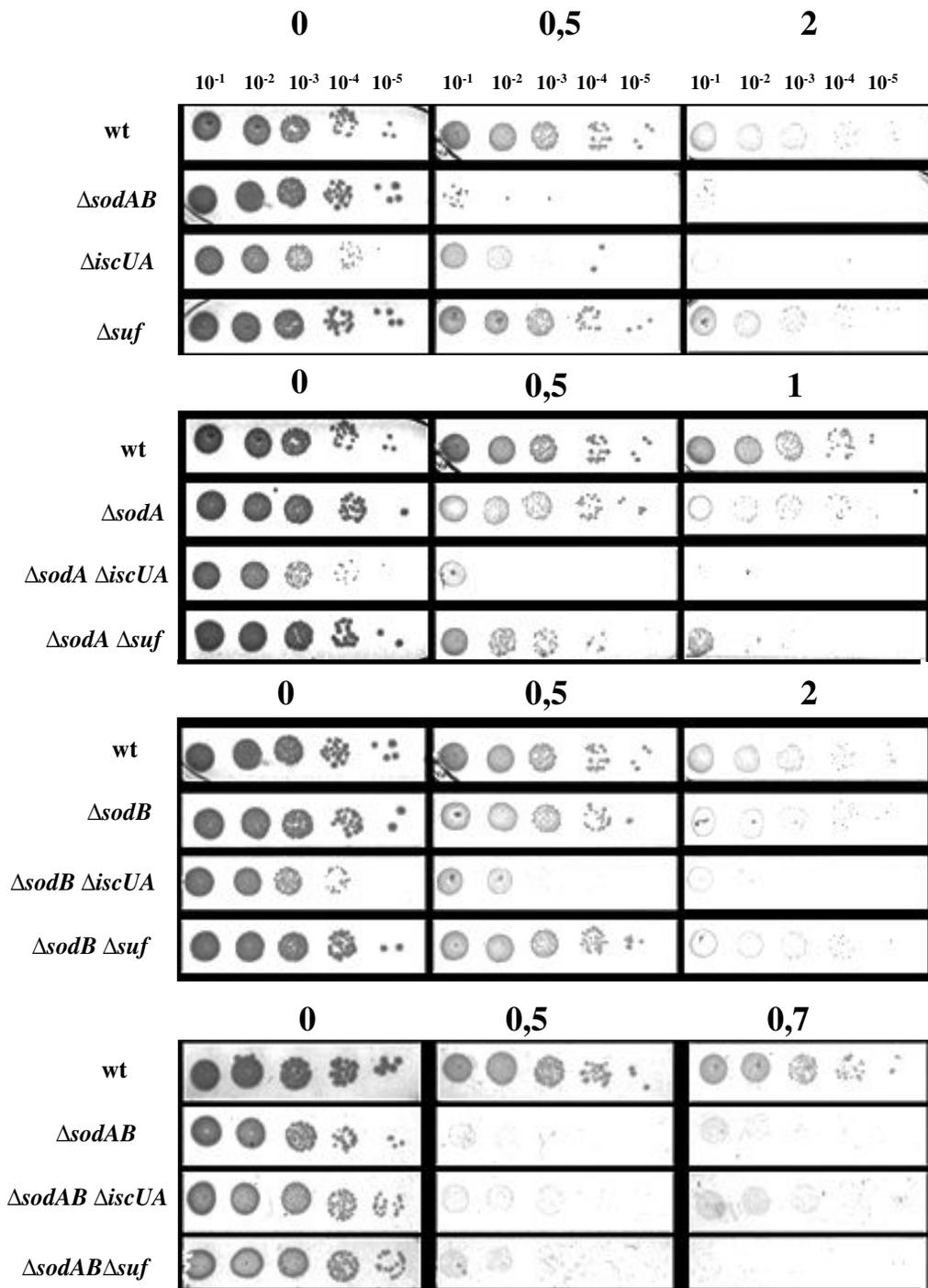


Figure 1 : Importance des machineries ISC et SUF pour la résistance d'*E. coli* au ménadione
 Les souches MG1655 (wt), BP196 ($\Delta iscUA$), BP198 (Δsuf), AG011 ($\Delta sodA$), BE258 ($\Delta sodB$), BE259 ($\Delta sodAB$), AG004 ($\Delta sodA \Delta iscUA$), AG005 ($\Delta sodB \Delta iscUA$), AG006 ($\Delta sodA \Delta suf$), AG007 ($\Delta sodB \Delta suf$), AG024 ($\Delta sodAB \Delta iscUA$), AG025 ($\Delta sodAB \Delta iscUA$) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance puis diluées et déposées sur boîte LB agar contenant différentes concentrations de ménadione. Après 16h d'incubation à 37°C la croissance des souches est analysée.

I. Contribution des machineries ISC et SUF à la résistance au stress superoxyde en aérobie

I.1. Les machineries ISC et SUF permettent à *E. coli* de résister au stress superoxyde

Les composés redox actifs soustraient un électron à des protéines ayant comme cofacteur une flavine ou un centre métallique, et sont classiquement considérés comme des agents générant du superoxyde. Chez *E. coli*, les composés redox actifs sont connus pour induire le régulon SoxRS. J'ai testé la sensibilité de mutants, altérés dans la biogénèse des centres FeS, lors d'un stress en présence des composés redox actifs suivant : le paraquat, le ménadione et le phénazine méthosulfate (PMS). Pour cela j'ai utilisé le mutant $\Delta iscUA$, dans lequel la protéine d'échafaudage et la protéine de transfert du centre FeS, de la machinerie ISC, sont inactivées, et un mutant Δsuf , dépourvu de la totalité de l'opéron *sufABCDSE*. Pour tester la résistance des mutants $\Delta iscUA$ et Δsuf au paraquat, au ménadione et au phénazine méthosulfate, les souches ont été cultivées en milieu riche jusqu'en début de phase exponentielle de croissance, puis après dilution des cultures, un aliquot de chaque dilution a été déposé sur une boîte LB agar supplémentée ou non avec différentes concentrations de drogue après 16 heures d'incubation. La capacité des souches à former des colonies a été analysée.

Les résultats obtenus montrent que le mutant $\Delta iscUA$ est hypersensible au ménadione, et se comporte comme la souche sauvage en présence de PMS et paraquat (Figure 1, Figure 2, et Figure 3). Le mutant Δsuf est lui hypersensible au PMS, et se comporte comme la souche wt en présence de ménadione et de paraquat (Figure 1, Figure 2, et Figure 3). Ces résultats indiquent que les machineries de biogénèse des centres FeS sont requises pour la croissance d'*E. coli* en présence de composés redox actifs. La raison pour laquelle des composés ayant à priori la même activité rédox, PMS et paraquat, font apparaître des contributions différentes entre les machineries ISC et SUF reste à expliquer.

Afin d'accroître le stress superoxyde intracellulaire causé par les composés redox actifs, j'ai ensuite construit des souches affectées dans l'élimination du superoxyde. Le gène *sodA* code pour la superoxyde dismutase à manganèse et le gène *sodB* code pour la superoxyde dismutase à fer. J'ai donc construit les souches suivantes : $\Delta sodA$, $\Delta sodA \Delta iscUA$, $\Delta sodB \Delta iscUA$, $\Delta sodAB \Delta iscUA$ et $\Delta sodA \Delta suf$, $\Delta sodB \Delta suf$, $\Delta sodAB \Delta suf$ dont j'ai analysé la sensibilité au paraquat, au ménadione et au phénazine méthosulfate.

[Paraquat] (μM)

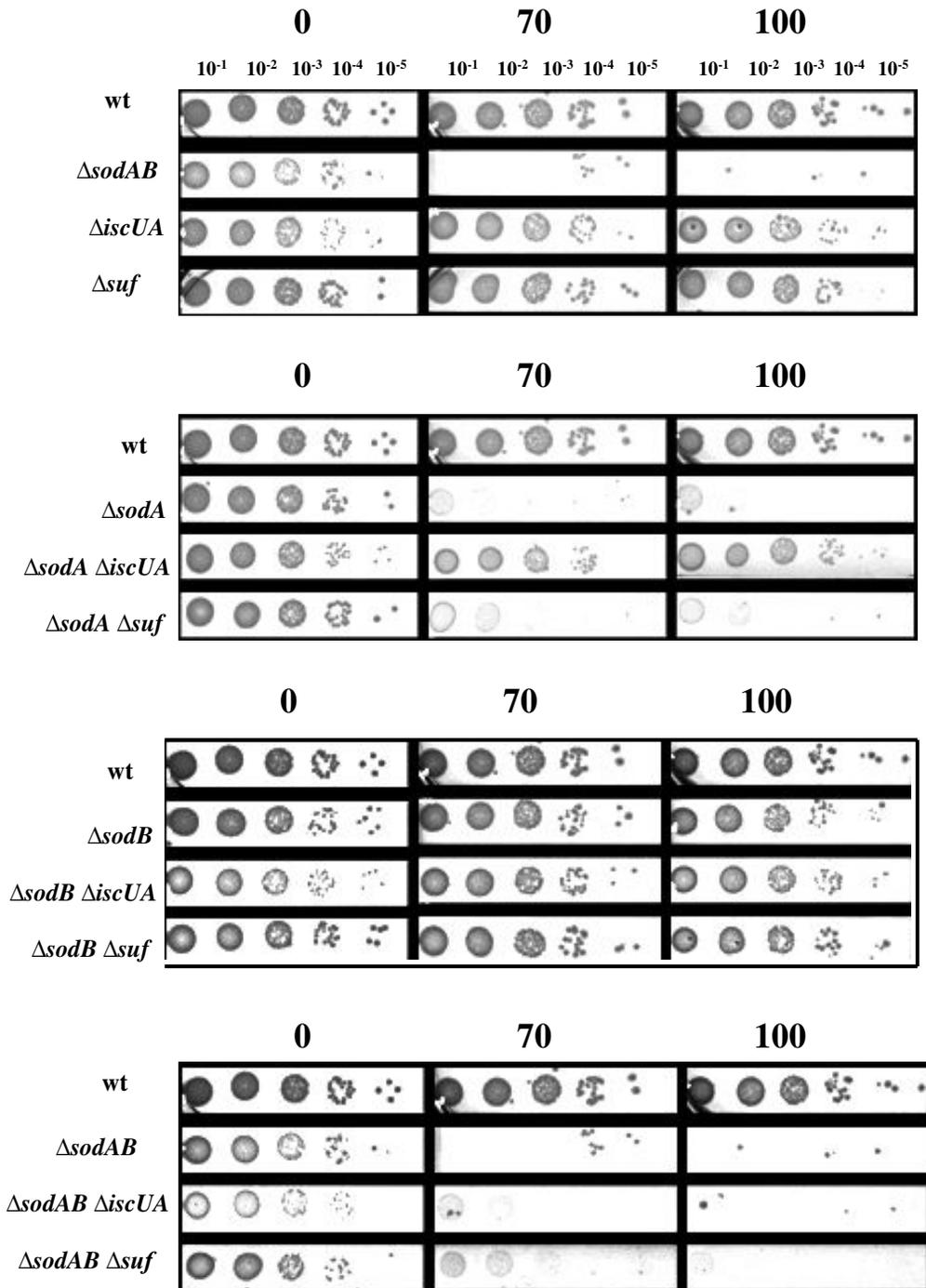
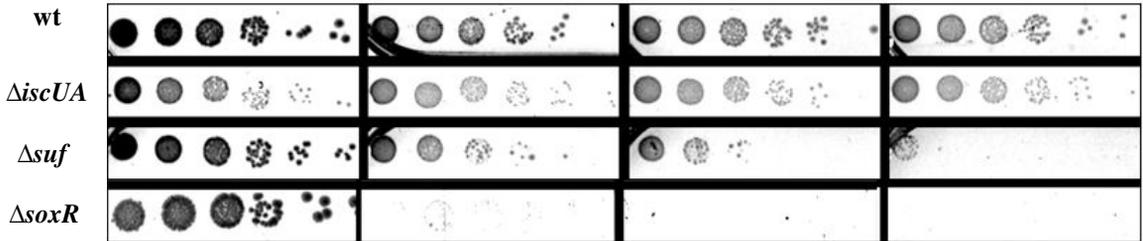


Figure 2 : Importance des machineries ISC et SUF pour la résistance d'*E. coli* au paraquat
 Les souches MG1655 (wt), BP196 ($\Delta iscUA$), BP198 (Δsuf), AG011 ($\Delta sodA$), BE258 ($\Delta sodB$), BE259 ($\Delta sodAB$), AG004 ($\Delta sodA \Delta iscUA$), AG005 ($\Delta sodB \Delta iscUA$), AG006 ($\Delta sodA \Delta suf$), AG007 ($\Delta sodB \Delta suf$), AG024 ($\Delta sodAB \Delta iscUA$), AG025 ($\Delta sodAB \Delta iscUA$) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance puis diluées et déposées sur boîte LB agar contenant différentes concentrations de paraquat. Après 16h d'incubation à 37°C la croissance des souches est analysée.

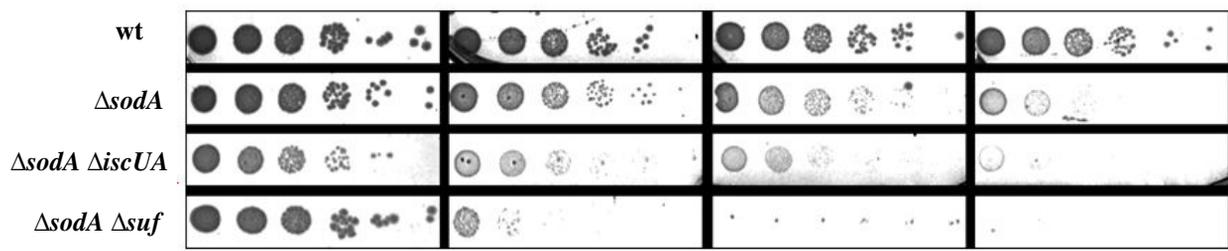
[PMS] (μM)

0 30 40 50

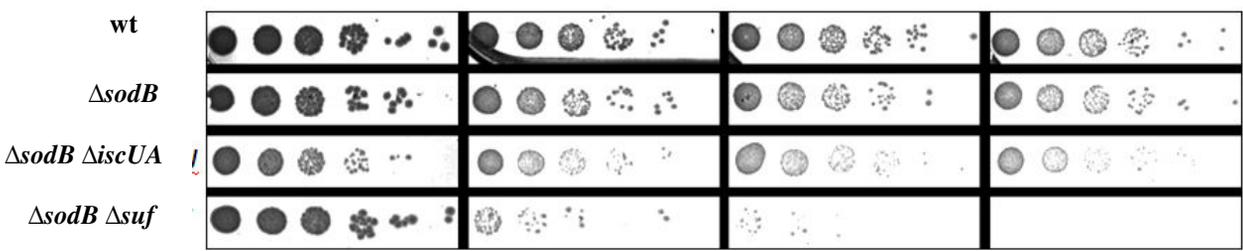
10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}



0 30 40 50



0 30 40 50



0 10 20 30

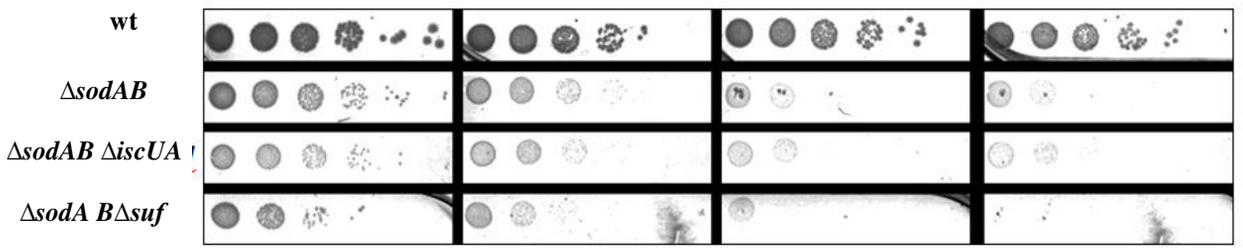


Figure 3 : Importance des machineries ISC et SUF pour la résistance d'*E. coli* au PMS

Les souches MG1655 (wt), AG035 (ΔsoxR), BP196 (ΔiscUA), BP198 (Δsuf), AG011 (ΔsodA), BE258 (ΔsodB), BE259 (ΔsodAB), AG004 ($\Delta\text{sodA } \Delta\text{iscUA}$), AG005 ($\Delta\text{sodB } \Delta\text{iscUA}$), AG006 ($\Delta\text{sodA } \Delta\text{suf}$), AG007 ($\Delta\text{sodB } \Delta\text{suf}$), AG024 ($\Delta\text{sodAB } \Delta\text{iscUA}$), AG025 ($\Delta\text{sodAB } \Delta\text{iscUA}$) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance puis diluées et déposées sur boîte LB agar contenant différentes concentrations de PMS. Après 16h d'incubation à 37°C la croissance des souches est analysée.

Les résultats montrent que les mutants $\Delta sodA$ et $\Delta sodB$ sont plus sensibles au ménadione que la souche sauvage (Figure 1). De plus, le mutant $\Delta sodA$ est plus affecté par le ménadione (1 mM de ménadione) que le mutant $\Delta sodB$ (2 mM de ménadione). L'introduction de la mutation *sodA* dans les mutants $\Delta iscUA$ et Δsuf aggrave leurs sensibilités respectives au ménadione. En effet, la sensibilité au ménadione d'un $\Delta sodA \Delta iscUA$ est plus forte que celle du mutant $\Delta iscUA$ (perte d'1 log), et celle d'un mutant $\Delta sodA \Delta suf$ plus forte que celle d'un mutant Δsuf .

En revanche, un mutant $\Delta sodB \Delta iscUA$ n'est pas plus sensible au ménadione qu'un mutant $\Delta iscUA$. De la même façon, un mutant $\Delta sodB \Delta suf$ n'est pas plus sensible au ménadione qu'un mutant Δsuf . En revanche, les mutants, $\Delta sodAB$, $\Delta sodAB \Delta suf$ et $\Delta sodAB \Delta iscUA$ sont extrêmement sensibles au ménadione.

L'absence des superoxydes dismutases SodA et SodB aggrave donc la sensibilité des souches dépourvues des machineries de biogénèse. En particulier, cette stratégie permet d'observer que la machinerie SUF est mise en contribution dès que l'une ou l'autre des superoxydes dismutases est absente.

Le mutant $\Delta sodA$ est extrêmement sensible au paraquat (70 et 100 μM) par rapport à la souche sauvage (Figure 2). Le mutant $\Delta sodB$ n'est pas affecté par le paraquat aux concentrations testées. L'introduction de la mutation $\Delta sodA$ aggrave la sensibilité au paraquat du mutant Δsuf mais pas celle du mutant $\Delta iscUA$. On peut même voir que dans ce dernier cas, la mutation $\Delta iscUA$ a un effet « bénéfique » sur le mutant $\Delta sodA$, le mutant $\Delta iscUA \Delta sodA$ étant plus résistant que chacun des deux « simples » mutants. Ainsi, de nouveau l'augmentation de stress superoxyde intracellulaire accrue par l'ablation de SodA permet de révéler la contribution de la machinerie SUF à la résistance au paraquat.

L'introduction de la mutation *sodB*, n'a aucun effet ni « aggravant » ni « bénéfique » quand elle est combinée avec les mutations $\Delta iscUA$ et Δsuf .

Enfin, les mutants, $\Delta sodAB \Delta suf$ et $\Delta sodAB \Delta iscUA$ sont extrêmement sensibles au paraquat comme la souche $\Delta sodAB$.

Le mutant $\Delta sodA$ est plus sensible au PMS que la souche sauvage (visible à partir de 40 μM de PMS) alors que le mutant $\Delta sodB$ est résistant aux concentrations testées (Figure 3). Le mutant $\Delta sodA \Delta suf$ est plus sensible au PMS qu'un mutant Δsuf . Le mutant $\Delta iscUA$, qui n'est pas sensible au PMS, le devient en absence du gène *sodA*. De même, l'introduction de la mutation $\Delta sodB$ dans les fonds génétiques $\Delta iscUA$ et Δsuf augmente considérablement la sensibilité au PMS.

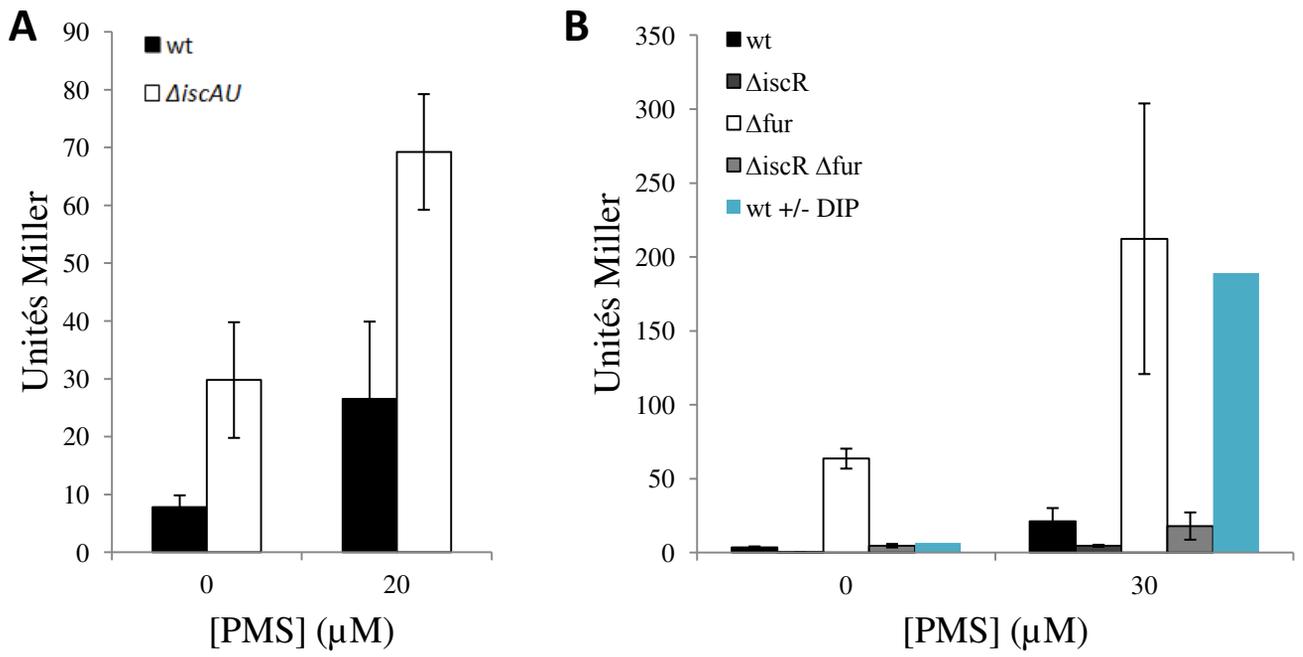


Figure 4 : L'expression de l'opéron *suf* est induite lors d'une exposition au PMS en aérobie. (A) Les souches PM2081 (WT) (noir) et AG055 ($\Delta iscUA$) (blanc) et les souches (B) PM2081 (WT) (noir), FG003 ($\Delta iscR$) (gris foncé), FG004 (Δfur) (blanc), FG020 ($\Delta iscR\Delta fur$) (gris clair) contenant la fusion $P_{sufA}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux : sans PMS ou avec ajout de PMS (20 μM ou 30 μM) (B) ou sans et avec le 2-2' dipyridyl (250 μM) (bleu). Les souches sont incubées pendant deux heures puis l'activité β -galactosidase est mesurée. L'expérience a été réalisée 3 fois excepté pour celle effectuée en présence de 2-2' dipyridyl.

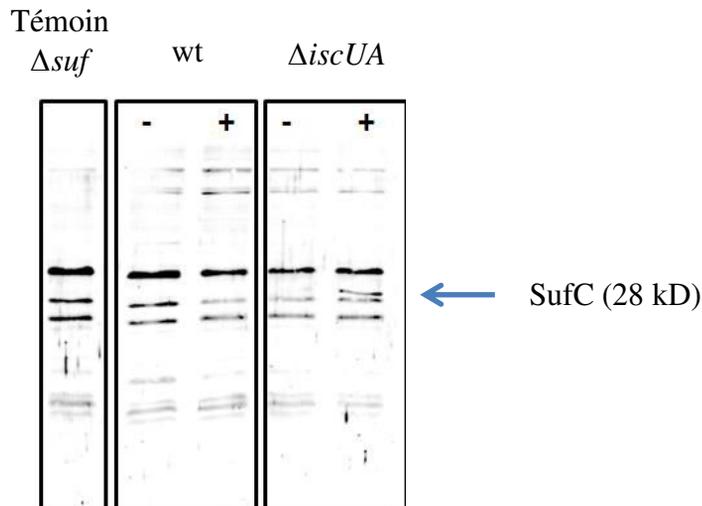


Figure 5 : La machinerie SUF est produite lors d'une exposition au PMS en aérobie. Les souches BE1000 (WT), AG030 ($\Delta iscUA$) et AG031 (Δsuf) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux : sans PMS (-) ou avec ajout de PMS (+). Les souches sont incubées pendant deux heures puis des échantillons sont prélevés pour réaliser un western blot en utilisant un anti-corps anti-SufC.

En conclusion, les machineries ISC et SUF contribuent à la capacité de *E. coli* à résister au stress superoxyde qu'il soit produit par l'un ou l'autre des trois composés redox actifs - PMS, ménadione ou paraquat - utilisés. Des différences de toxicité/sensibilité entre les trois composés ont toutefois été notées lorsque les souches testées synthétisaient les enzymes combattant le stress superoxyde (SodA, SodB). Etant donné que les trois composés sont prédits pour exercer le même type de toxicité, les raisons pour de telles différences restent inconnues. Toutefois, l'ablation des SodA/B a permis d'éliminer ces différences et mis en évidence la contribution des deux machineries pour résister aux effets toxiques des trois composés.

I.2. L'expression des opérons *isc* et *suf* est induite en présence de PMS

I.2.1. Régulation de l'expression de l'opéron *suf*

Afin de savoir si l'opéron *suf* est induit en présence de PMS, j'ai utilisé une souche (PM2081) portant la fusion transcriptionnelle chromosomique $P_{sufA}::lacZ$. La souche a été cultivée en milieu riche jusqu'en début de phase exponentielle, puis la culture a été partagée en deux sous cultures. Dans l'une des sous cultures, le PMS a été rajouté à une concentration de 20 μ M, et l'autre sous culture a servi de témoin sans addition de PMS. L'activité β -galactosidase a été mesurée dans les sous cultures après deux heures d'incubation à 37°C. Les résultats obtenus montrent que l'ajout de PMS induit l'expression de la fusion $P_{sufA}::lacZ$ d'un facteur 3,4 (Figure 4A).

J'ai voulu tester si dans le mutant $\Delta iscAU$ l'induction de l'opéron *suf* par le PMS, est également observée. Les résultats obtenus montrent que dans un mutant $\Delta iscAU$ l'ajout de PMS induit l'expression de la fusion $P_{sufA}::lacZ$ d'un facteur 2,3 (Figure 4A). On peut également noter que l'expression de la fusion $P_{sufA}::lacZ$ dans le mutant $\Delta iscAU$ est 3,8 fois plus élevée que pour la souche wt en absence de PMS et 2,6 fois plus élevée en présence de 20 μ M de PMS.

J'ai réalisé un western blot anti-SufC, sur des extraits issus de la souche wt et du mutant $\Delta iscUA$ ayant été traités ou non avec le PMS. La protéine SufC est détectée seulement dans les cellules du mutant $\Delta iscUA$ traité avec le PMS (Figure 5). Ce résultat est en accord avec ceux de l'expression de la fusion $P_{sufA}::lacZ$.

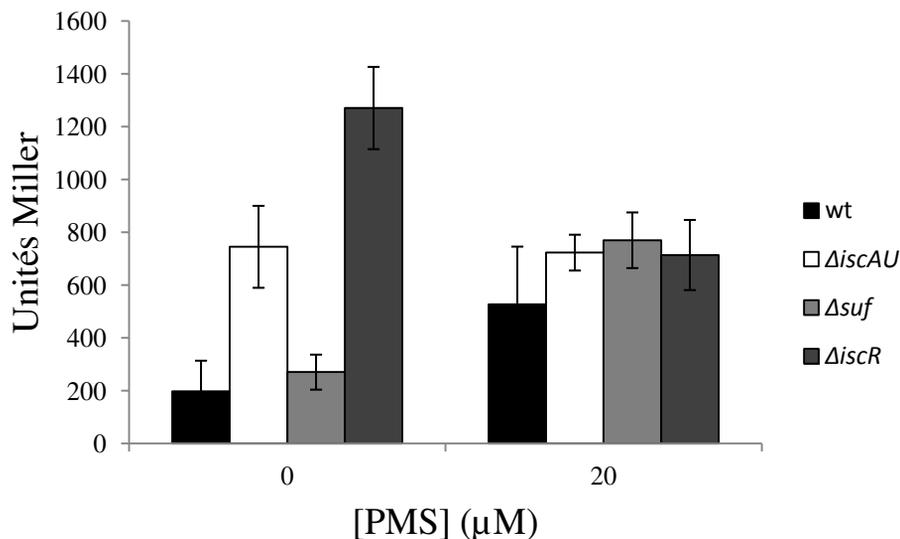


Figure 6 : L'expression de l'opéron *isc* est induite lors d'une exposition au PMS en aérobie.

Les souches DV901 (WT) (noir), DV922 ($\Delta iscUA$) (blanc), DV915 ($\Delta iscR$) (gris foncé), BR239 (Δsuf) (gris clair), contenant la fusion $P_{iscR}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux : sans ajout de PMS ou avec ajout de PMS (20 μM). Les cultures sont incubées pendant deux heures puis l'activité β -galactosidase est mesurée. L'expérience a été réalisée plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

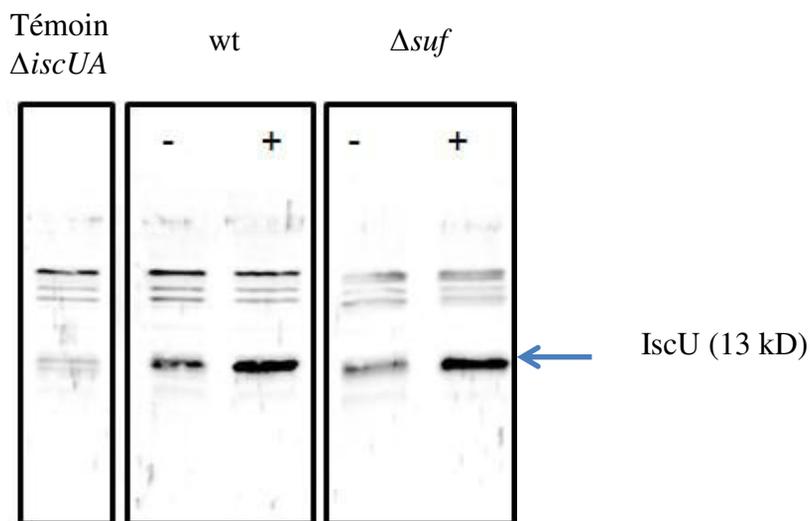


Figure 7 : La machinerie ISC est produite lors d'une exposition au PMS en aérobie.

Les souches BE1000 (WT), AG030 ($\Delta iscUA$) et AG031 (Δsuf) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux : sans PMS (-) ou avec ajout de PMS (+). Les souches sont incubées pendant deux heures puis des échantillons sont prélevés pour réaliser un western blot en utilisant des anti-corps anti-IscU.

J'ai cherché à déterminer si les régulateurs Fur et IscR interviennent dans l'induction de la fusion $P_{sufA}::lacZ$ par le PMS. J'ai donc mesuré l'activité de la fusion $P_{sufA}::lacZ$ dans les mutants Δfur , $\Delta iscR$ et $\Delta iscR \Delta fur$ en présence de PMS. Les résultats montrent que dans les mutants Δfur , $\Delta iscR$ et $\Delta iscR \Delta fur$, l'expression de la fusion $P_{sufA}::lacZ$ est toujours induite par le PMS, d'un facteur 3,3 dans le mutant Δfur , d'un facteur 25 dans le mutant $\Delta iscR$, et d'un facteur 3,8 dans le double mutant $\Delta iscR \Delta fur$ (Figure 4B). Ces résultats suggèrent que les régulateurs IscR et Fur ne sont pas impliqués dans l'induction de l'opéron *suf* par le PMS.

I.2.2. Régulation de l'expression de l'opéron *isc*

Pour savoir si l'opéron *isc* est exprimé en présence de PMS dans la souche wt et le mutant Δsuf , j'ai utilisé la souche DV901, construite au laboratoire, portant une fusion transcriptionnelle chromosomique $P_{iscR}::lacZ$. La souche a été cultivée en milieu riche jusqu'en début de phase exponentielle de croissance, puis la culture a été partagée en deux sous cultures. Dans l'une des sous cultures, le PMS a été rajouté à une concentration de 20 μ M, alors que l'autre sous culture a servi de témoin sans addition de PMS. L'activité β -galactosidase a été mesurée dans les sous cultures après deux heures d'incubation à 37°C. Les résultats obtenus montrent que l'ajout de PMS induit l'expression (facteur 2,6) de la fusions $P_{iscR}::lacZ$ (Figure 6). Un niveau similaire d'induction d'expression de la fusion $P_{iscR}::lacZ$ est obtenu dans le mutant Δsuf (facteur 2,8).

J'ai pu montrer, par western blot anti-IscU, une augmentation de la quantité de IscU dans les cellules de la souche wt et Δsuf exposées au PMS (Figure 7). Ce résultat est en accord avec ceux de l'expression de la fusion $P_{iscR}::lacZ$.

Le seul régulateur transcriptionnel connu pour réguler l'opéron *isc* est IscR. IscR sous forme holo se fixe sur la région promotrice de l'opéron *isc* et réprime son expression. Pour tester si l'induction de la fusion $P_{iscR}::lacZ$, après ajout de PMS, résulte de la levée de la répression de IscR, j'ai utilisé une souche $\Delta iscR$ portant la fusion $P_{iscR}::lacZ$. Les résultats montrent que la fusion $P_{iscR}::lacZ$ dans le mutant $\Delta iscR$, est réprimée d'un facteur 1,8 en présence de PMS. Pour l'heure ce résultat surprenant n'est pas expliqué (Figure 6). Les résultats obtenus avec le mutant $\Delta iscUA$ montrent qu'il n'y a pas d'induction de l'expression de la fusion $P_{iscR}::lacZ$ par le PMS (Figure 6). Une hypothèse simple est que dans le mutant le $\Delta iscUA$, le PMS n'a plus d'effet car IscR est sous forme apo. En provoquant le passage de la forme holo-IscR à la forme apo-IscR le PMS induirait l'expression de l'opéron *isc*.

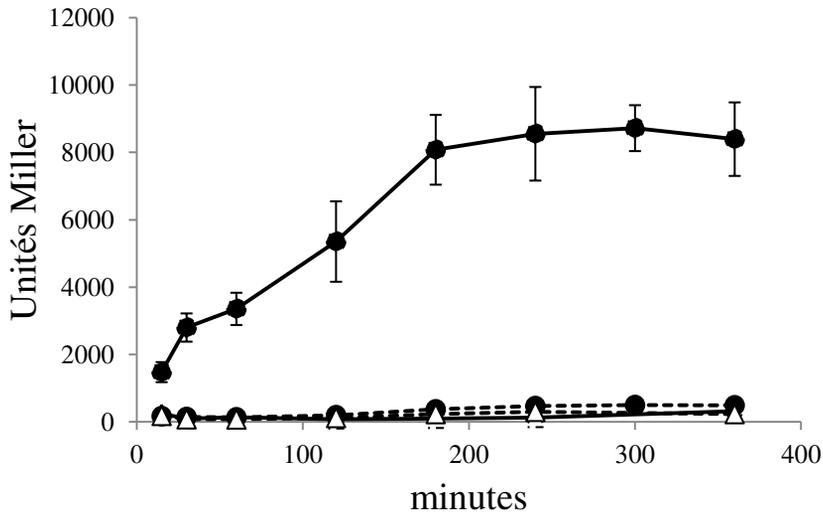
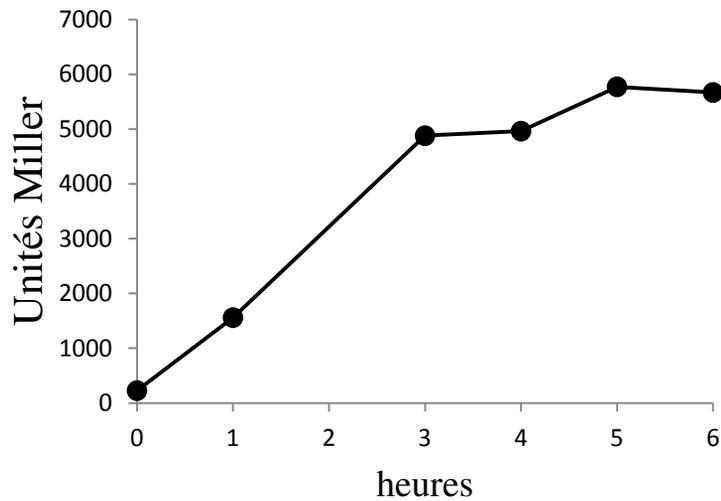
A**B**

Figure 8 : L'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite en présence de PMS via SoxR.

(A) Les souches BE1000 (WT) (●) et AG035 ($\Delta soxR$) (Δ) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en aérobie et en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux sous culture : dans l'une du PMS (30 μ M) est rajouté (trait plein), et dans l'autre non (pointillé). L'activité β -galactosidase est mesurée au cours du temps. Le temps 0 correspond au temps où le PMS a été ajouté. L'expérience a été réalisée plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés. (B) La même expérience a été réalisée sur la souche BE1000 (WT) en rajoutant une 2^e dose de PMS au temps 180 minutes.

En conclusion les opérons codants pour les machineries ISC et SUF sont induits en présence de PMS. Ceci est cohérent avec le fait que les deux machineries sont importantes pour la résistance au stress PMS. L'induction de l'opéron *isc* résulte de la dérégulation médiée par IscR et celle de l'opéron *suf* est indépendante de IscR et Fur.

II. Biogénèse de SoxR en aérobie

SoxR est un régulateur transcriptionnel à centre FeS qui assure la réponse adaptative aux composés redox actifs. Les composés redox actifs oxydent le centre FeS de SoxR qui va alors activer l'expression de *soxS*, codant pour un second régulateur transcriptionnel. L'activation des gènes du régulon SoxRS permettent à la bactérie de résister aux composés redox actifs. Lorsque le stress est éliminé SoxR retourne à son état réduit grâce à un système de réduction. J'ai étudié l'importance des machineries de biogénèse des centres FeS sur la maturation de SoxR. Pour cela il était nécessaire de disposer d'un « read-out » permettant de mesurer l'efficacité de maturation de SoxR.

II.1. Stratégie utilisée pour mesurer l'activité de SoxR

J'ai utilisé l'expression d'une fusion traductionnelle $P_{soxS}::lacZ$ comme « read-out » de l'activité SoxR. En effet, l'activité de SoxR se traduit par l'induction, par le superoxyde, de l'expression de *soxS*. La souche BE1000 (wt) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ a été cultivée en milieu riche jusqu'en début de phase exponentielle de croissance, puis la culture a été partagée en deux sous-cultures. Dans l'une des sous-cultures, le PMS a été rajouté à une concentration de 30 μ M, alors que l'autre sous-culture a servi de témoin sans addition de PMS. L'activité β -galactosidase a été calculée à partir d'échantillons prélevés à différents temps après ajout de PMS.

Les résultats obtenus montrent que 15 minutes après l'ajout de PMS, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite 8,6 fois (Figure 8A). L'expression de la fusion dans les souches traitées avec le PMS augmente au cours du temps et atteint un plateau après 180 minutes d'incubation. L'addition d'une deuxième dose de PMS (25 μ M) après 180 minutes d'exposition, ne modifie pas l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$, indiquant que dans les conditions utilisées le PMS n'est pas en quantité limitante pour oxyder SoxR (Figure 8B). Pour vérifier que l'induction de l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$, en présence de PMS, est dépendante de SoxR, j'ai supprimé le gène *soxR* dans la souche BE1000. Les mesures

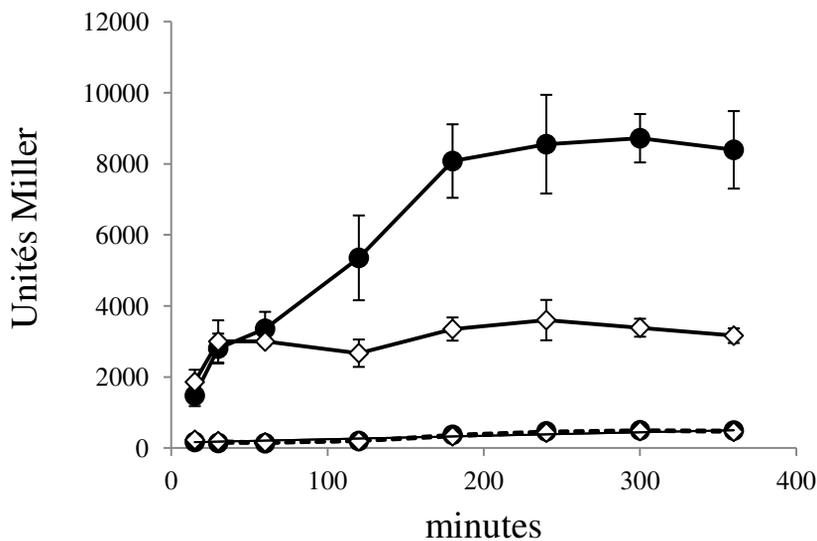


Figure 9 : En aérobie, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est affectée dans le mutant Δsuf en présence de PMS.

Les souches BE1000 (WT) (●) et AG031 (Δsuf) (◇) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux sous cultures : l'une sans PMS (pointillé), et l'autre avec ajout de PMS (30 μ M) (trait plein). L'activité β -galactosidase est mesurée au cours du temps. Le temps 0 correspond à l'ajout du PMS dans la culture. L'expérience a été réalisée plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

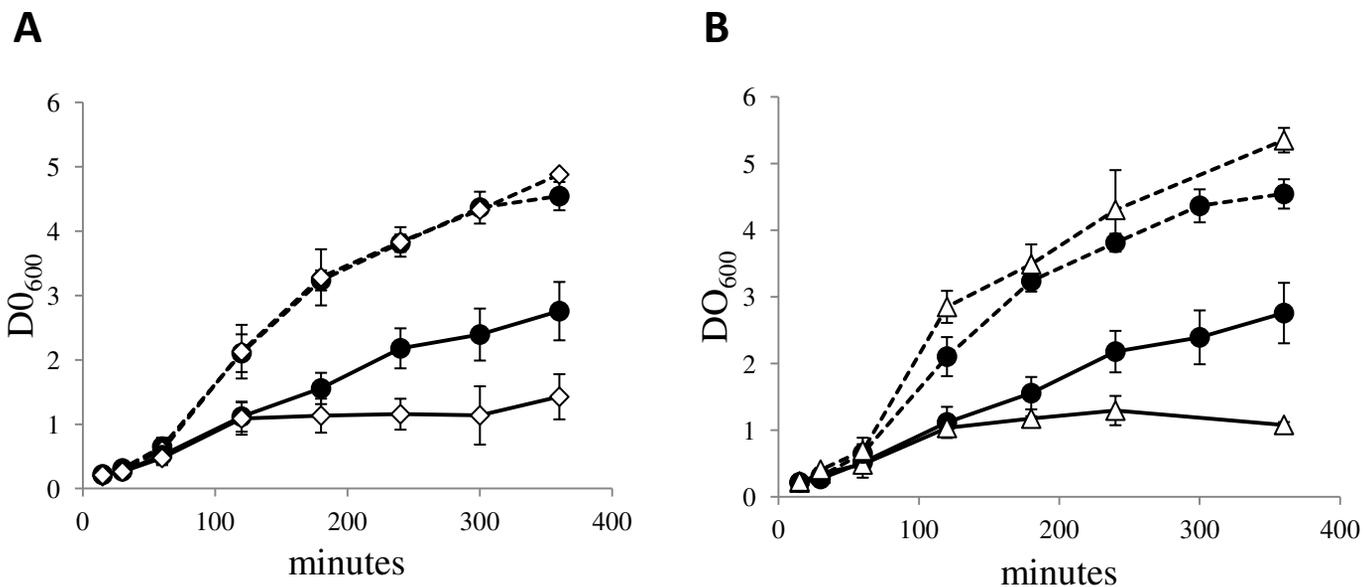


Figure 10 : La croissance du mutant Δsuf est affectée en présence de PMS.

(A) Les souches BE1000 (WT) (●), AG031 (Δsuf) (◇) et (B) AG035 ($\Delta soxR$) (Δ) sont cultivées en aérobie et en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux : sans PMS (pointillé) ou avec ajout de PMS (30 μ M) (trait plein). La DO_{600} est mesurée au cours du temps. Le temps 0 correspond à l'ajout du PMS dans la culture. L'expérience a été réalisée plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

d'activité β -galactosidase réalisées dans le mutant $\Delta soxR$ montrent que l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ n'est pas induite en présence de PMS (Figure 8A). L'ensemble de ces résultats indique que l'expression de la fusion traductionnelle $P_{soxS}::lacZ$ présente les caractéristiques attendues, à savoir l'induction en présence de PMS de manière SoxR-dépendante, et peut donc être utilisée comme « read out » de l'efficacité de maturation de SoxR.

II.2. Contribution de la machinerie SUF à la maturation de SoxR

II.2.1. La machinerie SUF est importante pour la maturation de SoxR en stress PMS aérobie

J'ai testé l'importance de la machinerie SUF dans la maturation de SoxR. L'activité de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans la souche AG031 (Δsuf), a été mesurée à différents temps tout au long de la croissance, en présence ou en absence de PMS. Aux temps 15 min, 30 min, et 60 min, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans le mutant Δsuf est identique à celle de la wt (Figure 9). En revanche, au temps 120 min l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est diminuée d'un facteur 2 dans le mutant Δsuf , et aux temps 180 min, 240 min, 300 min, et 360 min, elle est diminuée d'un facteur 2,5. Ces résultats suggèrent que la machinerie SUF est nécessaire pour la maturation de SoxR une heure après l'ajout de PMS.

L'effet du PMS sur la croissance du mutant Δsuf a été suivi par la mesure de la DO_{600} . La croissance du mutant Δsuf est identique à celle de la souche wt jusqu'au temps 120 minutes après ajout de PMS, puis la croissance s'arrête après 180 minutes (Figure 10A). De façon similaire, la croissance du mutant $\Delta soxR$ s'arrête au bout de 180 minutes d'incubation avec le PMS (Figure 10B). Bien que les valeurs de la DO_{600} atteintes au bout de 120 minutes par le mutant Δsuf et la souche sauvage soient les mêmes, j'ai voulu savoir si les viabilités des deux souches étaient identiques. Pour cela, la souche wt et le mutant Δsuf ont été cultivés en milieu riche jusqu'en début de phase exponentielle, puis les cultures ont été traitées ou non avec du PMS (30 μ M) pendant 120 minutes. Le nombre de cellules viables (unité formant colonies, cfu) a été déterminé au temps zéro (ufc_{t_0}) et au temps 120 minutes ($ufc_{t_{120}}$). Les résultats obtenus montrent qu'en présence de PMS (30 μ M), le ratio $ufc_{t_{120}}/ufc_{t_0}$ pour le mutant Δsuf est 2,2 fois plus bas, comparé à la souche wt (Figure 11A). L'ensemble des résultats obtenus indique qu'au temps 120 minutes la viabilité du mutant Δsuf est déjà affectée.

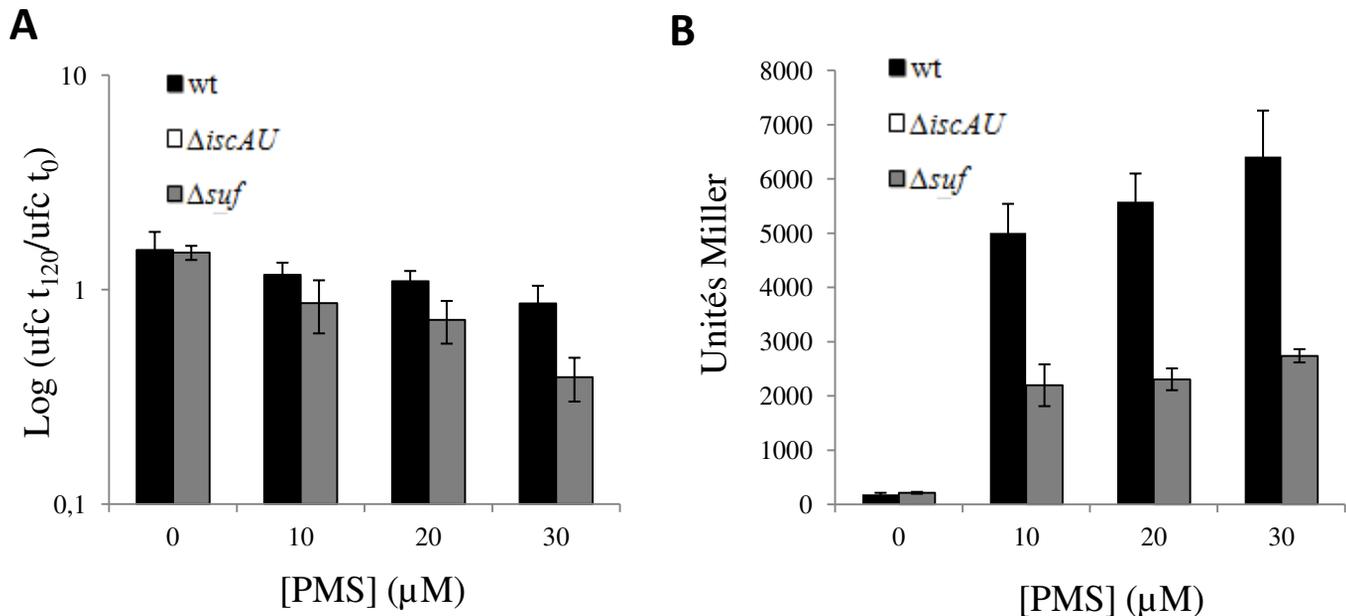


Figure 11 : Viabilité du mutant $\Delta s u f$ et expression de la fusion $P_{s o x S}::l a c Z$ en présence de PMS.

Les souches BE1000 (WT) (noir) et AG031 ($\Delta s u f$) (gris) contenant la fusion $P_{s o x S}::l a c Z$ sont cultivées en aérobie et en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en quatre et les différentes concentrations de PMS sont ajoutées à chaque culture (t_0). Après deux heures d'incubation les cultures sont diluées et déposées sur boîte LB agar. (A) La capacité de survie des souches est évaluée après détermination du nombre d'unités formant des colonies (ufc)/mL aux temps 0 et 120 minutes. (B) En parallèle, l'expression de la fusion $P_{s o x S}::l a c Z$ a été mesurée. Les expériences ont été réalisées plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

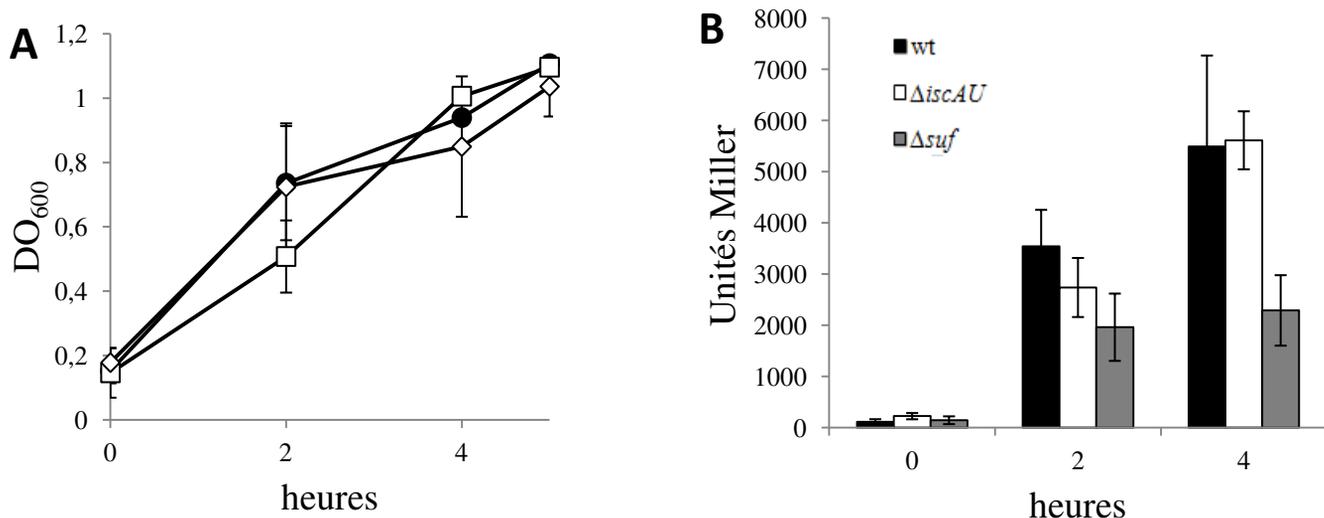


Figure 12 : L'ajout des acides-aminés branchés restaure la croissance du mutant $\Delta s u f$ en aérobie et en présence de PMS.

Les souches BE1000 (WT) (●), AG030 ($\Delta i s c U A$) (□) et AG031 ($\Delta s u f$) (◇) sont cultivées en milieu minimum glucose contenant les 20 acides aminés. Le PMS (12 μM) est ajouté ($t = 0$) en début de phase exponentielle de croissance, (A) et la $D O_{600 n m}$ est mesurée au cours du temps. (B) Sur les mêmes cultures l'expression de la fusion $P_{s o x S}::l a c Z$ en milieu minimum contenant les 20 acides-aminés a été mesurée. Les expériences ont été réalisées plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

En conclusion, j'ai donc obtenu des évidences indiquant que la machinerie SUF contribuerait à la maturation de SoxR. Cette contribution est apparente une heure après l'apparition du stress (120 min). Savoir si la contribution de SUF est nulle avant ce temps ou que sa contribution est masquée par l'activité de ISC est la question découlant de ces observations. Nous avons également noté que le temps auquel le défaut d'induction de *soxS* émerge dans le mutant Δ *suf* est aussi celui auquel la viabilité cellulaire commence à décliner. La question de l'existence de relations entre les 2 phénomènes est donc également posée. Ces deux aspects, contribution de ISC et relation induction/viabilité, ont été analysés et les résultats correspondant sont présentés dans les paragraphes II.3 et II.2.2. ci-dessous.

II.2.2. Le défaut de maturation de SoxR, en absence de la machinerie SUF, n'est pas lié à la perte de viabilité

Je me suis demandée si le défaut d'induction par le PMS de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ observé dans le mutant Δ *suf* était lié à sa perte de viabilité. J'ai donc testé l'effet de la mutation Δ *suf* sur l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans des conditions où le PMS n'affecte pas la viabilité du mutant. Dans ce but, j'ai utilisé des concentrations plus faibles en PMS. A une concentration en PMS de 10 μ M, la viabilité du mutant Δ *suf* et de la souche sauvage ont le même ratio ufc_{t120}/ufc_{t0} (Figure 11A). Pourtant, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est diminuée d'un facteur 2,2 par rapport à la souche sauvage (Figure 11B). Avec 20 μ M de PMS le ratio ufc_{t120}/ufc_{t0} est également le même entre le mutant Δ *suf* et la souche sauvage alors que l'expression $P_{soxS}::lacZ$ est réduite dans le mutant Δ *suf* (Figure 11A et 11B). Ces résultats indiquent qu'en présence de PMS, la diminution de l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ observée dans le mutant Δ *suf* n'est pas due à une perte de viabilité.

Le lien entre viabilité et maturation de SoxR a été également testé en milieu minimum glucose supplémenté avec tous les acides aminés, car dans ces conditions l'ajout de PMS (12 μ M) n'a pas d'effet sur la croissance du mutant Δ *suf* (Figure 12A). Le PMS a été ajouté dans les cultures en début de phase exponentielle de croissance. Après 2 et 4 heures d'incubation avec du PMS, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est respectivement diminuée d'un facteur 1,8 et 2,3 dans le mutant Δ *suf* par rapport à la souche sauvage (Figure 12B). Ceci confirme que la diminution de l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ observée dans le mutant Δ *suf* n'est pas due à une perte de viabilité.

En conclusion, les deux phénomènes, défaut de maturation de SoxR et diminution de la viabilité, observés en absence de la machinerie SUF, sont indépendants. Nous pouvons donc

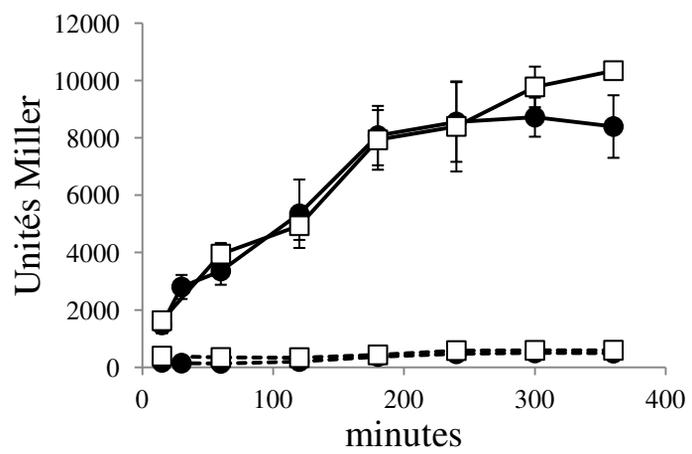
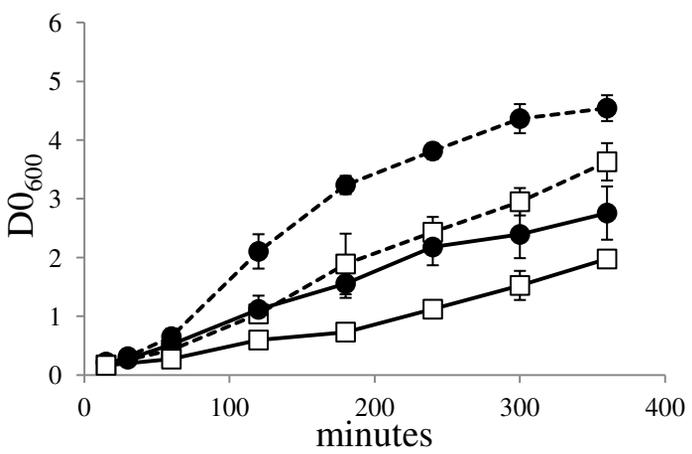
A**B**

Figure 13 : En aérobie, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ et la croissance du mutant $\Delta iscAU$ ne sont pas affectées par le PMS.

Les souches BE1000 (WT) (●) et AG030 ($\Delta iscUA$) (□) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux sous cultures : l'une sans PMS (pointillé), et l'autre avec ajout de PMS (30 μM) (trait plein). (A) L'activité β-galactosidase est mesurée au cours du temps. (B) En parallèle, la DO_{600} est mesurée au cours du temps. Le temps 0 correspond à l'ajout du PMS dans la culture. L'expérience a été réalisée plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

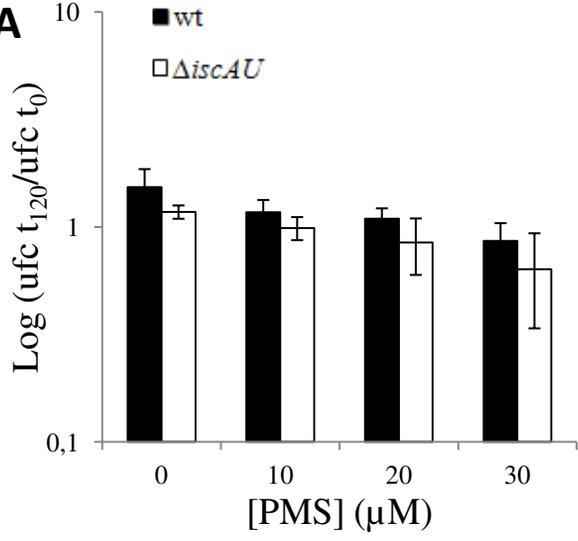
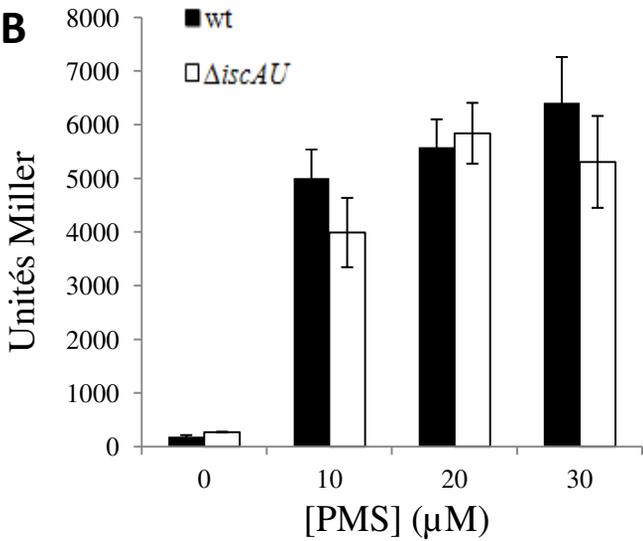
A**B**

Figure 14 : Viabilité du mutant $\Delta iscUA$ et expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ en présence de PMS.

Les souches BE1000 (WT) (noir) et AG030 ($\Delta iscUA$) (blanc) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en aérobie et en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en quatre et les différentes concentrations de PMS sont ajoutées à chaque culture (t_0). Après deux heures d'incubation les cultures sont diluées et déposées sur boîte LB agar. La capacité de survie des souches est évaluée après détermination du nombre d'unités formant des colonies (ufc)/mL aux temps 0 et 120 minutes (A). En parallèle, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ a été mesurée (B). Les expériences ont été réalisées plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

conclure qu'en conditions de stress superoxyde la machinerie SUF est requise pour la maturation de SoxR.

II.3. Contribution de la machinerie ISC à la maturation de SoxR

II.3.1. La machinerie ISC n'est pas importante pour la maturation de SoxR en stress PMS aérobie

En présence de PMS, dans le mutant $\Delta iscUA$ (AG030), l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite, et les valeurs de l'activité β -galactosidase sont identiques à celles mesurées dans la souche wt (Figure 13A). La croissance du mutant $\Delta iscUA$ est affectée par le PMS de la même façon que la souche wt (Figure 13B). L'analyse de la viabilité montre que le ratio ufc_{t120}/ufc_{t0} dans le mutant $\Delta iscUA$ est similaire à la souche wt (Figure 14). Ces résultats montrent donc qu'en stress PMS la machinerie ISC n'est pas requise pour la maturation de la protéine SoxR.

A la lumière de ces résultats, j'ai pu compléter mes conclusions sur la contribution de la machinerie SUF. En effet, je peux conclure que la contribution de SUF dans la première heure suivant l'ajout de PMS était masquée par l'activité de la machinerie ISC. La question de la capacité de la machinerie ISC à maturer SoxR, en présence de 30 μ M de PMS, durant la première heure d'incubation peut même être soulevée, puisqu'on ne peut pas exclure que ce soit un pool de SoxR mûré avant le stress qui soit activé par le PMS.

II.3.2. La surproduction de SoxR compense la faible efficacité de maturation par la machinerie ISC

J'ai voulu tester si le défaut de maturation de SoxR par la machinerie ISC pouvait être du à un problème d'affinité. Pour cela, j'ai surproduit SoxR dans le mutant Δsuf . J'ai cloné le gène *soxR* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG (pTrc99a). Le plasmide obtenu, psoxR est capable de compléter la sensibilité au PMS du mutant $\Delta soxR$, indiquant que la protéine SoxR produite à partir de ce plasmide est fonctionnelle (Figure 15).

Les souches wt et Δsuf portant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ ont été transformées avec le plasmide psoxR et le vecteur vide (pTrc99a). Les souches ont été cultivées en milieu riche contenant 0,1mM d'IPTG afin d'induire l'expression du gène *soxR* à partir du plasmide psoxR. En début de phase exponentielle de croissance, le PMS a été rajouté (30 μ M). Après 2 heures de croissance l'activité β -galactosidase a été mesurée.

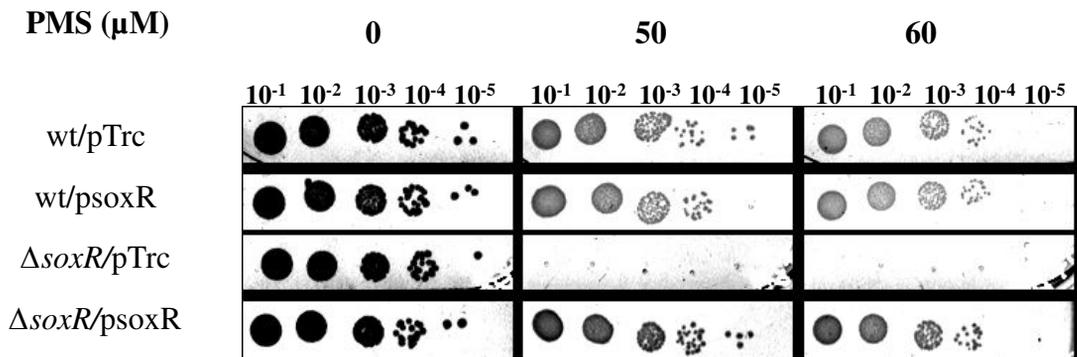


Figure 15 : Effet de la surproduction de SoxR sur la sensibilité au PMS du mutant ΔsoxR .

Les souches BE1000 (WT) et AG035 (ΔsoxR) contenant le plasmide surproduisant SoxR (psoxR) ou le plasmide vide (pTrc) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance puis diluées et déposées sur boîte LB agar contenant différentes concentrations de PMS. Les souches sont incubées à 37°C pendant 16h.

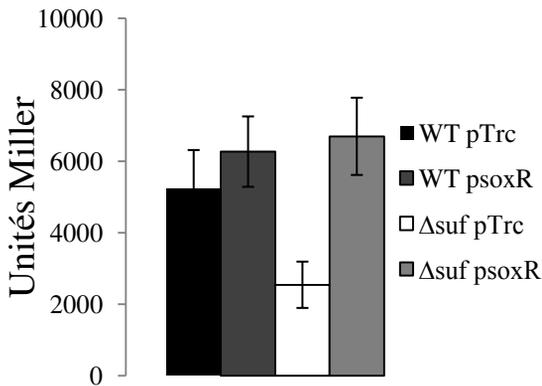


Figure 16 : La surproduction de SoxR supprime le défaut de maturation de SoxR du mutant Δsuf en aérobie et en présence de PMS.

Les souches BE1000 (WT) et AG031 (Δsuf) contenant la fusion $P_{\text{soxS}}::\text{lacZ}$ et le plasmide surproduisant SoxR (psoxR) ou le plasmide vide (pTrc) sont cultivées en milieu LB contenant 0,1 mM d'IPTG. En début de phase exponentielle de croissance le PMS (30 μM) est ajouté et les souches sont incubées pendant deux heures puis l'activité β -galactosidase est mesurée. L'expérience a été réalisée 3 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

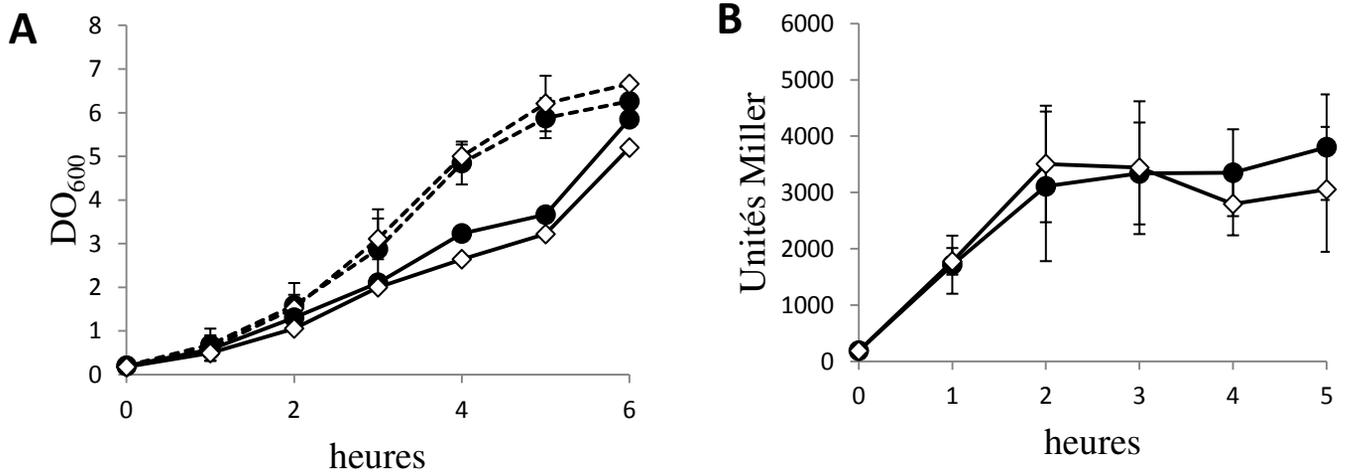


Figure 17 : Une faible concentration en PMS n'affecte pas la croissance et l'expression de la fusion $P_{\text{soxS}}::\text{lacZ}$ du mutant (Δsuf).

Les souches BE1000 (WT) (●) et AG031 (Δsuf) (◇) contenant la fusion $P_{\text{soxS}}::\text{lacZ}$ sont cultivées en milieu LB sans PMS (pointillé) ou contenant du PMS (5 μM) (trait plein). (A) La DO_{600nm} et (B) L'activité β -galactosidase en présence de PMS (5 μM) est mesurée au cours du temps. Le temps 0 correspond à l'ajout du PMS. L'expérience a été réalisée 3 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

Les résultats obtenus montrent que l'activité β -galactosidase de la souche Δ *suf*/psoxR est plus élevée (facteur 2,6) que celle de la souche Δ *suf*/pTrc (Figure 16). L'activité β -galactosidase obtenue pour la souche Δ *suf*/psoxR est identique à celle de la souche wt/psoxR. Ces résultats montrent que la surproduction de SoxR dans le mutant Δ *suf* permet d'obtenir une quantité de holo-SoxR suffisante pour activer le régulon SoxRS. Ces résultats suggèrent qu'en stress PMS la surproduction de SoxR permet de compenser la faible efficacité de la machinerie ISC à maturer SoxR.

Dans les souches wt/psoxR et wt/pTrc, en présence de PMS, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est identique. Ici, la surproduction de SoxR, augmente vraisemblablement la quantité de holo-SoxR dans la souche wt, mais cela ne se traduit pas par une augmentation de l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ en présence de PMS, suggérant que la quantité de holo-SoxR n'est pas limitante dans la souche wt.

II.3.3. Une faible concentration en PMS permet à la machinerie ISC de maturer SoxR

J'ai testé la contribution de la machinerie ISC à la maturation de SoxR en présence d'une faible dose de PMS (5 μ M). Le mutant Δ *suf* et la souche wt ont été cultivés en milieu riche contenant ou non 5 μ M de PMS dès le début de la croissance. Les résultats montrent que la croissance de la souche wt et celle du mutant Δ *suf* sont légèrement ralenties par l'ajout de 5 μ M de PMS (Figure 17A). Dans ces conditions, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans la souche wt et dans le mutant Δ *suf* est induite de façon identique (Figure 17B). Ces résultats indiquent qu'il faut une faible concentration de PMS pour pouvoir observer la maturation de SoxR par la machinerie ISC.

En conclusion, ces résultats montrent que la machinerie SUF assure la maturation de SoxR en stress PMS. Quant à la machinerie ISC, elle ne parvient pas à maturer SoxR ou au mieux elle le fait de façon inefficace. En effet, les seules conditions où elle parvient à maturer SoxR sont lorsque SoxR est surproduit, ou lorsque la concentration en PMS est faible. La question de la capacité de la machinerie ISC à maturer SoxR durant la première heure d'incubation avec 30 μ M de PMS peut même être questionnée, puisque on ne peut pas éliminer la possibilité que se soit un pool de SoxR mûré avant le stress qui soit activé par le PMS.

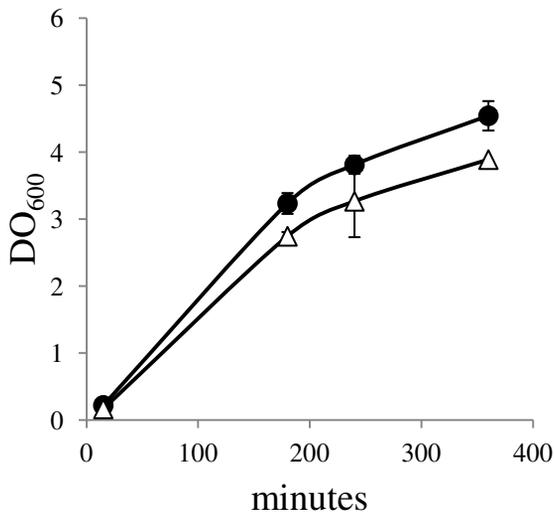
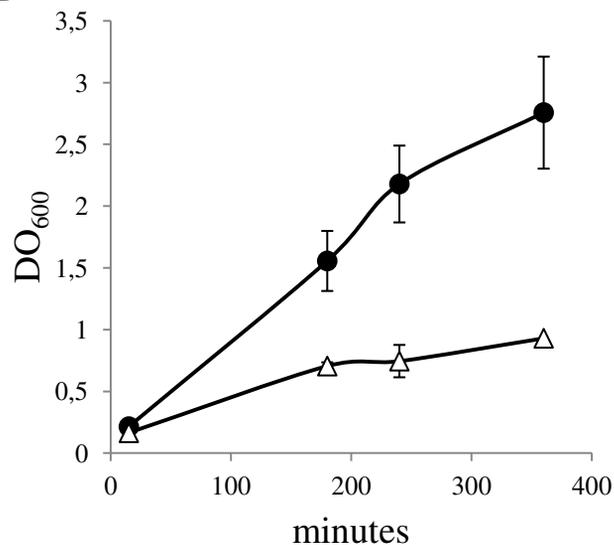
A**B**

Figure 18 : La croissance du mutant $\Delta nfaA$ est affectée en présence de PMS en aérobie.

Les souches BE1000 (WT) (●) et AG043 ($\Delta nfaA$) (Δ) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux : (A) sans PMS (B) ou avec ajout de PMS (30 μ M). La DO_{600nm} est mesurée au cours du temps. Le temps 0 correspond au temps où le PMS est ajouté. L'expérience a été réalisée 3 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

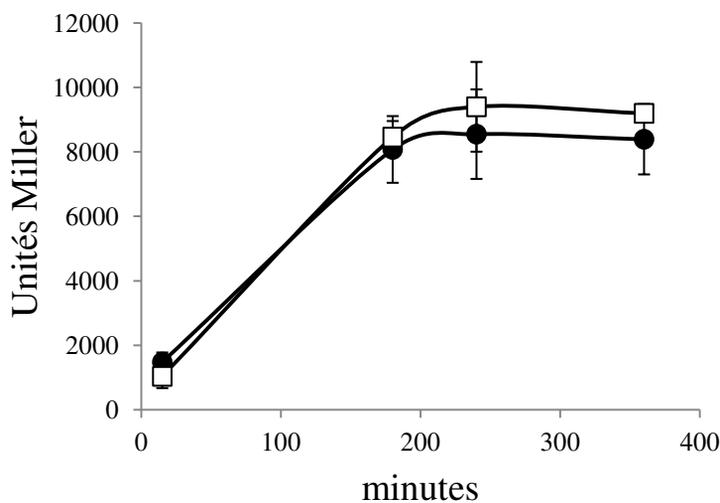


Figure 19 : Importance de la protéine NfuA sur l'expression $P_{soxS}::lacZ$

Les souches BE1000 (WT) (●) et AG043 ($\Delta nfaA$) (Δ) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance où le PMS est ajouté (30 μ M). L'activité β -galactosidase est suivie au cours du temps. Le temps 0 correspond au temps où le PMS est ajouté. Les expériences ont été réalisées 3 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

II.4. Contribution de NfuA et YggX dans la maturation de SoxR

Des études menées précédemment au laboratoire ont mis en évidence que NfuA, un transporteur de centre FeS, est essentiel pour la maturation des protéines à centre FeS lors d'un stress superoxyde généré par du paraquat. D'autre part, YggX dont le gène fait partie du régulon SoxRS a été proposé pour avoir un rôle dans la réparation des protéines à centre FeS. Pour tester l'importance des protéines NfuA et YggX sur la maturation de SoxR en présence de PMS, j'ai introduit la mutation $\Delta nfuA$ et $\Delta yggX$ dans la souche portant la fusion $P_{soxS}::lacZ$. Les souches obtenues ont été cultivées en milieu riche jusqu'en début de phase exponentielle, puis la culture a été partagée en deux sous cultures. Dans l'une des sous cultures, le PMS a été rajouté à une concentration de 30 μ M, et dans l'autre aucune addition de PMS n'a été effectuée. L'activité β -galactosidase a été calculée à partir d'échantillons prélevés au cours du temps.

Les résultats montrent que la croissance du mutant $\Delta nfuA$ est affectée en présence de PMS par rapport à la souche sauvage, confirmant la sensibilité du mutant aux composés générant du superoxyde (Figure 18). En présence de PMS, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans le mutant $\Delta nfuA$ et dans la souche wt est la même (Figure 19). Enfin, en présence de PMS le mutant $\Delta yggX$ a le même profil de croissance et d'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ qu'une souche sauvage (résultats non montrés).

Ces résultats indiquent que NfuA et YggX ne sont pas nécessaires pour la maturation de SoxR en stress PMS.

III. Réduction de SoxR en aérobie

Lorsque le stress oxydant est éliminé de la cellule, la protéine SoxR oxydée retourne à son état réduit grâce à l'action du système R_{sx}ABCDGE-RseC. Les protéines R_{sxB} et R_{sxC} portent des motifs de liaison d'un centre [4Fe-4S], et assureraient le transfert d'électrons au sein du complexe membranaire R_{sx} (Koo et al., 2003). Les machineries de biogenèse des centres FeS pourraient donc moduler la réponse SoxRS à deux niveaux, directement en intervenant dans la maturation de SoxR (comme montré ci-dessus), et aussi indirectement en intervenant dans la maturation du système de réduction de SoxR. C'est ainsi que j'ai voulu connaître l'importance des systèmes de biogenèse ISC et SUF dans la réduction de SoxR.

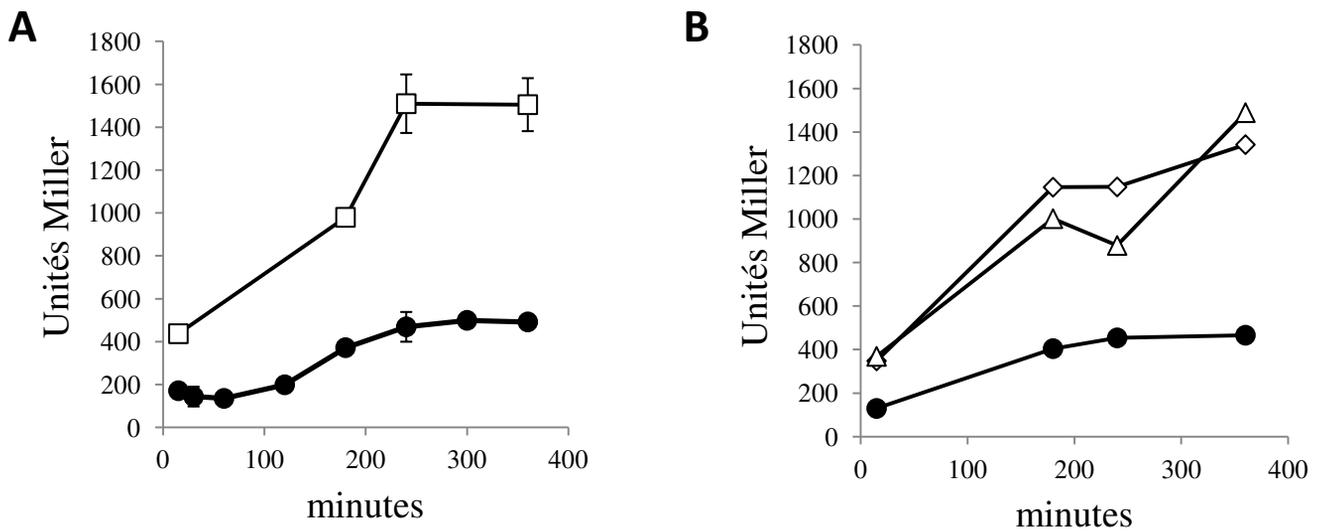


Figure 20 : L'expression $P_{soxS}::lacZ$ est plus élevée en absence des protéines RseC, RxC ou RxB en aérobie.

(A) Les souches BE1000 (WT) (●), AG045 ($\Delta rseC$) (□) (B) et les souches AG032 ($\Delta rsxB$) (Δ) et AG047 ($\Delta rsxC$) (◇) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB et l'activité β -galactosidase est mesurée au cours du temps. L'expérience a été réalisée au moins 3 fois excepté pour les mutants $\Delta rsxB$ et $\Delta rsxC$.

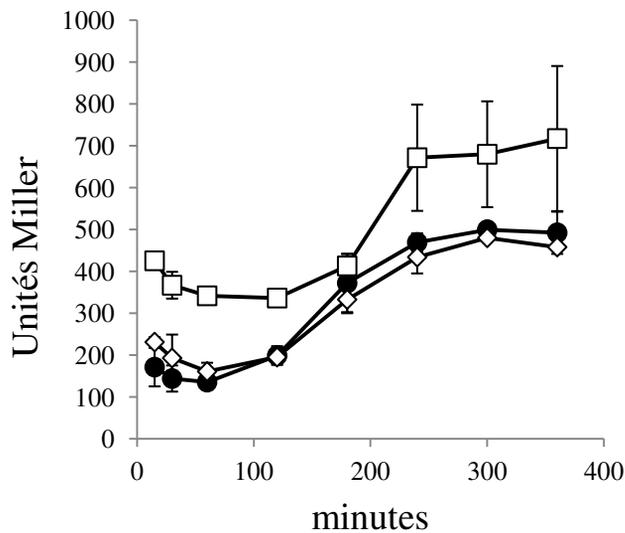


Figure 21 : L'expression $P_{soxS}::lacZ$ est plus élevée en absence de la machinerie ISC en aérobie.

Les souches BE1000 (WT) (●), AG030 ($\Delta iscUA$) (□) et AG031 (Δsuf) (◇) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance puis l'activité β -galactosidase est mesurée au cours du temps. L'expérience a été réalisée plus de 3 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

III.1. Contribution des machineries ISC et SUF à la réduction de SoxR

III.1.1 Le système R_{soxS}ABCDGE-RseC et la machinerie ISC interviennent dans la réduction de SoxR lors de la croissance aérobie.

Pour tester l'importance du système R_{soxS}ABCDGE-RseC sur la réduction de SoxR, j'ai construit les mutants Δr_{soxC} , Δr_{soxB} et Δr_{seC} contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$. Les souches ont été cultivées en milieu riche en aérobie sans stress exogène. L'activité β -galactosidase a été calculée à partir d'échantillons prélevés à différents temps tout au long de la croissance. Les résultats obtenus montrent que l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans les mutants Δr_{soxC} , Δr_{soxB} et Δr_{seC} est induite au cours de la croissance. En effet, l'activité β -galactosidase augmente d'un facteur 3,5 entre les temps 0 et 360 minutes (Figure 20). Dans la souche wt, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ augmente également d'un facteur 3,2 entre les temps 0 et 360 minutes (Figure 20). Ces résultats indiquent qu'en aérobie, le stress endogène produit par la respiration est suffisant pour oxyder SoxR.

J'ai aussi observé que dans les mutants Δr_{soxC} , Δr_{soxB} et Δr_{seC} , l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est plus élevée (approx. 3 fois), que dans la souche wt, suggérant que le système R_{soxS}-RseC est important pour réduire SoxR lors de la croissance aérobie.

Dans le mutant $\Delta iscUA$, j'ai observé que l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite durant la croissance aérobie d'un facteur 1,8 entre les temps 0 et 360 minutes. L'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans le mutant $\Delta iscUA$ est plus élevée que celle mesurée dans la souche wt (approx. 2 fois) (Figure 21). Dans le mutant Δsuf , l'expression de la fusion est identique à celle de la souche wt.

Une hypothèse est donc que durant la croissance aérobie, la machinerie ISC et non la machinerie SUF est impliquée dans la réduction de SoxR via la maturation des protéines R_{soxC} et R_{soxB}.

III.1.2. Etude de la réduction de SoxR après un stress PMS

J'ai ensuite testé l'importance du système R_{soxC}-RseC et des machineries de biogenèse des centres FeS pour la réduction de SoxR, après oxydation par le PMS. Une fois dans les cellules le PMS est constamment recyclé. Ainsi, afin d'éliminer le stress PMS, j'ai choisi de diluer les cultures de façon à réduire la concentration de PMS. J'ai cultivé les mutants Δr_{soxC} , Δr_{soxB} , Δr_{seC} , $\Delta iscUA$ et Δsuf en milieu riche en présence de PMS (30 μ M) pendant trois heures. Les cultures ont alors été divisées en deux sous cultures, l'une a été diluée au 20^{ème} dans du

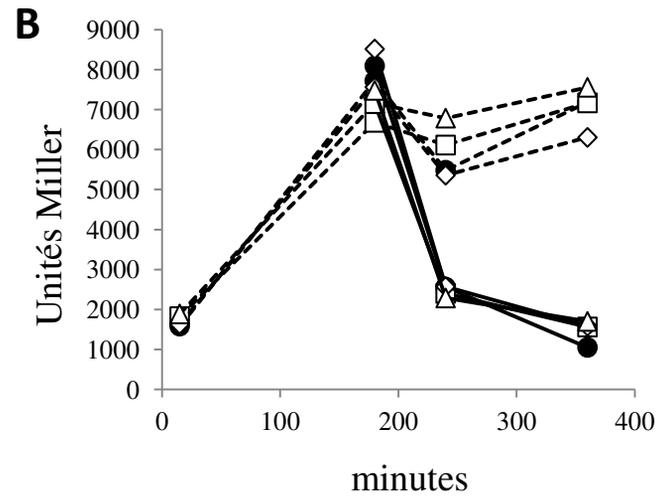
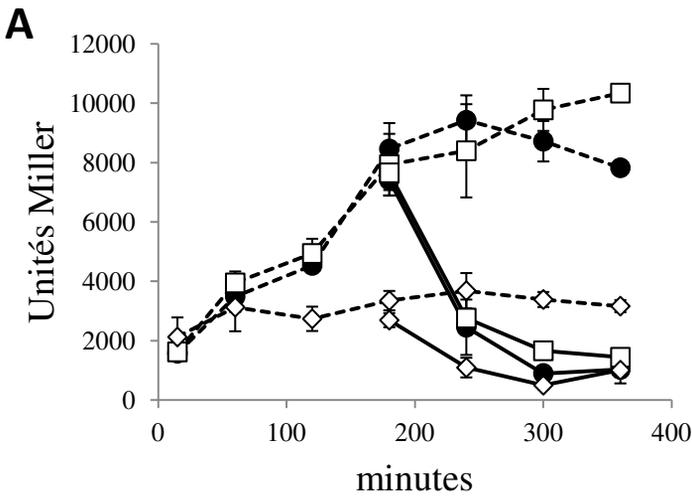


Figure 22 : Importance des machineries ISC et SUF sur l'expression $P_{soxS}::lacZ$ après élimination du PMS en aérobie.

Les souches BE1000 (WT) (●), AG030 ($\Delta iscUA$) (□) et AG031 (Δsuf) (◇) (A) et les souches AG032 ($\Delta rsxB$) (Δ), AG045 ($\Delta rseC$) (□), AG047 ($\Delta rsxC$) (◇) (B) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance où le PMS (30 μM) est ajouté (pointillé). Après trois heures d'incubation, les cultures sont diluées dans du milieu LB frais et l'activité β -galactosidase est suivie au cours du temps (trait plein). Le temps 0 correspond au temps où le PMS est ajouté et le temps 180 minutes correspond au temps où la culture est diluée au 20^e. L'expérience a été réalisée 3 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

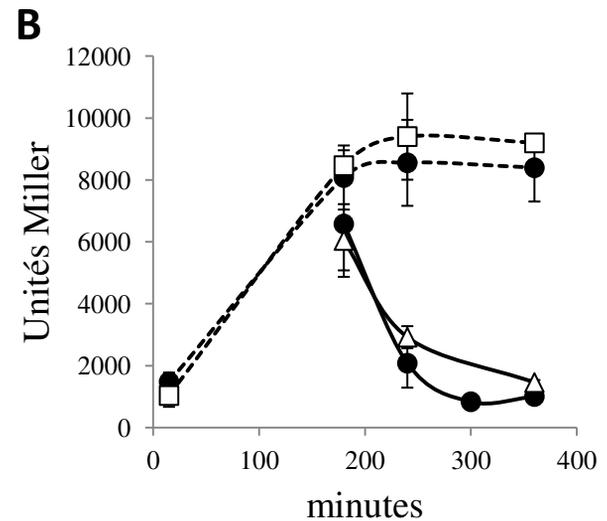
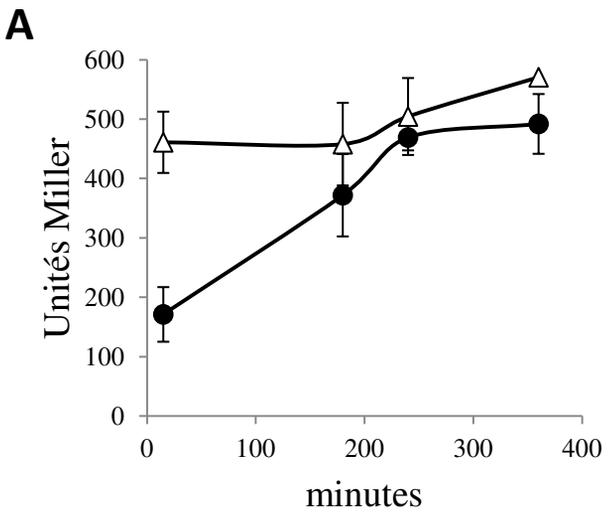


Figure 23 : Importance de la protéine NfaA sur l'expression $P_{soxS}::lacZ$

Les souches BE1000 (WT) (●) et AG043 ($\Delta nfaA$) (Δ) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance et l'activité β -galactosidase est mesurée au cours du temps (A). Les mêmes souches sont cultivées en milieu LB contenant du PMS (30 μM). Après trois heures d'incubation, les cultures sont diluées dans du milieu LB frais et l'activité β -galactosidase est suivie au cours du temps. Le temps 0 correspond au temps où le PMS est ajouté et le temps 180 minutes correspond au temps où la culture est diluée au 20^e (B). Les expériences ont été réalisées 3 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

milieu riche et l'autre a servi de contrôle « non dilué ». Les cultures sont remises à incuber à 37°C pendant trois heures supplémentaires. L'activité β -galactosidase a été calculée à partir d'échantillons prélevés à différents temps tout au long de la croissance, pendant le stress PMS et après la dilution.

Après 3 heures d'exposition au PMS (t180), comme observé précédemment, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite dans la souche wt (Figure 22A). Après la dilution de la culture, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est diminuée d'un facteur 3,5 au temps t240, d'un facteur 9 au temps 300 et d'un facteur 8 au temps 360. Ces résultats indiquent qu'après la levée de stress PMS SoxR retourne à l'état réduit.

Dans les mutants $\Delta rsxC$, $\Delta rsxB$ et $\Delta rseC$, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ en présence de PMS suit le même profil que celui de la souche wt, suggérant que le système R_{sx}-R_{seC} n'a pas d'influence sur l'état d'oxydation de SoxR en présence de PMS (Figure 22B). Après dilution du milieu de culture, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ diminue suivant le même profil que celui de la souche wt, suggérant que le système R_{sx}-R_{seC} n'a pas d'effet sur la réduction de SoxR après un stress PMS.

Dans les mutants $\Delta iscUA$ et Δsuf , après élimination du PMS, de l'expression $P_{soxS}::lacZ$ diminue suivant le même profil que celui de la souche wt (Figure 22A), suggérant que les machineries ISC et SUF n'ont pas de rôle dans la réduction de SoxR après un stress PMS.

En conclusion, en absence de stress, la machinerie ISC, et non la machinerie SUF pourrait être impliquée dans la réduction de SoxR, via la maturation des protéines R_{sxC} et R_{sxB}. En revanche, après un stress PMS le retour de SoxR à l'état réduit est indépendant des machineries ISC et SUF ainsi que du système R_{sx}-R_{seC}.

III.2. Contribution NfuA et YggX à la réduction de SoxR

J'ai également étudié la réduction de SoxR dans les mutants $\Delta nfuA$ et $\Delta yggX$. L'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ en absence de PMS dans le mutant $\Delta nfuA$ est plus élevée que celle mesurée dans la souche sauvage, principalement au début de la croissance (temps 15 minutes) (facteur 2,6) (Figure 23A). Durant la suite de la croissance la différence d'expression de la fusion entre la souche wt et le mutant $\Delta nfuA$ s'atténue. Après dilution du milieu de culture pour éliminer le PMS, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans le mutant $\Delta nfuA$ est similaire à celle mesurée dans la souche sauvage (Figure 23B). Ces résultats suggèrent que la protéine NfuA pourrait être impliquée dans la réduction de SoxR en absence de stress.

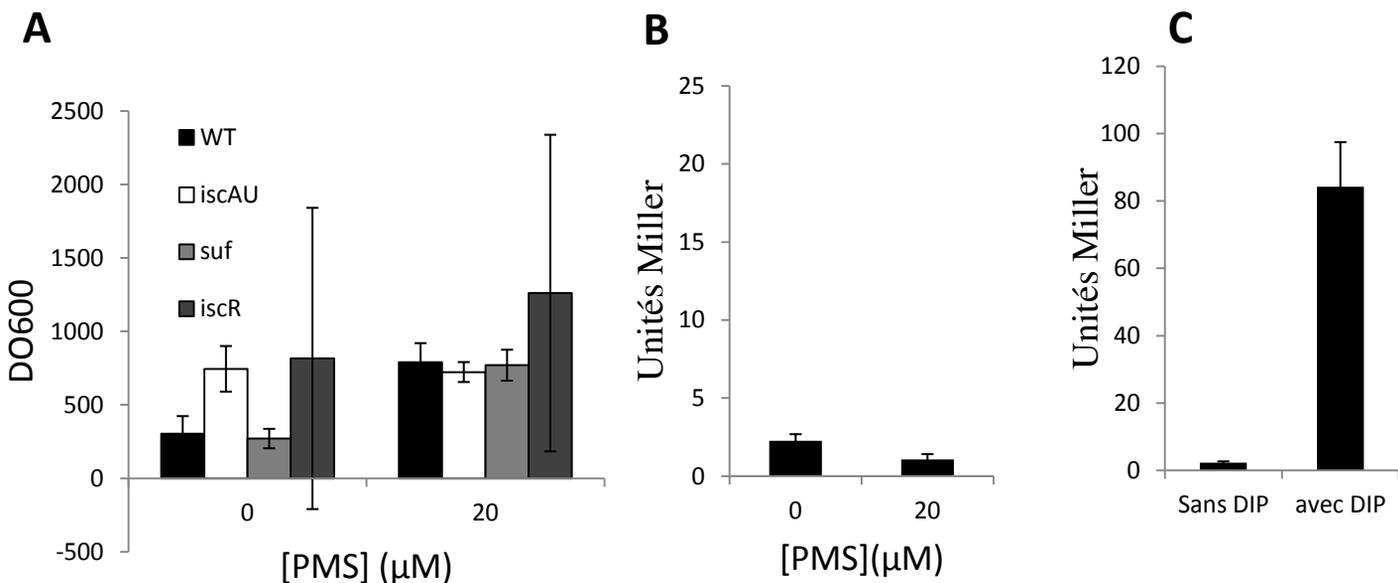


Figure 24 : Expression des opérons *isc* et *suf* lors d'une exposition au PMS en anaérobiose.

(A) Les souches DV901 (WT) (noir), DV922 ($\Delta iscUA$) (blanc), DV915 ($\Delta iscR$) (gris clair), BR239 (Δsuf) (gris foncé), contenant la fusion $P_{iscR}::lacZ$ (B) et la souche PM2081 (WT) contenant la fusion $P_{sufA}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB contenant du nitrate (20 mM) et du sodium molybdate (5 μM) jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux : sans ou avec ajout de PMS (20 μM) (C) ou sans ou avec le 2-2' dipyrindyl (250 μM). Les souches sont incubées pendant deux heures puis l'activité β-galactosidase est mesurée. L'expérience a été réalisée 2 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

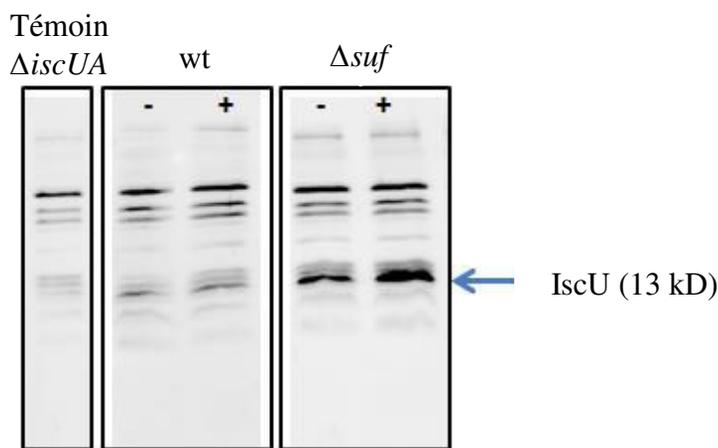


Figure 25 : La machinerie ISC est produite lors d'une exposition au PMS.

Les souches BE1000 (WT), AG030 ($\Delta iscUA$) et AG031 (Δsuf) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB contenant du nitrate (20 mM) et du sodium molybdate (5 μM) jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en deux : avec ou sans ajout de PMS (30 μM). Les souches sont incubées pendant deux heures puis des échantillons sont prélevés pour réaliser un western blot.

Enfin, quelque soit les conditions testées, le mutants $\Delta yggX$ a le même profil de croissance et d'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ qu'une souche sauvage, indiquant que YggX n'est pas nécessaire pour le maintien de SoxR à l'état réduit (résultats non montrés).

III. Contribution des machineries ISC et SUF à la résistance au stress PMS en anaérobie

Récemment le PMS a été montré pour être toxique en anaérobie et pour diminuer l'activité d'enzymes à centre FeS lorsqu'un accepteur terminal d'électron, remplaçant l'oxygène, était ajouté au milieu de culture (Gu et Imlay, 2011). J'ai donc voulu savoir si les machineries ISC et SUF sont requises lors d'un stress PMS en anaérobie.

III.1. Expression des opérons *isc* et *suf* en présence de PMS en anaérobie

J'ai mesuré l'expression des opérons *isc* et *suf* lors d'un stress PMS en anaérobie. Pour cela j'ai utilisé les souches PM2081 et DV901 portant respectivement les fusions transcriptionnelles chromosomiques $P_{sufA}::lacZ$ et $P_{iscR}::lacZ$. Les souches ont été cultivées en anaérobie, en milieu riche contenant du nitrate comme accepteur terminal d'électron. Après 3 heures de croissance la culture est divisée en deux sous cultures, dans l'une le PMS a été rajouté à une concentration de 20 μ M, et l'autre n'a pas subi de traitement. L'activité β -galactosidase a été mesurée dans les sous cultures après deux heures d'incubation à 37°C. Les résultats montrent que l'ajout de PMS induit l'expression de la fusion $P_{iscR}::lacZ$ (facteur 2,6) (Figure 24A). Par contre l'expression de la fusion $P_{sufA}::lacZ$ n'est pas induite par l'ajout de PMS (Figure 24B). En absence de IscR, malgré une grande variation dans les valeurs obtenues, l'induction de la fusion $P_{iscR}::lacZ$ par le PMS est abolie (facteur 1,5) (Figure 24A). De plus, dans le mutant $\Delta iscUA$, il n'y a pas d'induction de l'expression de la fusion $P_{iscR}::lacZ$ par le PMS (Figure 24A). Une hypothèse simple est que dans le mutant le $\Delta iscUA$, le PMS n'a plus d'effet car IscR est sous forme apo. En anaérobie, le PMS favoriserait donc le passage de la forme holo-IscR vers la forme apo-IscR, permettant ainsi l'induction par levée de répression de l'opéron *isc*. J'ai pu montrer, par western blot anti-IscU, une augmentation de la quantité de IscU dans les cellules de la souche wt et Δsuf exposées au PMS (Figure 25). Ce résultat est en accord avec ceux de l'expression de la fusion $P_{iscR}::lacZ$.

[PMS] (μM)

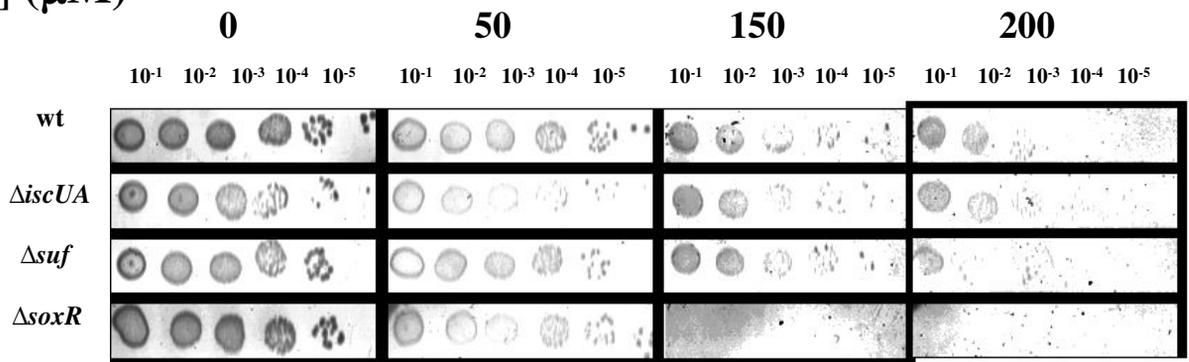


Figure 26 : Importance des machineries ISC et SUF pour la sensibilité d'*E. coli* au PMS en anaérobie.

Les souches BE1000 (WT), AG035 (ΔsoxR), AG030 (ΔiscUA) et AG031 (Δsuf) sont cultivées en anaérobie en milieu LB contenant du nitrate (20 mM) et du sodium molybdate (5 μM) jusqu'en début de phase exponentielle de croissance puis diluées et déposées sur boîte LB agar contenant différentes concentrations de PMS. Les dilutions et dépôt sur boîte sont effectuées en anaérobie. Après 16h d'incubation en anaérobie les boîtes de Pétri sont scannées.

III.2. En anaérobiose la machinerie SUF est importante pour résister au PMS

Afin de tester si en anaérobiose, les machineries ISC et SUF sont nécessaires pour la croissance d'*E. coli* en présence de PMS, j'ai comparé la croissance des mutants $\Delta iscUA$ et Δsuf . Pour cela les souches sont cultivées en anaérobiose en milieu riche puis après dilution, un aliquot de chaque dilution est déposé sur une boîte LB agar supplémenté ou non avec du nitrate et du PMS. La croissance des souches est analysée après 16h d'incubation.

Les résultats obtenus montrent qu'en anaérobiose la concentration de PMS doit être plus élevée pour affecter la croissance d'*E. coli* (200 μ M). Dans la gamme de concentration testée, le mutant $\Delta iscUA$ et la souche sauvage ont la même sensibilité au PMS (Figure 26). Les mutants $\Delta soxR$ et Δsuf sont plus sensibles que la souche wt à une concentration de 150 et 200 μ M de PMS respectivement. Ceci indique que la machinerie SUF est importante pour résister au PMS en anaérobiose.

IV. Biogénèse de SoxR en anaérobiose

IV.1. Contribution de la machinerie SUF

J'ai cultivé en anaérobiose la souche wt et le mutant Δsuf en milieu riche contenant ou non du nitrate. Après 3 heures de croissance, les cultures sont partagées en trois sous cultures. Dans deux sous cultures 30 et 60 μ M de PMS sont ajoutés. Dans la troisième aucun ajout n'a été effectué. L'activité β -galactosidase a été calculée à partir d'échantillons prélevés après deux heures d'incubation.

Les résultats montrent qu'en absence de nitrate l'ajout de PMS induit l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ d'un facteur 12 (Figure 27A). L'induction de la fusion par le PMS est dépendante de SoxR puisque dans le mutant $\Delta soxR$, la fusion n'est pas induite en absence de nitrate. Pour le mutant Δsuf l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite comme dans la souche sauvage (facteur 12).

En présence de nitrate, dans la souche wt l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite d'un facteur 18 en présence de 30 μ M de PMS, et d'un facteur 26 en présence de 60 μ M (Figure 27B). Dans le mutant $\Delta soxR$, l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite d'un facteur 12, suggérant que l'induction par le PMS est en partie dépendante de SoxR, mais qu'un autre régulateur pourrait être impliqué. Pour le mutant Δsuf l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est induite d'un facteur 22 en présence de 30 μ M de PMS, et d'un facteur 24 en présence de 60 μ M.

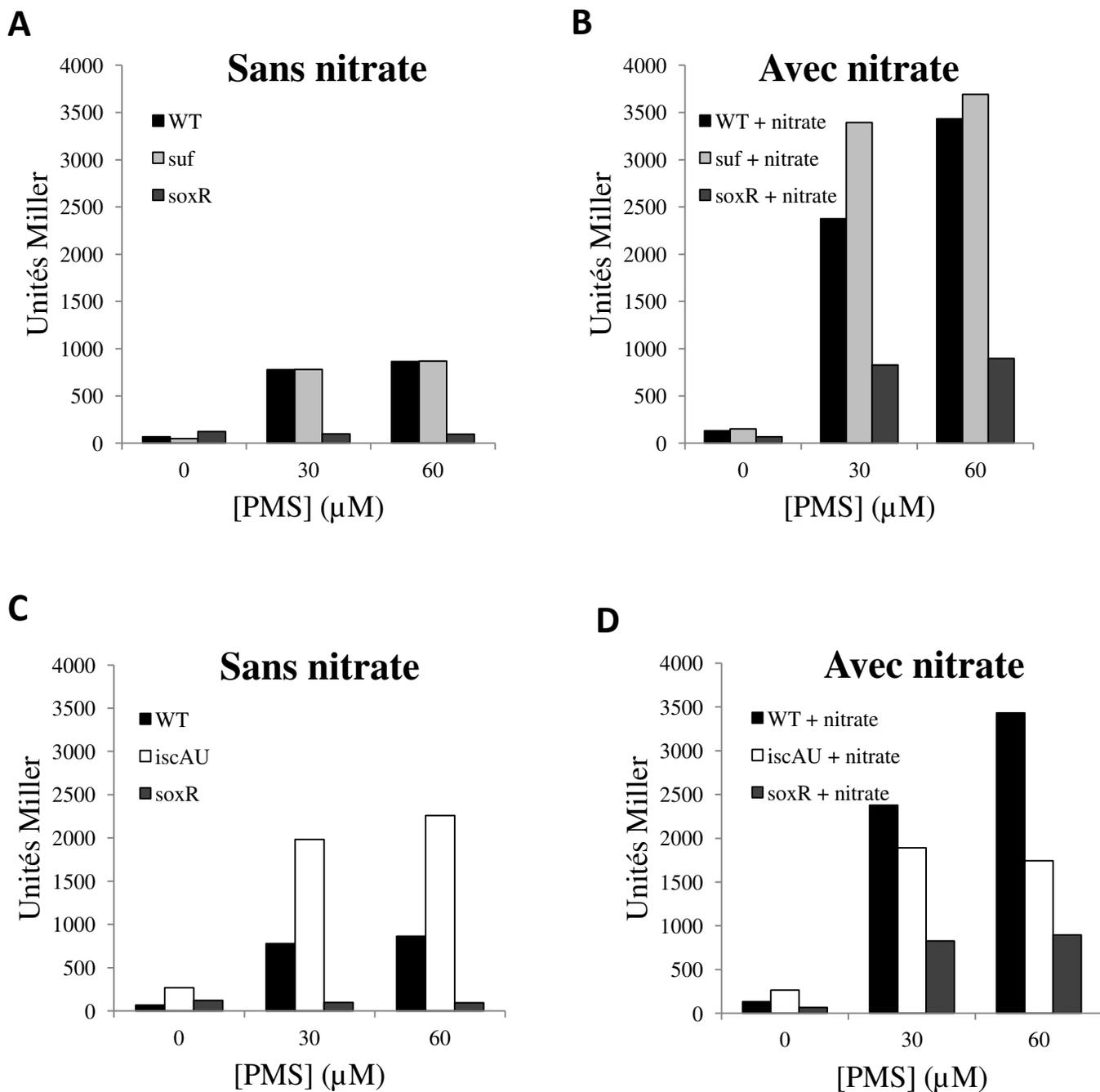


Figure 27 : Expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ en anaérobie et en présence de PMS.

(**CD**) Les souches BE1000 (WT) (noir), AG035 ($\Delta soxR$) (gris foncé) AG030 ($\Delta iscUA$) (blanc) (**AB**) et les souches AG031 (Δsuf) (gris clair) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en anaérobie en milieu LB (**BD**) contenant (**AC**) ou non du nitrate (20 mM). En début de phase exponentielle de croissance les cultures sont divisées en trois et les différentes concentrations de PMS sont ajoutées. Les souches sont incubées pendant deux heures puis l'activité β -galactosidase est mesurée. L'expérience a été réalisée 5 fois en absence de nitrate et 9 fois en présence de nitrate et un résultat type est présenté.

Ces résultats confirment que l'oxydation de SoxR par le PMS est possible en anaérobie et qu'elle est plus efficace en présence de nitrate. Pour le mutant Δ_{suf} , l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est identique à la souche sauvage quelque soit les conditions (+/- nitrate et +/- PMS) (Figure 27A et 27B). Ces résultats montrent qu'en anaérobie lors d'un stress PMS, la machinerie SUF n'est pas requise pour la maturation de SoxR et que la machinerie ISC est capable de maturer SoxR.

IV.2. Contribution de la machinerie ISC

J'ai analysé l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ dans le mutant Δ_{iscUA} . En présence de 60 μ M PMS et de nitrate, le niveau d'expression de la fusion est plus bas (facteur 2) dans le mutant Δ_{iscUA} que dans la souche sauvage (Figure 27D). En revanche, la situation contraire a lieu en absence de nitrate puisque le niveau d'expression de la fusion est plus élevé (facteur 2,5) dans le mutant Δ_{iscUA} que dans la souche sauvage (Figure 27C). Ceci suggère qu'en présence de nitrate la machinerie ISC est importante pour la maturation de SoxR, et qu'en absence de nitrate la machinerie ISC aurait un rôle négatif sur la maturation de SoxR. Ce résultat surprenant pourrait être lié au fait que la machinerie ISC est impliquée dans la maturation des enzymes de la chaîne respiratoire anaérobie, comme la nitrate réductase. De façon intéressante cette hypothèse semble confirmée par le fait que, dans le mutant Δ_{iscUA} , l'induction de la fusion est indépendante du nitrate. En conséquence en anaérobie lors d'un stress PMS la machinerie ISC est importante, cependant il est difficile de discriminer son rôle dans la maturation de SoxR de celui d'autres enzymes à centre FeS nécessaires pour activer le PMS. Ceci indique néanmoins que la machinerie SUF n'est pas capable de remplacer la machinerie ISC en anaérobie.

En conclusion, ces résultats montrent qu'en anaérobie la machinerie ISC assure la maturation de SoxR en stress PMS alors que la machinerie SUF n'est pas requise. Cette situation contraste avec celle observé en aérobie où c'est la machinerie SUF qui assure la maturation de SoxR.

V. Impact de la maturation de SoxR sur la résistance aux antibiotiques en aérobie

Parmi les gènes du régulon SoxRS, certains sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques comme *acrA*, *acrB* et *tolC*, qui codent pour la pompe à efflux AcrAB-TolC (Cristóbal et al., 2006). Il a été également montré que des composés redox actifs qui activent la réponse SoxRS permettent la résistance aux antibiotiques (Aly et al., 2015). J'ai voulu savoir si les machineries de biogénèse des centres FeS ont un impact sur la résistance aux antibiotiques médiée par SoxR.

V.1. Impact de la maturation de SoxR sur la résistance aux antibiotiques en milieu liquide.

Pour étudier la résistance aux antibiotiques de la souche wt et des mutants $\Delta soxR$, Δsuf et $\Delta iscUA$, j'ai utilisé deux tests en milieu liquide. Premièrement, la mesure du pourcentage de survie après exposition à l'antibiotique, et deuxièmement la détermination de la dose minimale inhibitrice (CMI).

V.1.1 SoxR est requis pour la résistance à la norfloxacine causée par le PMS

Les gènes *acrAB* étant régulés par d'autres régulateurs que SoxR, j'ai tout d'abord testé l'importance de SoxR dans la résistance aux antibiotiques causée par les composés redox actifs. J'ai donc analysé la capacité de la souche wt et du mutant $\Delta soxR$ à résister à la norfloxacine, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones qui inhibe la sous-unité A de l'ADN gyrase bactérienne.

Les souches ont été cultivées en milieu riche jusqu'en début de phase exponentielle de croissance, puis la culture a été divisée en quatre sous cultures (temps t_0). Dans l'une des sous cultures, la norfloxacine (140 ng/ml) et le PMS (30 μ M) ont été rajoutés. Dans deux autres sous cultures, seulement le PMS ou la norfloxacine ont été rajoutés. La dernière sous culture est non traitée. Des échantillons ont été prélevés toutes les heures (t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 et t_5) pour mesurer la viabilité des cellules. Pour cela, l'échantillon est dilué et un aliquot de chaque dilution est déposé sur boîte LB agar. Ainsi, après incubation des boîtes à 37°C, on détermine le nombre de bactéries capables de former des colonies (cfu/mL). Pour chaque sous culture, à un temps t , le pourcentage de survie est calculé en utilisant la valeur de cfu au temps t_0 (cfu _{t_0}) comme 100%.

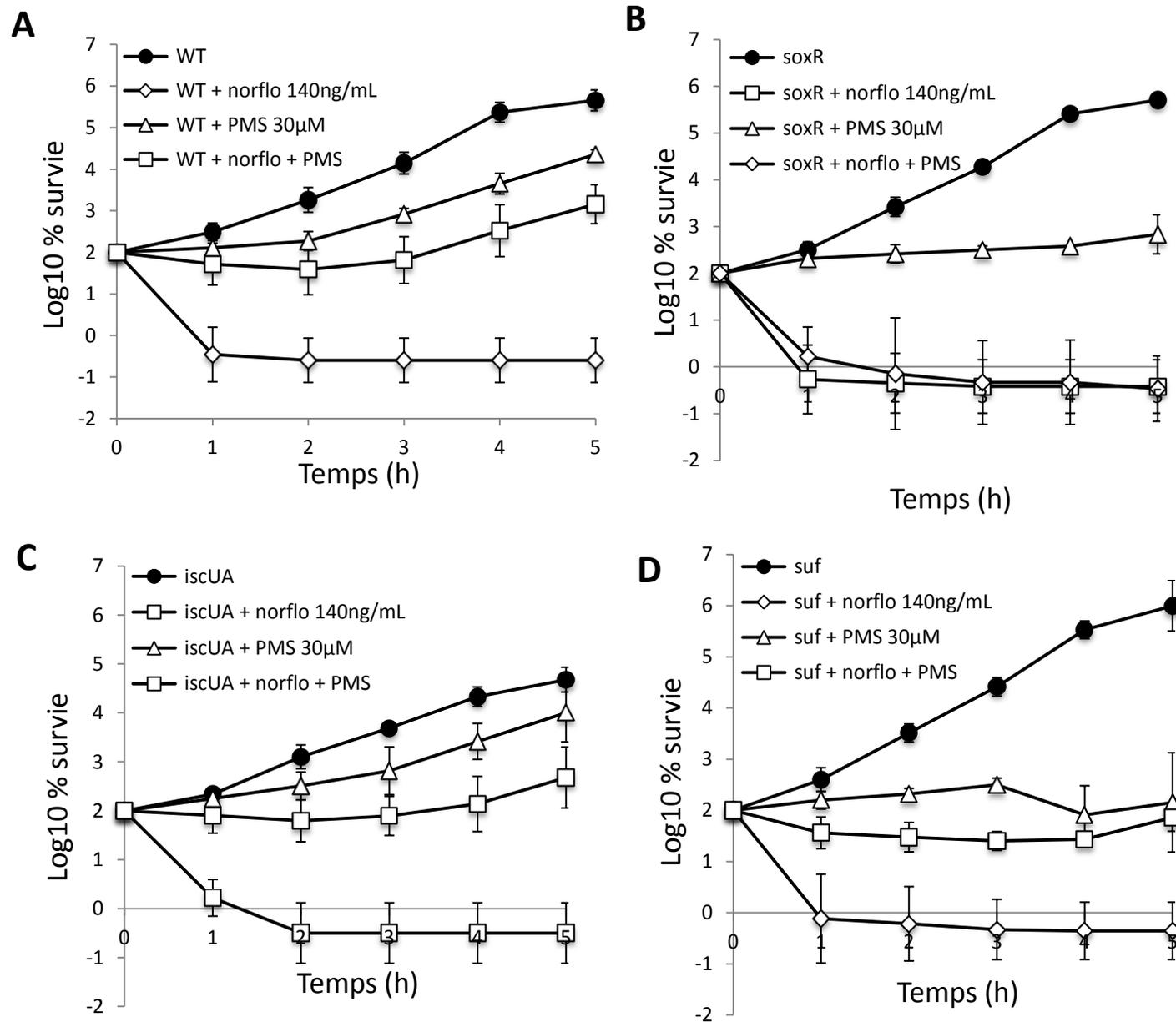


Figure 28 : La résistance d'*E. coli* à la norfloxacine via le PMS dépend de SoxR.

(A) Les souches BE1000 (WT), (B) AG035 ($\Delta soxR$), (C) AG030 ($\Delta iscUA$) et (D) AG031 (Δsuf) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en quatre : aucun ajout (●), ajout du PMS (30 μ M) (Δ), ajout de la norfloxacine (140 ng/mL) (\square) et ajout du PMS et de la norfloxacine (\diamond). Des échantillons sont prélevés au cours du temps, dilués et déposés sur boîte LB agar. Après 16h de croissance le nombre de cfu/mL est évalué. Le temps 0 correspond à l'ajout du PMS et/ou de la norfloxacine dans la culture bactérienne. L'expérience a été réalisée 3 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

Les résultats montrent que la survie de la souche wt diminue drastiquement, de plus de deux log, après une heure d'incubation avec la norfloxacine. Cela signifie que moins de 1% des cellules sont viables après une heure d'incubation avec la norfloxacine, confirmant l'effet bactéricide de cet antibiotique (Figure 28A). En présence de PMS et de norfloxacine, la survie de la souche wt reste identique à celle du temps t0 pendant 3 heures puis augmente aux temps 4 et 5 heures. Ceci montre que l'addition de PMS permet à la souche wt de résister au traitement norfloxacine. Lorsque la souche wt est incubée avec le PMS seulement, la survie reste identique à celle du temps t0 pendant 2 heures puis augmente.

Lorsque la même expérience est réalisée avec le mutant $\Delta soxR$ la survie diminue drastiquement, de plus de deux log, que le traitement avec la norfloxacine soit effectué avec ou sans PMS (Figure 28B). Lorsque le mutant $\Delta soxR$ est incubé avec le PMS seulement, la survie reste identique à celle du temps t0 durant toute la durée de l'expérience (5 heures). Ces résultats montrent que la résistance à la norfloxacine causée par la présence du PMS dépend de SoxR.

V.1.2. Contribution des machineries ISC et SUF à la résistance à la norfloxacine induite par le PMS

Pour tester l'importance des machineries ISC et SUF sur la résistance à la norfloxacine permise par le PMS via SoxR, j'ai réalisé la même expérience que celle décrite ci dessus en utilisant les mutants Δsuf et $\Delta iscUA$.

Les résultats montrent que la survie du mutant Δsuf diminue drastiquement, de plus de deux log, après une heure d'incubation avec la norfloxacine (Figure 28D). En présence de PMS et de norfloxacine, pendant les 5 heures d'incubation, la survie du mutant Δsuf reste identique à celle observée au temps t0. Ces résultats indiquent que l'addition de PMS permet au mutant Δsuf de résister au traitement norfloxacine. Lorsque le mutant Δsuf est incubé avec seulement le PMS, pendant les 5 heures d'incubation, la survie reste identique à celle mesurée au temps t0.

Avec le mutant $\Delta iscUA$, le traitement à la norfloxacine réduit la viabilité des cellules de plus de deux log, dès la première heure d'incubation (Figure 28C). En présence de PMS et de norfloxacine, la survie du mutant $\Delta iscUA$ reste identique à celle mesurée au temps t0 pendant 4 heures puis augmente, indiquant que l'addition de PMS permet au mutant $\Delta iscUA$ de résister au traitement avec la norfloxacine. Lorsque le mutant $\Delta iscUA$ est incubé avec seulement du PMS, la survie augmente au cours du temps confirmant que le mutant $\Delta iscUA$ est capable de pousser en présence de PMS. Ces résultats montrent que, comme pour la

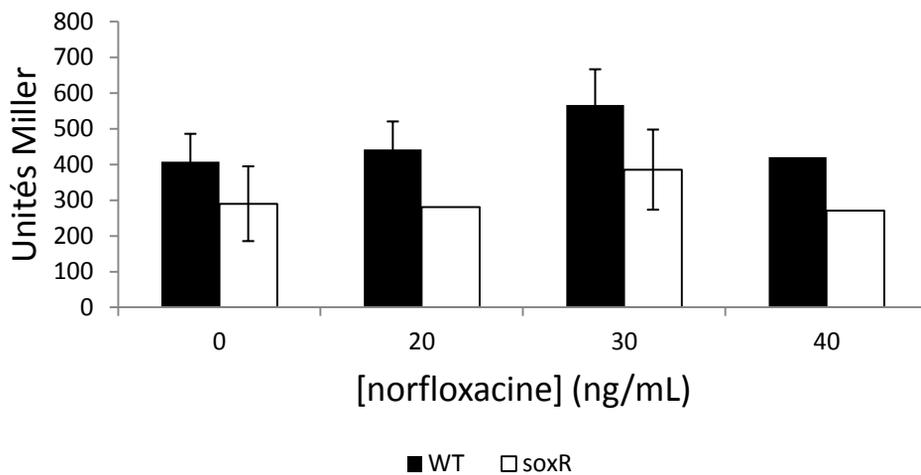


Figure 29 : L'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ lors d'une exposition à la norfloxacine.

Les souches BE1000 (WT) (noir) et AG035 ($\Delta soxR$) (blanc) contenant la fusion $P_{soxS}::lacZ$ sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont divisées en quatre et les différentes concentrations de norfloxacine sont ajoutées. Après deux heures d'incubation l'activité β -galactosidase est mesurée. L'expérience a été réalisée 2 fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

WT	CMI ng/mL
sans PMS	80
2,5 μ M PMS	110
5 μ m PMS	130
7,5 μ M PMS	>140
10 μ M PMS	>140
12,5 μ M PMS	>140
15 μ M PMS	>140
17,5 μ M PMS	>140

$\Delta iscUA$	CMI ng/mL
sans PMS	70
2,5 μ M PMS	100
5 μ m PMS	110
7,5 μ M PMS	140
10 μ M PMS	>140
12,5 μ M PMS	>140
15 μ M PMS	>140
17,5 μ M PMS	>140

Δsuf	CMI ng/mL
sans PMS	100
2,5 μ M PMS	140
5 μ m PMS	>140
7,5 μ M PMS	>140
10 μ M PMS	>140
12,5 μ M PMS	>140
15 μ M PMS	>140
17,5 μ M PMS	>140

$\Delta soxR$	CMI ng/mL
sans PMS	80
2,5 μ M PMS	90
5 μ m PMS	80
7,5 μ M PMS	70
10 μ M PMS	50
12,5 μ M PMS	50
15 μ M PMS	50
17,5 μ M PMS	50

Figure 30 : Mesure de la CMI de norfloxacine en présence de PMS.

Les souches BE1000 (WT), AG035 ($\Delta soxR$), AG030 ($\Delta iscUA$) et AG031 (Δsuf) sont cultivées en milieu LB jusqu'à la DO 0,35. Les cultures sont diluées au 500^e et mélangées avec les différentes concentrations de PMS et/ou de norfloxacine dans une microplaque de 96 puits pour avoir 2×10^4 cellules dans chaque puit. La DO_{600nm} est mesurée au TECAN au cours du temps et la CMI est définie.

souche wt, l'addition de PMS permet aux mutants Δsuf et $\Delta iscUA$ de résister à la norfloxacine en culture liquide.

J'ai vérifié que la norfloxacine seule ne permet pas d'activer le régulateur SoxR. En effet, que cela soit pour la souche wt, ou les mutants $\Delta soxR$, $\Delta iscUA$ et Δsuf , l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ est identique, sans ou avec addition de différentes concentrations de norfloxacine (de 20 à 250 ng/mL) (Figure 29).

Les machineries ISC et SUF ne contribuent pas à résistance à la norfloxacine induite par le PMS suggérant que quelque soit la machinerie présente la réponse SoxRS peut être déclenchée et permettre la résistance à la norfloxacine.

Toujours pour étudier l'impact de la maturation de SoxR sur la résistance à la norfloxacine induite par le PMS, j'ai mesuré la concentration minimale inhibitrice (CMI) de norfloxacine. La CMI est définie comme la concentration d'antibiotique la plus faible suffisante pour inhiber la croissance d'une souche bactérienne. La CMI de norfloxacine a été déterminée en présence de différentes concentrations de PMS. Les souches ont été cultivées en milieu riche jusqu'à la $DO_{600} = 0,35$ puis diluées au $500^{\text{ème}}$ et incubées avec la norfloxacine seule (0 à 140 ng/mL), le PMS seul (2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 et 17,5 μM), ou avec simultanément la norfloxacine et le PMS. Quand la norfloxacine et le PMS sont rajoutés ensemble, pour chaque concentration d'antibiotique plusieurs concentrations de PMS sont testées. La croissance des bactéries a été réalisée en microplaque de 96 puits (2×10^4 cellules dans chaque puits). La $DO_{600\text{nm}}$ est mesurée au TECAN après 16 heures de croissance.

Pour la souche sauvage, la CMI de norfloxacine est de 80 ng/mL (Figure 30). En présence de 2,5 μM et de 5 μM de PMS la CMI de norfloxacine est augmentée, et est respectivement de 110 ng/mL et 130 ng/mL. Avec 7 μM de PMS, la CMI de norfloxacine est supérieure à 140 ng/mL, qui est la concentration maximale que j'ai testée. Ces résultats illustrent une nouvelle fois que l'ajout de PMS permet à la souche wt de résister à la norfloxacine.

La CMI de norfloxacine du mutant $\Delta soxR$ est de 80 ng/mL. En présence de PMS (2,5 ; 5 ; 7,5 μM) la CMI de norfloxacine reste dans la même gamme (70-90 ng/mL) que celle mesurée sans PMS (Figure 30). Ceci indique que le PMS ne permet pas au mutant $\Delta soxR$ de résister à la norfloxacine.

Ces résultats confirment que *via* la régulation médiée par SoxR, le PMS permet de résister à la norfloxacine.

Avec des concentrations plus forte en PMS (10 ; 12,5 ; 15 et 17,5 μM) la CMI de norfloxacine du mutant ΔsoxR diminue. Ceci est très probablement du à l'effet cumulé de l'antibiotique et la toxicité de PMS sur le mutant ΔsoxR . En effet, la CMI du PMS est de 30 μM pour le mutant ΔsoxR (Figure 30).

Pour tester si, *via* leur rôle dans la maturation de SoxR, les machineries de biogénèse peuvent influencer sur la résistance à la norfloxacine provoquée par le PMS, j'ai déterminé la CMI de la norfloxacine, comme ci dessus, pour les mutants ΔiscUA et Δsuf

La CMI de norfloxacine du mutant Δsuf est de 100 ng/mL. En présence de 2,5 μM de PMS, la CMI de norfloxacine est augmentée (140 ng/mL) (Figure 30). Avec des concentrations supérieures en PMS (5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 et 17,5 μM) la CMI de norfloxacine est supérieure à 140 ng/mL.

La CMI de norfloxacine du mutant ΔiscUA est de 100 ng/mL. En présence de PMS, 2,5 ; 5 et 7,5 μM , la CMI de norfloxacine est augmentée et atteints respectivement 100, 110 et 140 ng/mL. Aux concentrations supérieures en PMS (10 ; 12,5 ; 15 et 17,5 μM) la CMI de norfloxacine est supérieure à 140 ng/mL (Figure 30).

Ces résultats montrent que l'ajout de PMS permet aux mutants Δsuf et ΔiscUA de résister à la norfloxacine.

En milieu liquide, pour la souche wt, j'ai pu montrer par mesure de la viabilité et des CMI de norfloxacine, que le PMS induit la résistance à la norfloxacine, de manière SoxR dépendante. J'ai également mis en évidence que le PMS peut aussi induire la résistance des mutants Δsuf et ΔiscUA à la norfloxacine, suggérant que quelque soit la machinerie présente la réponse SoxRS peut être déclenchée et permettre la résistance à la norfloxacine.

V. 2. Impact de la maturation de SoxR sur la résistance aux antibiotiques en milieu solide.

J'ai également testé la résistance à la norfloxacine provoquée par l'ajout de PMS en milieu LB solide. Pour cela, les souches ont été cultivées en milieu riche jusqu'en phase exponentielle de croissance, puis la culture est diluée et un aliquot de chaque dilution est déposé sur une boîte LB agar contenant uniquement de la norfloxacine (70 ng/mL), du PMS (40 et 50 μM), ou les deux drogues simultanément. La croissance des souches est observée après incubation des boîtes à 37°C.

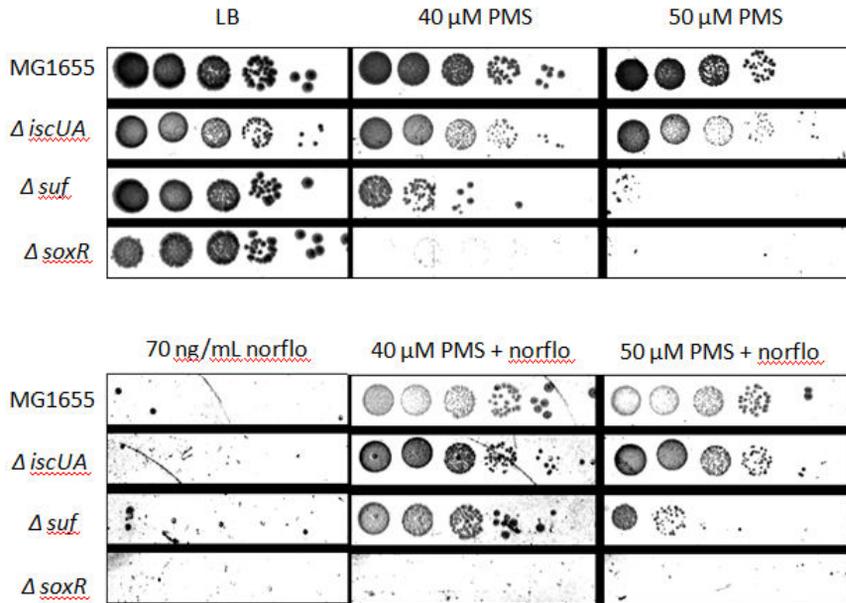


Figure 31 : Importance des machineries ISC et SUF pour la résistance d'*E. coli* à la norfloxacine via le PMS.

Les souches BE1000 (WT), AG035 ($\Delta soxR$), AG030 ($\Delta iscUA$) et AG031 (Δsuf) sont cultivées en milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance puis diluées et déposées sur boîte LB agar contenant différentes concentrations de PMS et/ou de norfloxacine. Après 16h d'incubation les boîtes de Pétri sont scannées.

Les résultats montrent que la souche wt est incapable de pousser en présence de 70 ng/mL de norfloxacine (Figure 31). L'ajout de 40 μ M et 50 μ M de PMS permet à la souche wt de résister à 70 ng/mL de norfloxacine. Illustrant, en milieu solide, la résistance à la norfloxacine induite par le PMS.

Le mutant Δ *suf* est incapable de pousser en présence de 70 ng/mL de norfloxacine (Figure 31). L'ajout de 40 μ M permet à mutant Δ *suf* de résister à 70 ng/mL de norfloxacine. Avec 50 μ M de PMS le mutant Δ *suf* peut résister à la norfloxacine, cependant la résistance est moindre que celle développée par la souche wt suggérant que la machinerie SUF pourrait contribuer à la résistance à la norfloxacine induite par le PMS.

Le mutant Δ *iscUA* est incapable de pousser en présence de 70 ng/mL de norfloxacine (figure 31), et l'ajout de 40 μ M ou 50 μ M de PMS lui permet de résister à la norfloxacine.

Le mutant Δ *soxR* est incapable de pousser sur les boîtes contenant de la norfloxacine et du PMS ainsi que sur les boîtes contenant uniquement le PMS. Les concentrations en PMS utilisées ici sont trop fortes pour permettre la croissance du mutant Δ *soxR*. En conclusion les résultats obtenus en milieu liquide et en milieu solide, montrent que le PMS permet aux mutants Δ *suf* et Δ *iscUA* de devenir résistants à la norfloxacine suggérant que quelque soit la machinerie présente, la réponse SoxRS est déclenchée et permet la résistance à la norfloxacine. Cependant cette capacité semble amoindrie dans le mutant Δ *suf*.

Différentes façons de mesurer la résistance à la norfloxacine médiée par SoxR ont été utilisées pour tester la contribution des machineries ISC et SUF dans ce phénomène. En conclusion, c'est en milieu solide que j'ai pu mettre en évidence un rôle de la machinerie SUF dans la résistance à la norfloxacine médiée par SoxR. Ceci est cohérent avec la contribution de la machineire SUF à la maturation de SoxR en stress PMS aérobie.

Discussion et perspectives

Comprendre la réponse cellulaire engendrée par les composés redox actifs est d'une importance majeure en biologie. En effet, les composés redox actifs incluent des antibiotiques, qui sont naturellement produits par une grande variété de bactéries, champignons et plantes, mais aussi des agents artificiels comme le paraquat utilisé comme herbicide depuis 1962 (Bromilow, 2004). Les composés redox actifs exercent leur effet *via* des cycles d'oxydation et de réduction. Ces agents peuvent avoir un effet bénéfique (molécule signal, développement du biofilm, accepteur terminal d'électron alternatif), ou être toxiques en perturbant l'homéostasie redox de la cellule en attirant les électrons et en les redirigeant vers de nouvelles cibles. Ainsi, les composés redox actifs peuvent oxyder le NADPH et entraîner une carence en NADPH, délétère pour de nombreuses réactions enzymatiques. D'autre part, des enzymes à centres métalliques peuvent aussi être inactivées par les composés redox actifs (Gu et Imlay 2011).

Etude des voies de maturation du régulateur transcriptionnel SoxR

Les bactéries entériques se protègent des composés redox actifs en activant un régulon qui est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel SoxR. SoxR possède un cofacteur à centre [2Fe-2S] essentiel pour son activité puisqu'il lui permet de percevoir l'état redox intracellulaire. L'oxydation mono-électronique du centre FeS entraîne un changement conformationnel permettant d'activer SoxR. Pour la majorité des régulateurs transcriptionnels à centre FeS comme IscR, FNR et NsrR, le signal perçu entraîne une modification de l'équilibre entre forme holo et forme apo du régulateur. La particularité de SoxR est que le signal perçu induit un changement de l'état d'oxydation du centre FeS, et que c'est sous cette forme holo-oxydée que SoxR est fonctionnel. Par conséquent, SoxR doit donc rester sous forme holo en présence des composés redox actifs. Compte tenu de l'effet délétère que peuvent avoir les composés redox actifs sur les centres FeS, j'ai cherché à comprendre comment SoxR est mûri en présence de ces composés. Cette étude s'inscrit aussi dans notre analyse des processus de maturation des différents types régulateurs transcriptionnels à centre FeS d'*E. coli*.

Mon travail a permis de mettre en évidence l'importance de la machinerie SUF pour la maturation de SoxR en aérobie lors d'une exposition au PMS. En effet, j'ai montré que dans le mutant Δsuf , l'activité de SoxR est diminuée par rapport à celle observée dans une souche sauvage. Réciproquement, dans une souche qui possède uniquement le système SUF ($\Delta iscUA$) l'activité de SoxR est identique à celle observée dans la souche sauvage. J'ai établi que le défaut de maturation de SoxR n'est pas lié à un problème de viabilité, en utilisant des

conditions où la viabilité du mutant Δsuf n'est pas affectée, soit en baissant la dose de PMS soit en utilisant un milieu minimum. Ainsi, ce travail démontre le rôle capital de SUF dans la maturation de SoxR en présence de PMS et en aérobie.

La machinerie ISC apparaît également capable de maturer SoxR mais dans des conditions de niveau de stress très bas (5 μ M). Toutefois, le fait que ISC soit capable de maturer SoxR quand celui-ci est surproduit montre qu'il n'y a pas d'impossibilité biochimique à ce que SoxR soit un substrat de la machinerie ISC. De plus l'expression de l'opéron *isc* est inductible par le PMS, laissant ouverte la possibilité que la maturation de SoxR par ISC puisse être considérée comme un événement d'importance mineure physiologiquement mais possible. La raison pour laquelle dans les conditions « aérobie + PMS », ISC ne mature pas SoxR est vraisemblablement liée au fait que le fonctionnement de la machinerie ISC est altérée lors d'un stress oxydant. En effet, il a été montré que le centre FeS en formation sur la protéine IscU peut être directement oxydé par le peroxyde d'hydrogène, et qu'en présence de 1 μ M de peroxyde d'hydrogène, la machinerie ISC est empoisonnée (Bitoun et al., 2008) (Jang et Imlay, 2010). Ceci pourrait être dû au fait que le centre FeS de la protéine IscU est exposé au solvant, et qu'un des atomes de Fer du centre n'est pas coordonné par une cystéine permettant au peroxyde d'hydrogène de réagir avec le centre FeS (Bandyopadhyay et al., 2008).

Un cas de figure opposé est rencontré avec les conditions « anaérobie + PMS ». En effet dans ce cas, c'est la machinerie ISC, mais pas la machinerie SUF qui est impliquée dans la maturation de SoxR. En anaérobie, l'induction de l'expression de *soxS* par le PMS nécessite l'addition de nitrate. Cette observation est en accord avec le fait que le paraquat induit l'expression de *sodA* en absence d'oxygène, si du nitrate ou du fumarate est présent (Privalle et Fridovich, 1988). Les composés redox actifs devant être continuellement re-oxydés par le pool de quinone, il est admis que la présence d'un accepteur terminal d'électron permettant de maintenir le flux d'électron ré-oxydant les quinones, est nécessaire et suffisante pour « activer » les composés redox, qu'il s'agisse de l'oxygène ou d'un autre accepteur. Dans ces conditions, l'induction de l'expression de *soxS*, par le PMS est en tout point identique dans le mutant Δsuf et dans la souche sauvage. De plus, l'expression de l'opéron *suf* n'est pas induite dans ces conditions. Nous pouvons ainsi conclure que lorsque le stress PMS est effectué en anaérobie, SoxR est mûré par la machinerie ISC et ceci est cohérent avec le fait que l'opéron *isc* soit induit dans ces conditions. Il est toutefois intéressant de noter que de telles conditions « anaérobie + PMS » ont été décrites comme causant des dommages aux protéines à centre FeS comme IlvD et LeuC (Gu et Imlay, 2011). Le mécanisme par lequel les composés redox actifs altèrent les protéines à centre FeS en anaérobie n'a pas été caractérisé.

Dans tous les cas, contrairement au stress PMS en aérobie, le stress généré en anaérobie n'apparaît pas affecter le fonctionnement de la machinerie ISC.

En conclusion ce travail a permis de différencier la contribution des deux machineries ISC et SUF dans la maturation de SoxR en conditions de stress PMS. En effet SUF est requis en aérobie et ISC en anaérobie. De plus, ce travail confirme que les voies de maturation des quatre principaux régulateurs à centre FeS d'*E. coli* IscR, FNR, NsrR et SoxR sont différentes et que la contribution des machineries dépend des conditions environnementales. La maturation de FNR, en aérobie, est strictement dépendante de la machinerie ISC, et même la surexpression de l'opéron *suf* ne permet pas de compenser l'absence de la machinerie ISC en aérobie (Mettert et al., 2008). La maturation du régulateur IscR est dépendante de ISC mais lorsqu'elle est surproduite, à partir d'un plasmide, la machinerie SUF permet de compenser l'absence de la machinerie ISC (Vinella et al., 2013). Il est important de souligner que la maturation de IscR par la surproduction de SUF peut prendre place y compris en conditions de limitation en fer, qui sont des conditions inductibles pour la synthèse de SUF. Comme la synthèse maximale de SUF requiert à la fois une limitation en fer et un stress oxydatif, il est envisageable qu'en de telles conditions de stress, l'induction maximale de l'expression de l'opéron *suf* chromosomique puisse permettre la maturation de IscR. Malheureusement ceci reste une hypothèse, la capacité de SUF surproduit, à supprimer une mutation *isc* n'ayant pas été testée en conditions de stress oxydant. La maturation de NsrR est également dépendante de ISC mais peut également être assurée par SUF surproduit en carence en fer (Vinella et al., 2013). Dans ce contexte, SoxR apparaît comme un nouveau cas. En effet, on retrouve le concept qu'une même cible peut être maturée par deux systèmes différents, selon le contexte environnemental, mais SoxR apparaît différent en ce qu'il semble être ciblé par l'un ou l'autre des deux systèmes sans nécessité de surproduction. Lorsqu'il s'agit de comprendre pourquoi une cible est mieux reconnue par une machinerie que par une autre, un premier type d'explication est que l'affinité de la protéine considérée est meilleure pour une machinerie que pour l'autre. Ainsi FNR serait un excellent substrat pour ISC mais son affinité avec SUF serait trop mauvaise pour permettre une reconnaissance. Le cas des autres régulateurs est plus ambiguë puisque la surproduction de la machinerie, à priori la moins affine, peut suffire pour améliorer l'efficacité de maturation. Ainsi, la surproduction de SUF permet la maturation de IscR et de NsrR alors que celle de ISC permet la maturation de SoxR. Si on suppose que la surproduction par plasmide interposé, mime un état d'induction maximal, alors on peut conclure que les trois régulateurs peuvent être, dans des conditions données, substrats pour les deux machineries. Toutefois, il est clair que la quantité de machinerie disponible ne sera pas

la seule variable à prendre en compte. Ainsi, la prééminence de la machinerie SUF dans la maturation de SoxR, lorsque les stress PMS a lieu en aérobie, va dans le sens d'une vision classique où le système SUF est requis en conditions de stress, notamment en stress oxydant (Nachin et al., 2001) (Jang et Imlay, 2010). En effet, il a été proposé que la machinerie SUF possède des caractéristiques lui permettant de résister au stress oxydatif. Ainsi, le centre FeS formé sur la protéine d'échafaudage du système SUF, SufB, est stabilisé par les protéines SufC et SufD, et est plus résistant au peroxyde d'hydrogène et à l'oxygène que celui formé sur la protéine d'échafaudage IscU (Blanc et al., 2014). De même, le centre FeS en formation sur la machinerie SUF serait protégé au sein du complexe protéique SufBCD et par conséquent moins accessible aux agents oxydants. L'acquisition du soufre dans le système SUF serait également plus robuste que dans le système ISC en condition de stress oxydant. En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'activité de la cystéine desulfurase de SufSE est plus forte que celle obtenue avec le complexe IscS-IscU (Dai et Outten, 2012). Récemment, une analyse phylogénétique a proposé que la machinerie SufBC constituait le cœur de la plus ancienne des machineries de biogénèse des centres FeS. Au cours de l'évolution, sous la pression de l'oxygène, la machinerie SUF se serait adaptée en recrutant les protéines SufSED (Boyd et al., 2014)

Ce travail a également ouvert des pistes vers de nouvelles inconnues. J'en citerai trois ci-dessous.

- En aérobie, dans la souche wt, l'expression de l'opéron *suf* est induite par le PMS. L'induction par le PMS étant toujours observée en absence d'IscR et Fur, deux régulateurs transcriptionnels contrôlant l'expression de l'opéron *suf*, cela indique qu'un autre régulateur intervient dans l'induction PMS-dépendante. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Lee et collaborateurs (Lee et al., 2008) qui ont montré que pour abolir totalement l'induction de l'opéron *suf* par le PMS il fallait déléter simultanément les gènes *iscR* et *oxyR*. Il est donc très vraisemblable que dans les conditions que j'ai utilisées, OxyR participe à l'induction de l'opéron *suf*. Ceci suggère qu'en présence du PMS du peroxyde d'hydrogène est aussi généré par l'intermédiaire du superoxyde.

- En anaérobie l'expression de *soxS* est induite par le PMS, mais le niveau d'expression de *soxS* est plus bas dans le mutant $\Delta iscUA$ que dans la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que la maturation de SoxR pourrait être affectée dans le mutant $\Delta iscUA$. Il est important de rappeler que dans les mutants *isc*, l'activité des complexes respiratoires anaérobies, comme la nitrate reductase, est affectée (Pinske et Sawers, 2012a). Ainsi, on peut imaginer qu'en absence de la machinerie ISC la chaîne respiratoire est ralentie,

l'activation du PMS diminuée et l'oxydation de SoxR également, ce qui expliquerait la diminution d'expression de *soxS*. L'utilisation de ferricyanide comme agent oxydant capable d'oxyder le pool de quinone en l'absence de substrats respiratoires pourrait être utile pour tester cette hypothèse. Contrairement à ce qui est observé pour la souche wt, l'induction par le PMS dans le mutant $\Delta iscUA$ est indépendante de la présence de nitrate. Une hypothèse attractive est que la toxicité du PMS soit indépendante de son activité redox cyclique et repose sur la capacité du PMS à former des adduits avec les thiols. Cette observation est d'importance dans le contexte du débat sur la nature du signal perçu par SoxR (Gu and Imlay, 2011).

- En accord avec la littérature, j'ai observé que le système RxC-RseC est important pour maintenir SoxR sous forme réduite (Koo et al., 2003). Les protéines RxB et/ou RxC possèdent chacune deux motifs typiques de fixation d'un centre [4Fe-4S] (Estellon et al., 2014). L'activité de SoxR est plus faible dans les mutants $\Delta iscAU$ et $\Delta nfuA$, que dans la souche sauvage. De façon intéressante, ceci rappelle le phénotype des mutants ΔrxC , ΔrxB et $\Delta rseC$. Notre hypothèse est que la machinerie ISC et la protéine de transport de centre FeS, NfuA, participeraient indirectement au maintien de SoxR sous forme réduite *via* leur contribution à la maturation des protéines RxB et/ou RxC.

La machinerie ISC, la protéine NfuA et même le système de réduction RxC-RseC ne semblent pas intervenir dans la réduction de SoxR en présence de stress PMS, même après élimination du PMS par dilution, suggérant que d'autres systèmes interviennent dans la réduction de SoxR.

Impact des machineries ISC et SUF sur la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur dans le traitement clinique des maladies infectieuses. Ces dernières années, plusieurs études ont montré des liens entre biogenèse des centres FeS et la sensibilité aux antibiotiques. Par exemple, un mutant *iscS* est plus résistant aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides qu'une souche sauvage. Le mutant *iscAU* est hyperrésistant à la gentamycine (Ezraty et al., 2013). Le mutant *nfuA* de *P. aeruginosa* est hypersensible à plusieurs familles d'antibiotiques (Daung-nkern et al., 2010). Récemment, au laboratoire une explication moléculaire a été fournie qui permet de comprendre pourquoi le mutant *iscAU* est hyperrésistant à la gentamycine. Il a été montré que dans le mutant *iscAU*, du fait d'un défaut de maturation du complexe I, la force proton motrice (PMF) est diminuée ce qui limite l'import PMF-dépendant des antibiotiques de la classe des aminoglycosides (Ezraty et al., 2013).

Chez des souches cliniques et chez des souches issues des laboratoires, l'activation du régulon SoxRS augmente la résistance aux quinolones et aux chloramphénicol. Ainsi, des souches cliniques présentant une résistance multiple aux antibiotiques se sont avérées portant une mutation dans SoxS ou dans SoxR provoquant l'expression constitutive du régulon SoxRS. De plus, l'activation de SoxR par les composés redox actifs confère également une résistance aux antibiotiques (Aly et al., 2015) (Koutsolioutsou et al., 2005). La résistance aux antibiotiques *via* l'activation du régulon SoxRS est attribuée à l'activation de la pompe à efflux AcrAB-TolC empruntée par une large gamme d'antibiotiques et l'inhibition d'OmpF, porine de la membrane externe par le petit ARN non codant MicF.

L'activation de SoxR par les composés redox actifs augmente la résistance d'*E. coli* aux antibiotiques. J'ai donc cherché à établir si il existe un lien entre la maturation de SoxR et la résistance des bactéries à la norfloxacine, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones. J'ai observé que l'ajout de PMS protégeait les mutants $\Delta iscAU$ et Δsuf de la toxicité de la norfloxacine. Cet effet de protection n'a pas lieu avec le mutant $\Delta soxR$. Mes résultats suggèrent que les deux machineries ISC et SUF sont capables de murer SoxR lors d'une exposition des bactéries à la norfloxacine.

Sensibilité d'*E. coli* aux composés redox actifs

Le PMS est connu et utilisé pour engendrer du superoxyde dans les cellules. En aérobie, mes résultats confirment que les bactéries sont sensibles au PMS de façon superoxyde dépendant. En effet en absence de la superoxyde dismutase à manganèse (SodA), la sensibilité des bactéries au PMS augmente. J'ai pu également montrer que l'absence des deux superoxydes dismutases cytoplasmiques (à cofacteur à manganèse et à fer (SodB)) exacerbe la sensibilité de mes souches au PMS. Cependant, dans la plupart des cas l'absence de SodB n'a aucun effet. SodA et SodB sont exprimées en fonction du niveau de fer intracellulaire. Quand le niveau en fer est élevé le régulateur Fur bloque la synthèse de la superoxyde dismutase à manganèse SodA. Quand le niveau en fer est faible, la désactivation de Fur stimule la synthèse de SodA et la transcription du petit ARN non codant RhyB qui dégrade l'ARNm de la superoxyde dismutase à fer. L'absence de SodA augmente la sensibilité des bactéries au PMS puisque SodB est probablement peu active dans ces conditions. La production de superoxyde par le PMS pourrait destabiliser l'atome de fer de Fur entraînant l'activation de RhyB. Le niveau de fer intracellulaire pourrait aussi être plus faible en présence de PMS. Enfin le co-facteur à manganèse de la superoxyde dismutase est résistant au stress oxydant contrairement au co-facteur à fer qui pourrait être destabilisé par le superoxyde. Le fait qu'un

pourcentage de bactérie survie en absence de SodA et que la double mutation des superoxydes dismutases rend les bactéries extrêmement sensible au PMS suggèrent que SodB contribue à la résistance au PMS en absence de SodA. Toutefois, une partie des bactéries reste viable en absence de SodA et SodB ce qui suggère que d'autres systèmes permettent aux bactéries de se défendre contre le PMS. Il faut noter qu'il existe une superoxyde dismutase périplasmique à co-facteur cuivre-zinc synthétisé pendant la phase stationnaire de croissance. Puisque le superoxyde ne peut franchir les membranes bactériennes SodC contribue à l'élimination du superoxyde formé dans le périplasme suggérant que le PMS puisse se retrouver dans ce compartiment cellulaire. Des systèmes de réparation pourraient aussi compenser les dommages causés par le superoxyde et être responsable de la survie des cellules dans un double mutant *sodAB*.

En aérobie j'ai montré que la machinerie SUF est nécessaire à la résistance des bactéries au PMS. Puisque la machinerie SUF est nécessaire à la maturation de SoxR on aurait pu imaginer que c'est le défaut de maturation de SoxR qui cause la grande sensibilité des bactéries en absence de la machinerie SUF en milieu riche. En milieu minimum sans ajout des 20 acides aminés, la sensibilité des bactéries par le superoxyde est attribuée à la destabilisation des centres [4Fe-4S] des déshydratases qui permettent la biosynthèse des acides-aminés branchés. En milieu minimum, j'ai confirmé que l'ajout de la leucine, de l'isoleucine et de la valine dans le milieu de culture est requis pour la croissance des bactéries en absence de la machinerie SUF mais ne restaure pas le défaut de maturation de SoxR (Figure annexe 1). Mes résultats suggèrent que l'absence de SUF provoque d'autres dommages que SoxR dans la cellule et que les déshydratases en sont la cible.

J'ai montré que les souches cultivées en anaérobie sont moins sensible au PMS qu'en aérobie. Toutefois pour de très fortes concentrations en PMS, la machinerie SUF apparait être nécessaire à la résistance au PMS. L'agent qui provoque le stress au PMS en anaérobie est donc capable de destabiliser les centres [4Fe-4S] des déshydratases. De plus, en anaérobie le PMS inactive aussi la fumarase B *in vivo* et la fumarase A *in vitro*. Les enzymes peuvent être réactivées par ajout du dithiothréitol, de fer ferreux, de la protéine IscS et de cystéine, un cocktail connu pour reconstruire les centres FeS suggérant qu'une oxydation des protéines à centres FeS directement par le PMS est possible (Gu et Imlay, 2011). La machinerie SUF est requise pour la croissance en « anaérobie + PMS » ce qui est en accord avec l'aérobie. En revanche, la machinerie SUF n'est pas nécessaire à la maturation de SoxR en « anaérobie + PMS ».

Conservation des machineries ISC et SUF dans le monde vivant

La machinerie SUF étant nécessaire à la maturation des protéines lors d'un stress oxydant il serait intéressant de vérifier si les bactéries exposées au stress ont conservé uniquement la machinerie SUF ou si celles dont le milieu environnemental est dépourvu de stress ont conservé uniquement la machinerie ISC.

Les bactéries lactiques qui génèrent des doses de peroxyde d'hydrogène de l'ordre du millimolaire avec leur pyruvate et lactate oxydases, contiennent uniquement la machinerie SUF. Les bactéries pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecalis* ou *Xylella fastidiosa* qui sont couramment exposées au peroxyde d'hydrogène généré par la réponse immunitaire de leur hôte contiennent également uniquement la machinerie SUF tout comme les chloroplastes qui produisent des sources réactives de l'oxygène (Robinson, 2009) (Averyanov, 2009) (Asada, 2006). Il semblerait que les bactéries qui sont exposées continuellement au stress oxydant ont évolué pour avoir uniquement la machinerie SUF. De façon surprenante, certaines bactéries vivant en anaérobie sont également dispensée de la machinerie ISC et n'ont que la machinerie SUF et la machinerie Nif. La conservation de la machinerie SUF chez ces espèces est attribuée à leur exposition potentielle avec du peroxyde d'hydrogène produit par les réactions chimiques de l'environnement quand de l'eau contenant du métal réduit est exposée à l'oxygène. D'ailleurs toutes les bactéries anaérobies obligatoires expriment les catalases et/ou les peroxydases (Imlay, 2008). Le fait que le PMS puisse être toxique en anaérobie justifie la raison pour laquelle certaines bactéries anaérobies ont conservé leur machinerie SUF puisqu'elles peuvent potentiellement rencontrer des composés redox actifs. Ce qu'il reste à éclaircir c'est comment font les bactéries qui ont uniquement l'opéron *suf* pour répondre à un stress au superoxyde ? En effet j'ai montré qu'en aérobie l'expression de l'opéron *suf* en réponse au PMS est dépendante d'IscR suggérant que les bactéries qui ont que l'opéron *suf* possèdent un homologue d'IscR ailleurs sur le chromosome ou qu'elles régulent l'opéron *suf* autrement. On peut aussi imaginer que le niveau basal de la machinerie SUF soit élevé dans ces bactéries. Elles pourraient être dépourvues du régulateur Fur par exemple.

Certains organismes possèdent uniquement la machinerie ISC, comme les eucaryotes non photosynthétiques. Cet arrangement unique est possible parce-que l'assemblage des protéines à centre FeS est effectué dans la mitochondrie fournissant une protection face à l'environnement extracellulaire et que les mitochondries ont des enzymes d'élimination des oxydants additionnelles (Park et al., 2000) (Petrova et al., 2004). La question qui se pose est

comment font ces espèces pour assurer la biogenèse des protéines à centre FeS lorsqu'elles sont soumises à un stress oxydant. Est-ce-que leur machinerie ISC a évolué pour être plus résistante ?

Partie II

Effet du CO₂ sur le stress au H₂O₂ chez *E. coli*

Introduction

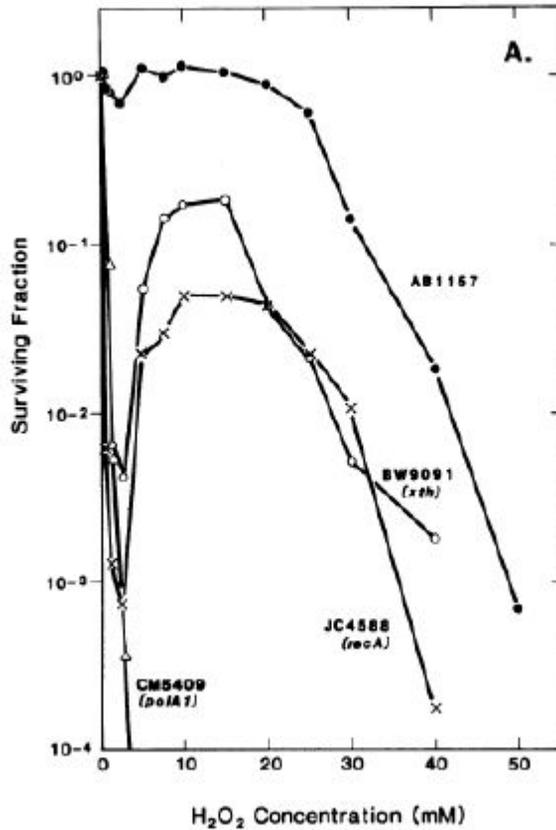


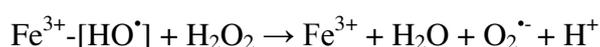
Figure 1 : Survie d'*E. coli* à un stress au peroxyde d'hydrogène

La sensibilité d'*E. coli* au H_2O_2 présente une cinétique selon deux modes distincts : la mortalité par le mode 1 dont le maximum se situe à une concentration de 1 à 2 mM d' H_2O_2 , et la mortalité par le mode 2 aux plus fortes concentrations. AB1157 : souche sauvage; BW9091 : mutant Δxth (déficient en exonucléase III); JC4588 : mutant $\Delta recA$ (déficient dans le système de réparation des cassures de l'ADN par recombinaison homologue et induction du système SOS); CM5409 : mutant $\Delta polA1$ (déficient en activité polymérase et 3'-5' exonucléase de l'ADN polymérase I) (D'après Imlay, 1986).

La concentration en CO₂ atmosphérique actuelle est d'environ 390 ppm. Cependant, une évolution vers 1000 ppm est prévue pour 2100. Bien que des études sur les impacts environnementaux aient été faites, l'influence directe du CO₂ sur les organismes vivants est peu étudiée. Or, d'après les dernières données de la littérature, il semble que le CO₂ joue un rôle dans le stress oxydatif. En effet, il a été montré que le CO₂ exacerbe la toxicité de l'oxygène chez *E. coli* (Ezraty et al., 2011). Le CO₂ interagit *in vivo* avec les formes réactives de l'oxygène (ROS) pour générer deux nouvelles ROS, le radical carbonate (CO₃^{•-}) et l'anion peroxyarbonate (HCO₄⁻). Au cours de la première année de ma thèse, réalisée dans l'équipe de Sam Dukan, je me suis intéressée au rôle du CO₂ dans le stress au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Mon travail a consisté à tester expérimentalement des prédictions obtenues par simulation à l'aide d'un modèle d'équations différentielles et à interpréter le rôle du CO₂ en se basant sur ces résultats *in silico* et *in vivo*.

I. Les deux modes d'action du peroxyde d'hydrogène

En 1986, James Imlay montrait pour la première fois que le H₂O₂ était toxique selon deux modes d'action distincts. En effet, le suivi de la survie des cellules en fonction de la concentration d'H₂O₂ montre une cinétique en deux parties : une première partie est une chute de la survie qui apparaît pour de faibles concentrations en H₂O₂ (avec un maximum de létalité entre 1 et 3 mM), suivie d'une remontée du nombre de survivants. La deuxième partie de la cinétique est une seconde chute de la survie aux plus fortes concentrations (entre 20 et 50 mM) (Figure 1). La première diminution de la survie désignée sous le terme de mode 1, serait due à des dommages à l'ADN. En effet, il a été montré que des mutants déficients dans les mécanismes de réparation de l'ADN par excision des bases (*xth*) et recombinaison (*rec*) ont un taux de survie beaucoup plus faible que la souche wt et ceci principalement pour les faibles concentrations en H₂O₂ (Figure 1) (Imlay et Linn, 1986). Aux concentrations d'H₂O₂ intermédiaires (entre 5 et 15 mM), une remontée du taux de survie est observée. Cette remontée a été interprétée comme le « quenching » du HO[•] par le H₂O₂ selon la réaction suivante :



Enfin, la deuxième chute de la survie aux plus fortes concentrations en H₂O₂ (à partir de 20 mM) est appelée mode 2. La raison de la mortalité des cellules lors du mode 2 est mal connue mais il est probable qu'aux fortes concentrations, le H₂O₂ cause directement des dégâts à des macromolécules autres que l'ADN.

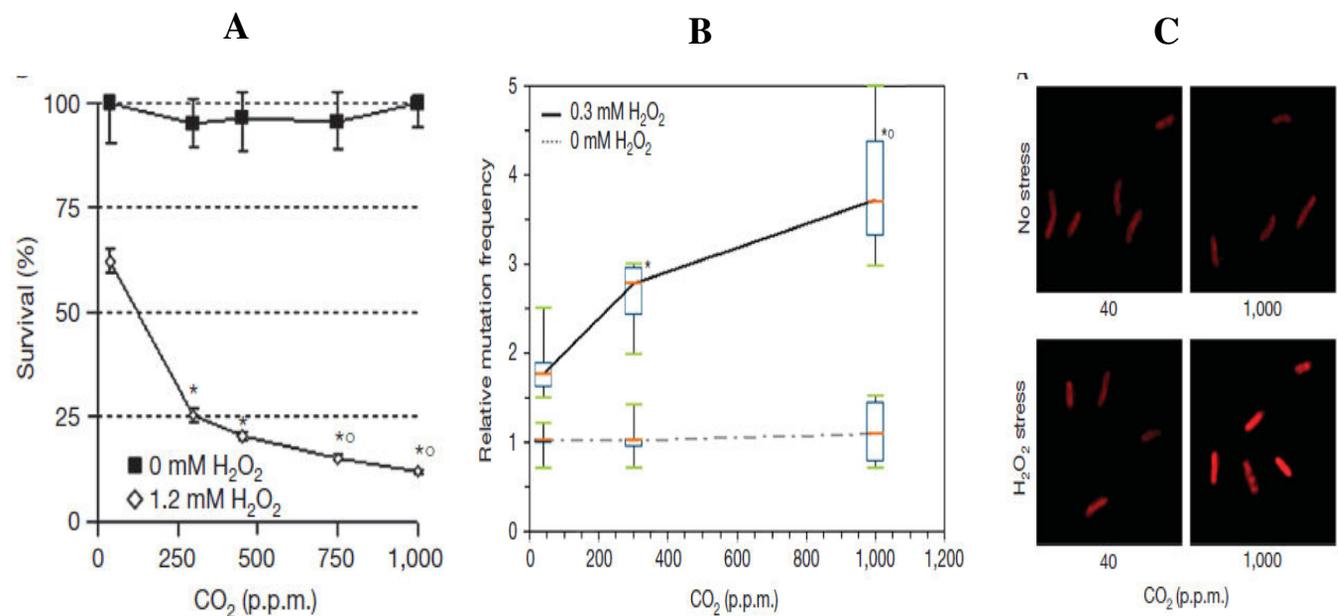


Figure 2 : Influence de la concentration en CO₂ sur la survie d'*E. coli*, la fréquence de mutation et le nombre de lésions sur l'ADN

(A) Effet synergique de la concentration en CO₂ atmosphérique sur la létalité d'*E. coli* au H₂O₂. (B) La concentration en CO₂ atmosphérique augmente la fréquence de mutation de l'ADN induit par le H₂O₂. C : L'estimation du niveau de 8-oxo-guanine permet d'évaluer la quantité de dommages à l'ADN causés par le H₂O₂ à 40 ou 1000 ppm en CO₂. La présence de 8-oxoguanine est visible par fluorescence. Une augmentation de la fluorescence est observée à 1000 ppm en CO₂ en présence d'un stress au H₂O₂.

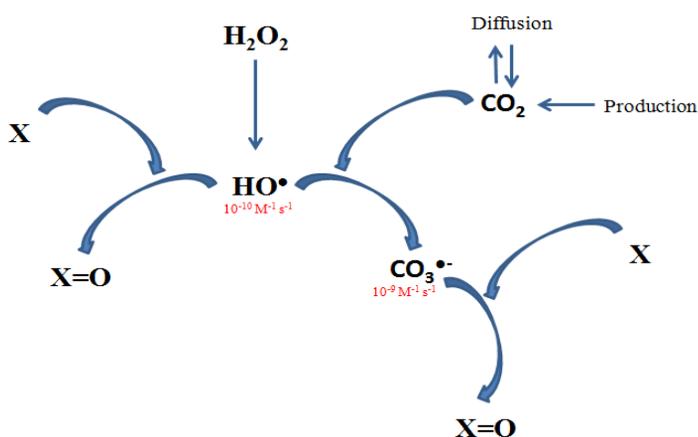


Figure 3 : Modèle impliquant le CO₂ dans le mode 1

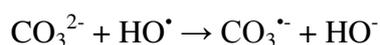
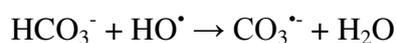
Le HO[•] oxyde soit une molécule X pour former X=O, soit le CO₂ pour former du CO₃^{•-} qui oxyde ensuite X pour former X=O.

II. Le dioxyde de carbone, nouvel acteur du stress oxydatif

Le CO₂ atmosphérique est en équilibre avec le CO₂ dissous, l'ion bicarbonate (HCO₃⁻), et l'ion carbonate (CO₃²⁻) présents dans un milieu liquide selon la réaction suivante :



De façon intéressante, l'oxydation des acides aminés par la réaction de Fenton est dépendante de la présence en ion bicarbonate (HCO₃⁻). Il a été proposé que cette dépendance soit due à la génération du CO₃^{•-} selon les réactions suivantes (Berlett et al., 1990) (Stadtman et Berlett, 1991) (Hug et Leupin, 2003) :



Les radicaux CO₃^{•-} sont des oxydants puissants (E CO₃^{•-}/HCO₃⁻ = 1,7V) qui réagissent *in vitro* principalement avec les résidus guanine de l'ADN et les acides aminés tryptophanes, tyrosines, cystéines, méthionines et histidines suggérant que le CO₂ pourrait être impliqué dans le stress oxydatif *in vivo* (Stadtman et Berlett, 1991) (Shafirovich et al., 2001).

Une étude plus récente a montré l'importance de la concentration en CO₂ sur les dommages oxydatifs causés par le H₂O₂ *in vivo*. En effet, chez *E. coli*, l'augmentation du CO₂ atmosphérique lors d'un stress au H₂O₂ s'accompagne de l'augmentation de différents paramètres comme la mort cellulaire, la fréquence de mutation de l'ADN et le nombre de lésions au niveau de celui-ci (Figure 2) (Ezraty et al., 2011). Un certain nombre d'arguments ont conduit les auteurs à proposer le radical carbonate (CO₃^{•-}) comme agent responsable de l'augmentation des dommages provoqués par le H₂O₂ lors d'une augmentation en CO₂ atmosphérique (Figure 3). En particulier, les lésions au niveau de l'ADN, qui se traduisent par la présence de 8-oxo-guanines, augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration en CO₂. Il a été montré que le CO₃^{•-} est plus sélectif que le HO[•] pour oxyder les guanines (Shafirovich et al, 2001). La corrélation entre l'augmentation du CO₂ et l'oxydation des guanines laisse donc penser que cette oxydation serait due à la génération des CO₃^{•-}.

III. Un modèle d'équations différentielles pour mesurer la concentration en ROS chez *E. coli*

A ce jour, il n'existe aucune technique capable de mesurer les concentrations en HO[•] et en CO₃^{•-} dans une cellule ou de les différencier. Faute de pouvoir doser expérimentalement ces radicaux, un modèle *in silico* permettant de simuler l'évolution de chaque ROS a été construit et a fait l'objet d'une publication (Uhl et Gerstel 2015 en reviewing). Ce modèle mathématique, réalisé par Lionel Uhl, est basé sur un ensemble d'équations différentielles qui prend en compte des réactions chimiques liant les ROS et se produisant au sein d'*E. coli*. Des données de la littérature ont été utilisées pour déterminer les concentrations en enzymes et molécules dans la cellule ainsi que leurs propriétés cinétiques et leurs constantes de réaction. Ma contribution à ce travail a été de valider *in vitro* ou *in vivo* les prédictions obtenues par le modèle *in silico*.

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés aux paramètres qui peuvent influencer la sensibilité mode 1 dépendante d'*E. coli* lors d'une exposition au H₂O₂. Les résultats *in silico* et *in vivo* montrent que la mortalité des cellules *via* le mode 1 est principalement liée à deux paramètres, d'une part la concentration en fer libre et d'autre part la densité cellulaire. La première partie de mon travail a consisté à valider expérimentalement le modèle simulant la concentration des formes réactives de l'oxygène. La deuxième partie de mon travail a été d'étudier l'impact du CO₂ sur un stress au H₂O₂ *in vivo* en utilisant les prédictions de la concentration en HO[•] et CO₃^{•-} pendant un stress au H₂O₂ obtenues *in silico*.

RESULTATS

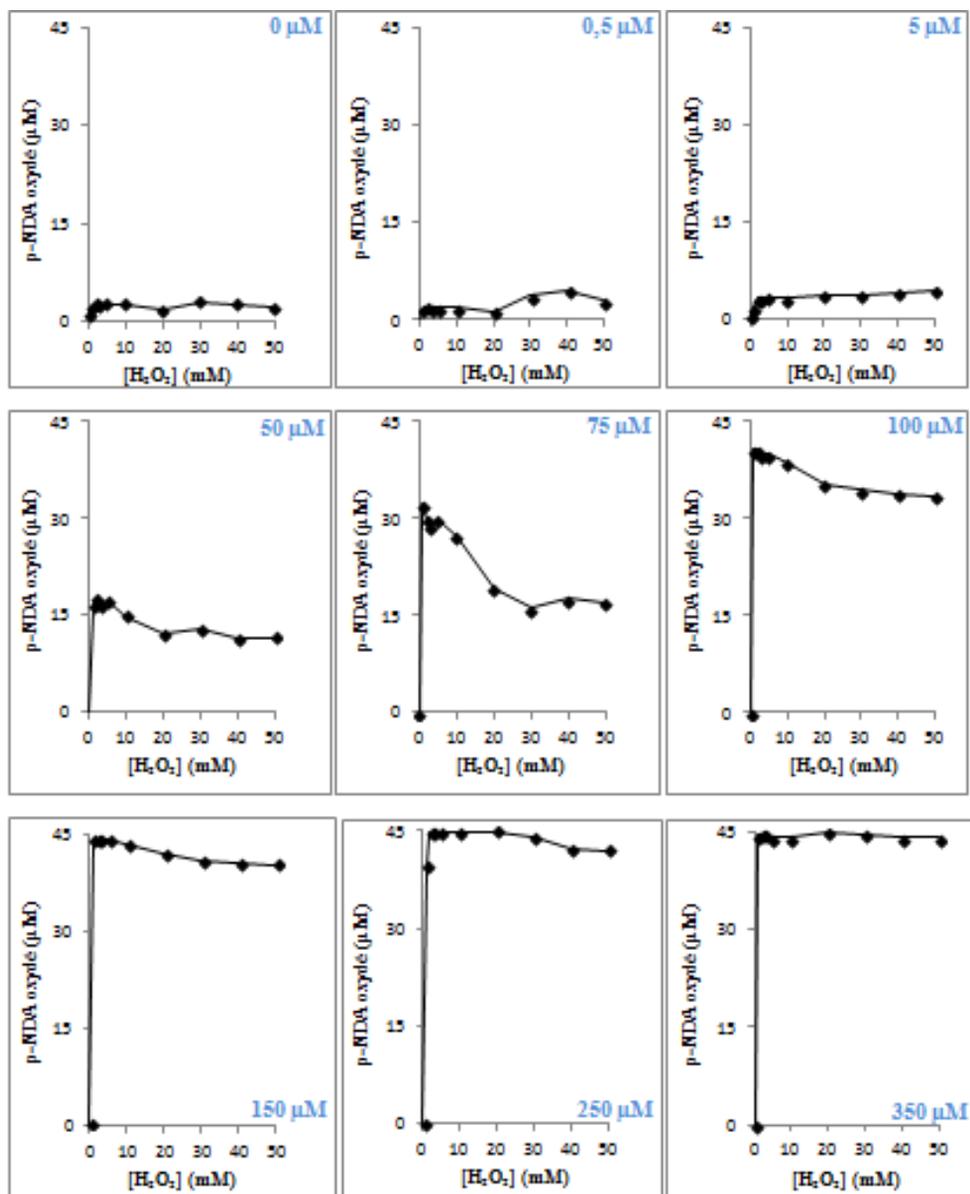


Figure 1 : Influence de la concentration en Fe²⁺ sur la réaction de Fenton *in vitro*

Après avoir mélangé le FeSO₄ (concentration indiquée en bleu de 0 à 350 μM) au p-NDA (45 μM) dans de l'eau milli-Q® stérile (le tout à 37°C), la réaction est initiée par ajout de H₂O₂ (0 à 40 mM). Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 minutes avant d'être dilué au 10^e. La lecture de la DO_{400nm} est effectuée au spectromètre. Les courbes représentent, pour chaque concentration de FeSO₄ testée, la concentration de p-NDA oxydée en fonction de la concentration de H₂O₂. Cette expérience a été reproduite 3 fois et une expérience représentative est présentée.

I. La limitation en fer est nécessaire pour obtenir un profil d'oxydation de l'ADN de type mode 1

La réaction de Fenton est une réaction entre le Fe^{2+} et le H_2O_2 qui aboutit à la formation du HO^\bullet . Le modèle a été utilisé pour simuler la quantité d'ADN oxydé par le HO^\bullet produit lors de la réaction de Fenton en fonction de la concentration d' H_2O_2 dans deux conditions. La première intègre le paramètre fer libre comme une variable des équations différentielles, alors que la deuxième intègre le fer comme une constante. Les résultats *in silico* montrent que si le fer est intégré au modèle en tant que variable, la quantité d'ADN oxydé augmente en fonction de la concentration en H_2O_2 puis redescend (Figure du papier 1). A l'inverse, quand le fer est considéré comme constant, la quantité d'ADN oxydé augmente en fonction du temps avant d'atteindre un plateau. Le fer semble être un paramètre à prendre en compte pour obtenir *in silico* un profil mode 1 (augmentation de la quantité d'ADN oxydé aux faibles concentrations de H_2O_2 , suivi d'une diminution aux fortes concentrations).

Afin de tester l'influence du fer sur la réaction de Fenton *in vitro*, j'ai effectué des tests d'oxydation du N, N 4 nitroso-diméthyle aniline (p-NDA) *in vitro*. Pour ce faire, j'ai mélangé du sulfate ferreux (FeSO_4 de 0 à 350 mM) et du H_2O_2 (de 0 à 40 mM) dans différentes solutions « tampons » à pH 6,5 (qsp 1,5 mL). Une augmentation du taux de réaction de Fenton doit entraîner une oxydation du p-NDA qui se traduit par un changement de l'absorbance à 440 nm.

Dans un premier temps, j'ai repris les conditions expérimentales décrites dans l'article de Wolf Bors de 1978 (Bors et al., 1979). Cependant, la composition de la solution tampon n'était pas décrite. J'ai montré que le p-NDA était oxydé *via* la réaction de Fenton uniquement dans l'eau milli-Q® (pH 6,5) mais pas dans un tampon phosphate (0,05 M, quelque soit le pH testé) ou encore dans du PBS (1 M ; pH 7,4) ou du Tris-HCL (1 M ; pH 7,5). Dans l'eau milli-Q®, et à partir de 50 μM de FeSO_4 , la concentration de p-NDA oxydé augmente en fonction de la concentration de H_2O_2 pour atteindre un maximum (18 μM) vers 1 mM en H_2O_2 . Puis la concentration de p-NDA oxydé diminue pour se stabiliser vers 11 μM (Figure 1). Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration en FeSO_4 augmente le niveau maximum d'oxydation du p-NDA mais empêche la diminution de la concentration de p-NDA oxydé aux fortes concentrations en H_2O_2 . Ainsi, à 350 μM , de FeSO_4 la concentration de p-NDA oxydé reste de 45 μM quelque soit la concentration de H_2O_2 appliquée.

Mes résultats confirment les prédictions obtenues *in silico* : la limitation en fer est un paramètre important pour l'obtention *in vitro* d'une augmentation de la quantité de p-NDA oxydé par le HO[•] aux faibles concentrations de H₂O₂ suivi d'une diminution aux plus fortes concentrations, caractéristique du mode 1.

II. Importance de la densité cellulaire sur le mode 1

II. 1. Une forte densité cellulaire augmente l'élimination du H₂O₂ ajouté dans le milieu de culture

La modélisation de la quantité d'H₂O₂ restante 15 minutes après son ajout a été simulée *in silico* pour différentes concentrations de cellules. Les résultats montrent que la concentration en H₂O₂ restante après 15 minutes augmente en fonction de la concentration en H₂O₂ appliquée (Figure 8 du papier). L'augmentation de la concentration de cellules diminue la concentration d'H₂O₂ restante après incubation. Les résultats suggèrent qu'une forte densité cellulaire accélère l'élimination du H₂O₂ dans le milieu de culture. Afin de tester cette hypothèse *in vivo*, j'ai appliqué différentes concentrations d'H₂O₂ pour deux concentrations de cellules (9×10^5 cellules/mL et 9×10^8 cellules/mL) et j'ai mesuré la concentration d'H₂O₂ après 15 minutes d'incubation. Pour ce faire, j'ai utilisé le kit *Amplex® red hydrogen peroxide/peroxidase*. Mes résultats montrent que la concentration d'H₂O₂ restante dans le milieu de culture contenant 9×10^5 cellules/mL augmente en fonction de la concentration en H₂O₂ appliquée (Figure 7 du papier). Par contre, la concentration d'H₂O₂ reste au niveau minimum pour une culture contenant 9×10^8 cellules/mL. La concentration d'H₂O₂ dans le milieu de culture dépend donc de la densité cellulaire. Mes résultats *in vivo* sont en accord avec les résultats obtenus *in silico*.

II. 2. Une forte densité cellulaire supprime la sensibilité *via* le mode 1

L'effet de la densité cellulaire sur l'oxydation de l'ADN en présence de H₂O₂ a été testé *in silico*. La modélisation montre que le pourcentage d'ADN oxydé augmente en fonction de la concentration en H₂O₂ jusqu'à un maximum avant de redescendre aux plus fortes concentrations (Figure 9 du papier). Une augmentation de la concentration cellulaire a pour effet de diminuer le pourcentage d'ADN oxydé (0,25 % d'ADN oxydé à 10^6 cellules/mL contre 0,1 % pour 10^8 cellules/mL) et de décaler la concentration en H₂O₂ nécessaire pour atteindre le maximum d'ADN oxydé (1 mM d'H₂O₂ pour 10^6 cellules/mL contre 10 mM pour 10^8 cellules/mL). La densité cellulaire du milieu de culture a un impact sur le pourcentage

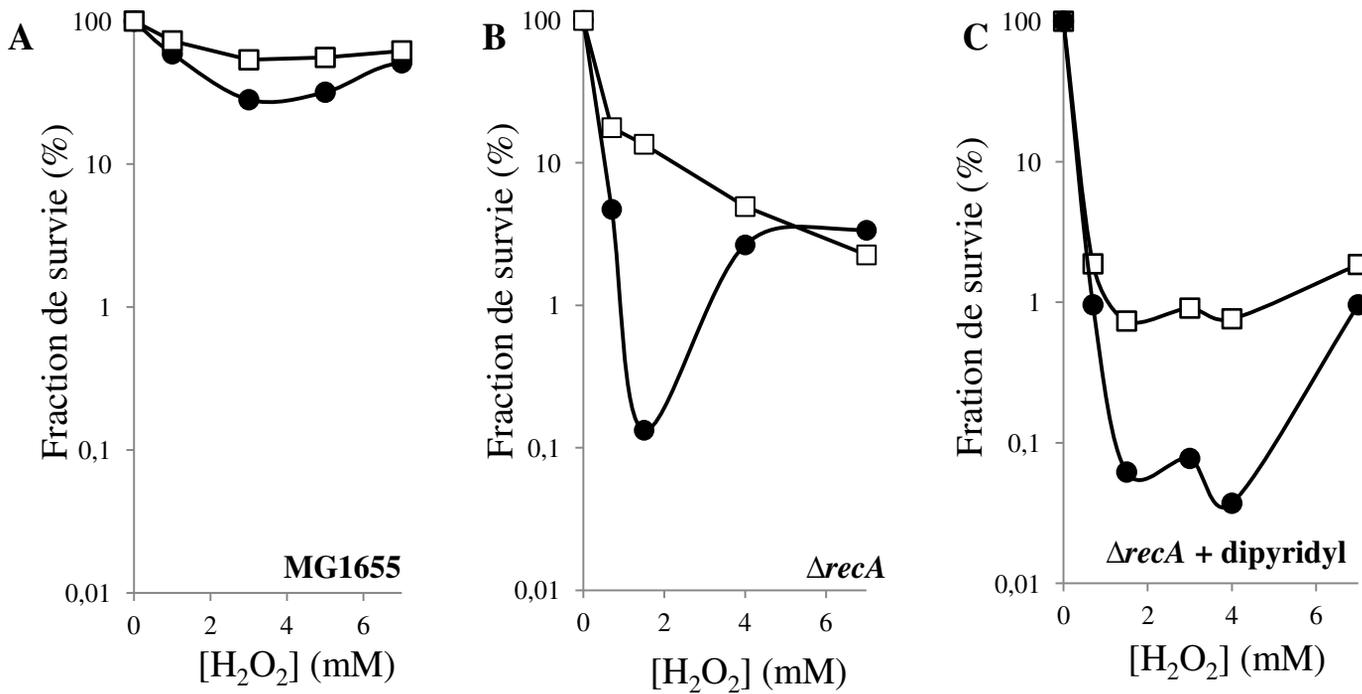


Figure 2 : Influence de la concentration bactérienne sur la présence du mode 1

Les souches MG1655 (A), et $\Delta recA$ (B) sont cultivées jusqu'à $DO_{600nm}=1$. Les cultures sont diluées (●) (1000 fois) ou non (□) dans du milieu de culture LB initialement préchauffé à 37°C. Par la suite, le stress au H₂O₂ est appliqué pendant 15 minutes puis stoppé par ajout de 200 U de catalase. 100 μ L de culture sont dilués dans du tampon phosphate (pH 7, 0,05 M, 4°C) puis étalés sur boîtes de Pétri. Les dénombrements sont réalisés après 16H d'incubation. L'expérience de chélation du fer a été effectuée sur 10⁵ cfu/ml en ajoutant 1 mM de 2,2'-dipyridyl au milieu de culture (B). Les expériences ont été reproduites 4 fois et une expérience représentative est reportée.

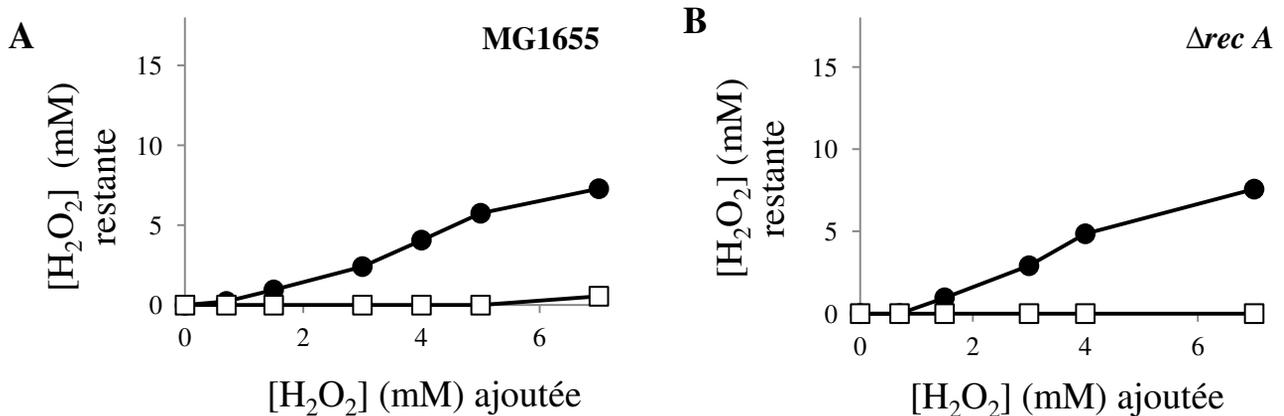


Figure 3 : Influence de la concentration bactérienne sur la consommation du H₂O₂

Les souches MG1655 (A) et $\Delta recA$ (B) provenant d'une culture en phase exponentielle sont diluées (●) (1000 fois) ou non (□) puis exposées au H₂O₂ (pendant 15 minutes). Les bactéries sont centrifugées et les surnageants récoltés. Le H₂O₂ présent dans les surnageants est dosé à l'aide du kit Amplex® red hydrogen peroxide / peroxidase par lecture au TECAN à 560 nm. Les expériences ont été reproduites 3 fois, une expérience représentative est reportée.

d'ADN oxydé *in silico*. Traduit en termes de létalité, ces simulations suggèrent que la mortalité par le mode 1 disparaît pour des concentrations en bactéries supérieures à 10^8 cfu/mL. Afin de tester cette prédiction *in vivo*, j'ai suivi la survie des cellules en fonction de faibles concentrations en H_2O_2 (correspondant au mode 1) pour la souche wt et les mutants *recA* et Hpx pour deux concentrations en bactéries (5×10^5 cfu/mL et 5×10^8 cfu/mL). Afin de travailler sur des cellules dans le même état physiologique, les bactéries sont cultivées jusqu'à $DO_{600nm}=1$ (10^8 cfu/mL) puis diluées ou pas jusqu'à 5×10^5 cfu/mL dans du LB frais préchauffé à 37°C. Mes résultats montrent la présence du mode 1 lorsque les cultures à 10^5 cfu/mL (wt et $\Delta recA$) sont exposées au H_2O_2 (Figure 2). Ce résultat confirme que le mode 1 est exacerbé dans un mutant $\Delta recA$ (Imlay et al, 1986). La disparition du mode 1 est flagrante pour le mutant $\Delta recA$ lorsque 10^8 cfu/mL sont exposées au H_2O_2 . Mes résultats sont en accord avec les prédictions obtenues *in silico* : le mode 1 disparaît quand la concentration cellulaire est élevée.

Afin de tester le rôle de la réaction de Fenton dans le mode 1, la même expérience que ci-dessus a été réalisée en présence d'un chélateur de fer. L'ajout du 2,2' dipyridyl (chélateur de fer) conduit à la disparition du mode 1 lorsque 10^5 cfu/mL ($\Delta recA$) sont exposées au H_2O_2 . Ceci suggère que la réaction de Fenton produisant du HO^\bullet est bien la cause de la létalité par le mode 1.

La disparition du mode 1 avec 10^8 cfu/mL pourrait avoir différentes origines et la plus simple serait une consommation plus rapide du H_2O_2 par le nombre élevé de cellules. Afin de savoir si tel est le cas, j'ai dosé le H_2O_2 restant après 15 minutes d'incubation dans le milieu contenant 10^5 ou 10^8 cfu/mL. Les résultats montrent que la totalité du H_2O_2 appliqué est éliminé du milieu de culture au bout de 15 minutes à 10^8 cfu/mL mais pas à 10^5 cfu/mL (Figure 3). Par conséquent, la disparition du mode 1 avec 10^8 cfu/mL est due à l'élimination du H_2O_2 vraisemblablement causé par le nombre élevé de cellules.

Afin de tester si la consommation plus efficace du H_2O_2 permet d'expliquer la perte du mode 1 à 10^8 cfu/mL, j'ai utilisé un mutant Hpx, déficient dans les systèmes de dégradation du H_2O_2 . Dans un premier temps, j'ai dosé le H_2O_2 restant après 15 minutes d'incubation dans le milieu contenant 3×10^5 ou 3×10^8 cfu/mL du mutant Hpx. Les résultats montrent que la concentration en bactéries n'affecte pas la concentration finale en H_2O_2 résiduelle (Figure 4). La concentration restante est équivalente à celle initialement ajoutée. J'ai donc comparé la survie au H_2O_2 de 10^5 à 10^8 cfu/mL chez un mutant Hpx. Comme il est décrit dans la Figure 5A, le mode 1 disparaît lorsque 10^8 cfu/mL de cellules mutantes Hpx sont exposées au H_2O_2 . De plus, l'ajout du 2,2' dipyridyl (chélateur du fer) conduit à la disparition du mode 1 lorsque

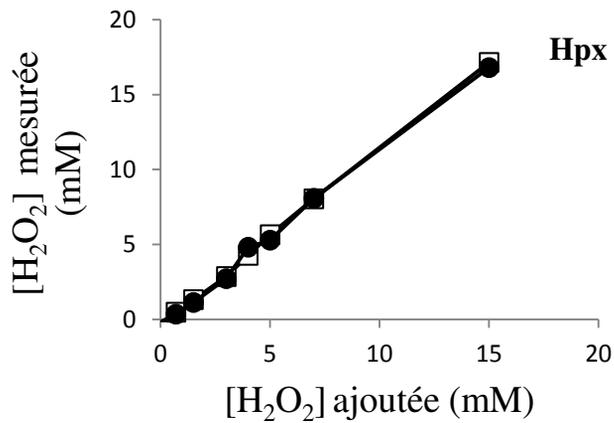


Figure 4 : Influence de la concentration bactérienne sur la consommation du H₂O₂

La souche mutante Hpx provenant d'une culture en phase exponentielle est diluée (●) (1000 fois) ou non (□) puis exposée au H₂O₂ (pendant 15 minutes). Les bactéries sont centrifugées et les surnageants récoltés. Le H₂O₂ présent dans les surnageants est dosé à l'aide du kit Amplex® red hydrogen peroxide / peroxidase par lecture au TECAN à 560 nm. Les expériences ont été reproduites 3 fois, une expérience représentative est reportée.

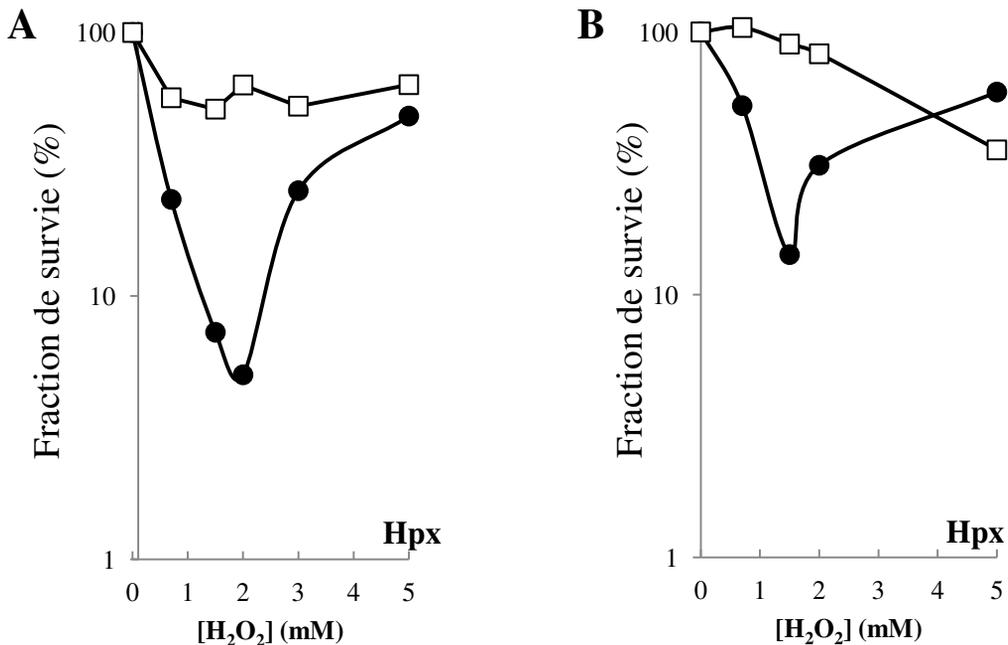


Figure 5 : Influence de la concentration bactérienne sur la présence du mode 1 chez un mutant Hpx.

La souche Hpx est cultivée jusqu'à DO_{600nm}=1. Les cultures sont diluées (●) (1000 fois) ou non (□) dans du milieu de culture LB initialement préchauffé à 37°C. Par la suite, le stress au H₂O₂ est appliqué pendant 15 minutes puis stoppé par ajout de 200 U de catalase. 100 µL de culture sont dilués dans du tampon phosphate (pH 7, 0,05 M, 4°C) puis étalés sur boîtes de Pétri. Les dénombrements sont réalisés après 16h d'incubation (A). L'expérience de chélation du fer a été effectuée sur 10⁵ cfu/ml en ajoutant 1 mM de 2,2'-dipyridyl au milieu de culture (B). Les expériences ont été reproduites 4 fois et une expérience représentative est reportée.

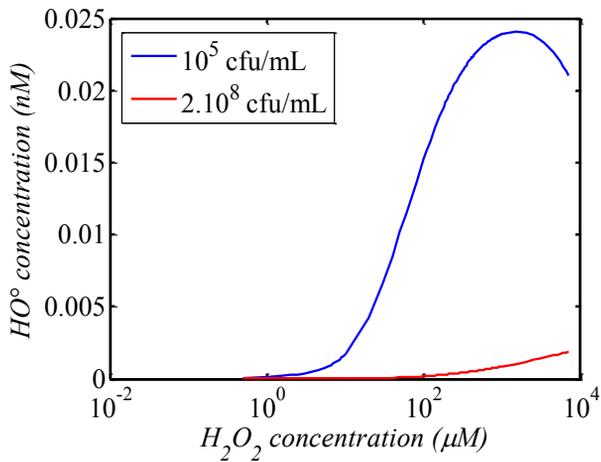
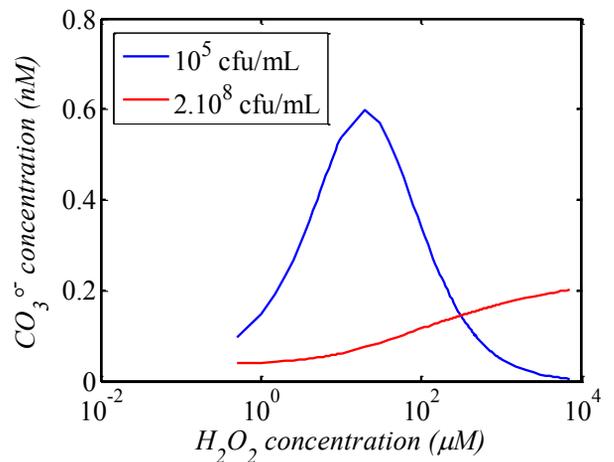
A**B**

Figure 6 : Simulation de la concentration en HO[•] et CO₃^σ pour deux concentrations en cellules exposées au H₂O₂

La figure (A) représentant la concentration en HO[•] et la figure (B) représentant la concentration en CO₃^σ en fonction de la concentration en H₂O₂ ont été obtenues à l'aide du modèle d'équations différentielles en utilisant deux concentration en cellules : 10⁵ cfu/mL (bleu) 2×10⁸ cfu/mL (rouge).

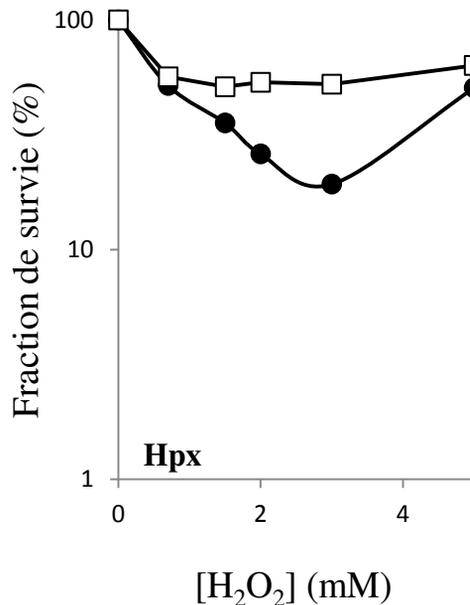


Figure 7 : Rôle de la concentration en CO₂ dans la disparition du mode 1 aux fortes concentrations en bactéries

La souche mutante Hpx est cultivée avec bullage (●) ou non (□) du milieu de culture par pompage de l'air ambiant. Le stress au H₂O₂ est appliqué pendant 15 minutes puis stoppé par ajout de 200 U de catalase. 100 μL de culture sont dilués dans du tampon phosphate (pH 7; 0,05 M; 4°C) puis étalés sur boîtes de Pétri. Les dénombrements sont réalisés après 16H d'incubation. Les expériences ont été reproduites 3 fois, une expérience représentative est reportée.

10^5 cfu/mL du mutant Hpx sont exposées au H_2O_2 (Figure 5B). Ceci confirme là encore le rôle de la réaction de Fenton dans le mode 1 observé. Les résultats indiquent que la disparition du mode 1 à 10^8 cfu/mL est observée chez le mutant Hpx⁻, chez qui il n'y a pas d'élimination du H_2O_2 dans le milieu de culture.

L'ensemble des résultats *in vivo* et *in silico* indiquent que l'augmentation de la concentration en bactéries conduit à une disparition du mode 1. Cette disparition n'est pas liée à la consommation du H_2O_2 .

III. Impact du CO_2 sur la létalité mode 1 dépendante

III. 1. Le CO_2 est responsable de la disparition du mode 1 aux fortes concentrations en bactéries

Une hypothèse pour expliquer la diminution de la mortalité par le mode 1 à 10^8 cfu/mL est l'augmentation de la concentration en CO_2 dans le milieu de culture qui pourrait interagir avec le HO^\bullet . En effet, d'après des simulations *in silico*, les bactéries produisent du $CO_{2dissous}$ plus rapidement que le temps nécessaire au CO_2 pour atteindre l'équilibre avec la phase gazeuse (non représenté). La pression partielle en CO_2 est donc très rapidement en saturation. Par exemple, pour 10^8 bactéries/mL, la concentration en $CO_{2dissous}$ est de $1,36 \times 10^{-4}$ M (ce qui correspond à une atmosphère à 4000 ppm en CO_2), alors que dans le milieu LB contenant 10^5 cfu/mL cette valeur est 10 fois plus faible. On peut donc émettre l'hypothèse que la perte du mode 1 pour 10^8 cfu/mL est la conséquence de l'augmentation de la concentration en $CO_{2dissous}$. Une modélisation de la concentration en HO^\bullet et $CO_3^{\bullet-}$ en fonction de la concentration en H_2O_2 a été effectuée *in silico* pour deux concentrations en cellules (5×10^5 cfu/mL et 2×10^8 cfu/mL). Les résultats montrent que les concentrations en HO^\bullet et $CO_3^{\bullet-}$ sont très diminuées en présence de 2×10^8 cfu/mL comparé à 5×10^5 cfu/mL (Figure 6). La perte de la létalité par le mode 1 quand la culture contient 10^8 cfu/mL semble être due à une diminution des radicaux HO^\bullet et $CO_3^{\bullet-}$.

Afin de tester cette hypothèse *in vivo*, j'ai suivi la survie de 3×10^8 cfu/mL de la souche mutante Hpx pour de faibles concentrations en H_2O_2 (correspondant au mode 1) en maintenant la concentration en $CO_{2dissous}$ constante par bullage de l'air ambiant dans le milieu. Les résultats montrent que le mode 1 réapparaît dans ces conditions (Figure 7).

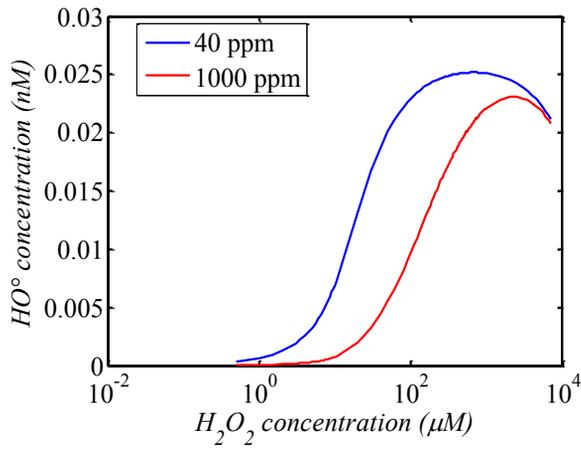
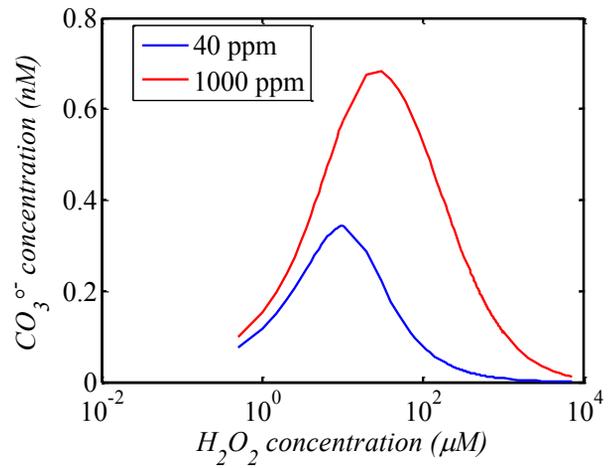
A**B**

Figure 8 : Simulation de la concentration en HO• et CO₃^{•-} en fonction de la concentration en H₂O₂ pour deux teneurs en CO₂

La figure (A) représentant la concentration en HO• et la figure (B) représentant la concentration en CO₃^{•-} en fonction de la concentration en H₂O₂ ont été obtenues à l'aide du modèle d'équations différentielles en utilisant deux concentration en CO₂ : 40 ppm (bleu) 1000 ppm (rouge).

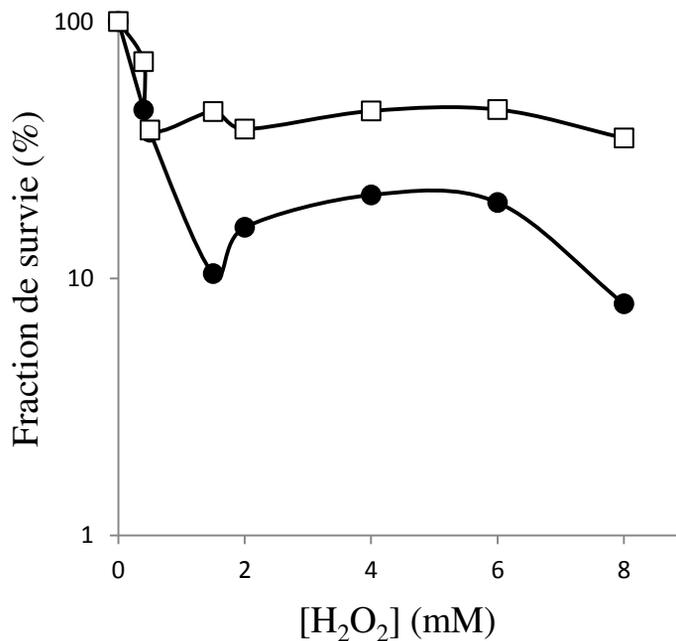


Figure 9 : Influence de la [CO₂] sur la survie du mutant *oxyR* face au H₂O₂

La souche mutante $\Delta oxyR$ est cultivé en LB contenant 40 (●) ou 1000 ppm (□) en CO₂. Les cultures sont ensuite diluées 1000 fois dans du milieu de culture préchauffé à 37°C et équilibré à 40 ou 1000 ppm en CO₂. Par la suite, le stress au H₂O₂ est appliqué pendant 15 minutes puis stoppé par ajout de 200 U de catalase. 100 μL de culture sont diluées dans du tampon phosphate (pH 7, 0,05 M, 4°C) puis étalés sur boîtes de Pétri. Les dénombrements sont réalisés après 16H d'incubation à 37°C. Les expériences ont été reproduites 3 fois, une expérience représentative est reportée.

III. 2. Une forte concentration en CO₂ atténue la sensibilité *via* le mode 1

Le modèle d'équations différentielles a été utilisé pour simuler l'évolution des concentrations en HO[•] et CO₃^{•-} intracellulaire en fonction de la concentration en H₂O₂ pour deux teneurs en CO₂. Les résultats montrent que pour chaque concentration en H₂O₂, la concentration en CO₃^{•-} augmente entre 40 ppm et 1000 ppm de CO₂ (Figure 8B). Le phénomène inverse est observé pour la concentration en HO[•] (Figure 8A). D'autre part, les concentrations en CO₃^{•-} et HO[•] passent par un maximum qui se situe entre 0,1 et 1 mM en H₂O₂. Comme la mortalité *via* le mode 1 est due à des dommages à l'ADN, qui est la cible aussi bien du HO[•] que du CO₃^{•-}, la question se pose de savoir quel est l'impact de la concentration en CO₂ atmosphérique sur la létalité.

J'ai donc comparé la survie d'*E. coli* lors du mode 1 à 40 et 1000 ppm en CO₂. Cette étude a été effectuée sur un mutant *oxyR* en phase exponentielle de croissance. OxyR est une protéine de la famille des régulateurs LysR qui contrôle la transcription de gènes impliqués dans la protection contre le H₂O₂. Avant mon arrivée, l'équipe avait montré une augmentation des activités catalase et alkyl peroxydase entre 40 et 1000 ppm chez une souche wt suggérant l'induction du régulon OxyR entre 40 et 1000 ppm en CO₂. Cette augmentation étant absente dans un mutant *oxyR*, il paraissait plus judicieux de travailler sur cette souche afin d'avoir effectivement la même concentration perçue en H₂O₂. Les résultats, montrent que la fraction de survie est toujours supérieure lorsque les bactéries sont cultivées à 1000 ppm par rapport à 40 ppm de CO₂ et ceci quelle que soit la concentration d'H₂O₂ (Figure 9).

L'ensemble des résultats montre que l'augmentation de la concentration en CO₂ réduit la létalité due au mode 1 lors d'un stress au H₂O₂.

IV. Impact du CO₂ sur les dommages à l'ADN lors du mode 1

IV. 1. Le CO₂ diminue l'oxydation du p-NDA lors de la réaction de Fenton

Les courbes simulées de l'évolution de l'oxydation du p-NDA (*via* la réaction de Fenton) en fonction de la concentration en H₂O₂ et en présence de fer, révèlent une diminution théorique de l'oxydation du p-NDA à 1000 ppm par rapport à 0 ppm en CO₂ atmosphérique (Figure 10). Afin de tester cette prédiction *in vivo*, j'ai mesuré l'oxydation du p-NDA via la réaction de Fenton en fonction de deux concentrations en CO₂ atmosphérique (0 et 1000 ppm en CO₂). Comme le montre la Figure 11, les concentrations en p-NDA oxydé sont significativement

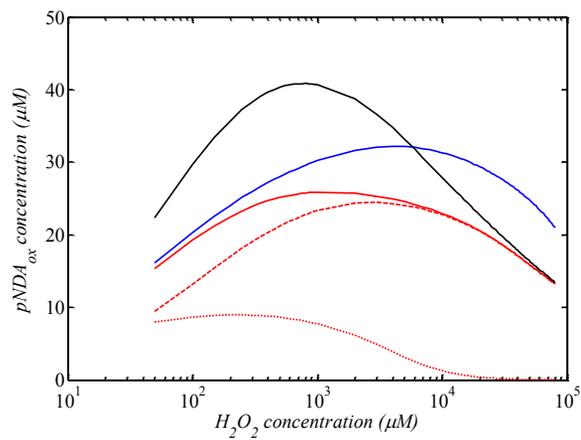


Figure 10 : Influence de la concentration en CO_2 sur l'oxydation du p-NDA via la réaction de Fenton.

En bleu : évolution de la [p-NDA] oxydée simulée en fonction de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ à 0 ppm en CO_2 ; **En rouge**, évolution de la [p-NDA] oxydée simulée en fonction de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ à 1000 ppm en CO_2 ; **En rouge - -**, évolution de la [p-NDA] oxydée simulée apportée par la réaction avec le $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en fonction de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ à 1000 ppm en CO_2 ; **En rouge - - -**, évolution de la [p-NDA] oxydée simulée apportée par la réaction avec le HO^{\cdot} en fonction de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ à 1000 ppm en CO_2 ; Finalement, **en noir**, évolution de la [p-NDA] oxydée simulée en fonction de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ à 1000 ppm en CO_2 si la constante de réaction avec le p-NDA était équivalente à celle du HO^{\cdot} ;

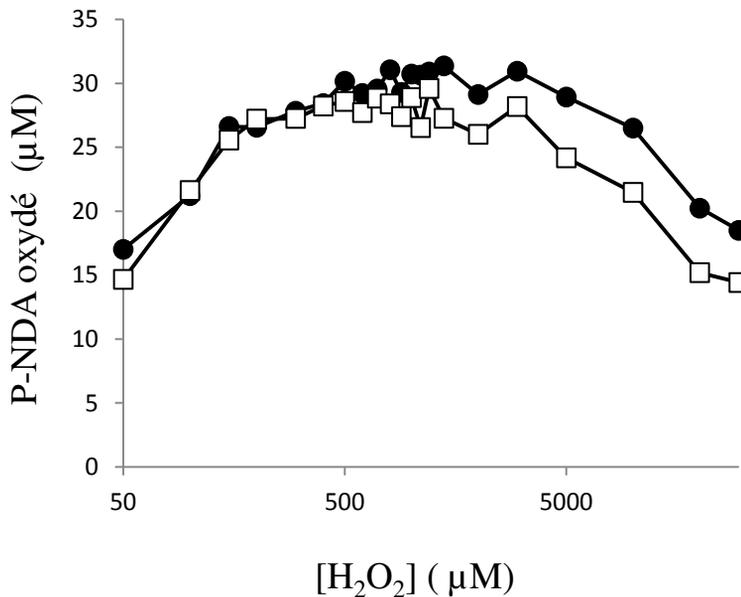


Figure 11 : L'oxydation du p-NDA lors de la réaction de Fenton *in vitro* dépend de la $[\text{CO}_2]$ atmosphérique

Les réactions sont réalisées en mélangeant $75 \mu\text{M}$ de FeSO_4 et $45 \mu\text{M}$ de p-NDA avec la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ à tester (0 à 40 mM) dans de l'eau milli-Q® stérile. Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 minutes avant d'être dilué au 10^{e} . La lecture de la DO est effectuée au spectromètre à 440nm. Les courbes représentent la [p-NDA] oxydé en fonction de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ selon la $[\text{CO}_2]$ (0 ppm (●) ou 1000 ppm (□)). Chaque point représente la moyenne d'au moins 5 expériences. Les écart-types sont inférieures à $1 \mu\text{M}$.

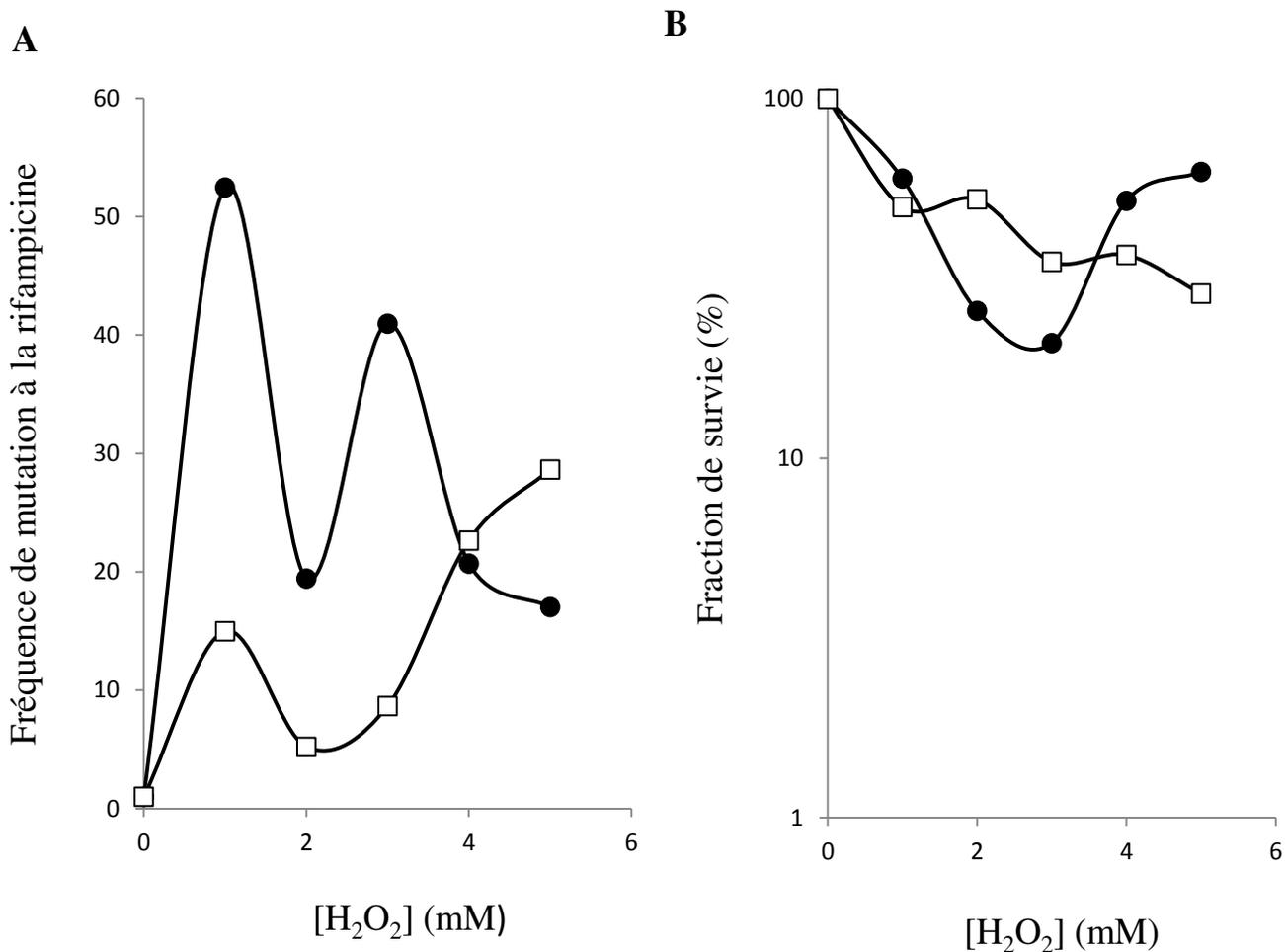


Figure 12 : L'augmentation de la teneur en CO₂ diminue la fréquence de mutation d'*E. coli* en présence de H₂O₂.

La souche wt est cultivée jusqu'à DO_{600nm}=0,5 en présence de 50 ppm (●) ou 5 % (□) de CO₂. Les cellules sont exposées au H₂O₂ pendant 15 minutes puis le stress est stoppé par ajout de 200 U de catalase. 100 μL de culture sont dilués dans du tampon phosphate (pH 7, 0,05 M, 4°C) puis étalés sur boîtes de Pétri contenant de la rifampicine ou du LB seul. Les dénombrements sont réalisés après 16H d'incubation pour la rifampicine (A) ou le LB seul (B). Les expériences ont été reproduites plus de 3 fois et une expérience représentative est reportée.

plus faibles à 1000 ppm par rapport à 0 ppm en CO₂ (visible de 1,2 à 30 mM d'H₂O₂). Le CO₂ semble protéger le p-NDA de son oxydation par le HO[•].

IV. 2. Le CO₂ diminue le taux de mutagenèse en présence de H₂O₂

Afin de tester l'impact du CO₂ sur le taux de mutagenèse d'*E. coli* en présence de H₂O₂ j'ai comparé la fréquence de mutation d'une souche wt aux faibles concentrations d'H₂O₂ (correspond au mode 1) à 50 ppm et 5 % en CO₂. Pour ce faire, après 15 minutes d'incubation avec le H₂O₂, les cellules sont déposées sur boîte LB contenant de la rifampicine. Seules les cellules ayant subi une mutation dans le gène *rpoB* sont capables de croître sur cet antibiotique. Les résultats montrent que la présence du H₂O₂ augmente la fréquence de mutation à la rifampicine des souches cultivées avec 50 ppm de CO₂ (Figure 12 A). Deux concentrations en H₂O₂ entraînent les augmentations les plus fortes, d'un facteur 50 à 1 mM d'H₂O₂ et d'un facteur 40 à 3 mM d'H₂O₂. La fréquence de mutation des souches cultivées à 5 % de CO₂ est significativement plus faible. Aux faibles concentrations d'H₂O₂ (correspondant au mode 1) la fréquence de mutation est diminuée d'un facteur 3 en présence d'1 mM d'H₂O₂ et d'un facteur 5 en présence de 3 mM d'H₂O₂.

En parallèle, la courbe de survie de la souche wt montre que le mode 1 est présent quand les cellules sont cultivées en présence de 50 ppm en CO₂ mais qu'il disparaît à 5 % de CO₂ (Figure 12 B). Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration en CO₂ diminue le taux de mutagenèse lors du mode 1.

L'ensemble des résultats suggèrent que les dommages à l'ADN provoqués lors d'un stress au H₂O₂, et responsables de la létalité *via* le mode 1, sont diminués par le CO₂.

Discussion

Il est largement admis que les ROS peuvent endommager *in vivo* et *in vitro* toutes les macromolécules telles que les protéines, les acides nucléiques et les lipides membranaires. Plus récemment, il a été montré *in vitro* que le HO[•] réagit avec le CO₂ (ou les formes hydratées) pour donner du CO₃^{•-}, une nouvelle ROS (Augusto et al., 2002).

Le rôle du CO₃^{•-} dans le stress oxydatif *in vivo* est encore mal connu mais il a été publié récemment que le CO₂ exacerbe la toxicité au H₂O₂. Le CO₃^{•-} pourrait être responsable de ce phénomène (Ezraty et al 2011).

Grâce au système d'équations différentielles permettant de simuler l'évolution de la concentration en ROS dans la cellule en fonction de la concentration en H₂O₂ appliquée, il a été montré *in silico* que l'ajout de H₂O₂ augmente la concentration en CO₃^{•-} et en HO[•] dans la cellule (Figure 6). De plus, pour une concentration en H₂O₂ donnée, quand la concentration en CO₂ passe de 40 à 1000 ppm, la concentration en HO[•] diminue alors que la concentration en CO₃^{•-} augmente (Figure 8). Ainsi, lors de ma thèse j'ai étudié le mode d'action du H₂O₂, et plus particulièrement le mode 1 causé par des lésions à l'ADN, en tenant compte de ce nouveau paramètre qui est la concentration en CO₂ atmosphérique. En effet, durant le mode 1 c'est l'ADN qui est touché et il est admis, *in vitro*, que les radicaux HO[•] et CO₃^{•-} endommagent l'ADN. J'ai montré que le CO₂ protège de la toxicité aux faibles concentrations de H₂O₂ et ceci probablement *via* la formation *in vivo* du CO₃^{•-}. Lors de ma thèse j'ai montré que le CO₂ agit comme un protecteur d'*E. coli* aux faibles concentrations de H₂O₂ correspondant au mode 1.

De façon surprenante, le phénomène inverse a été montré par Ezraty et al. en 2011. En effet les auteurs ont pu observer que l'augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique exacerbe la toxicité au H₂O₂. Nous avons donc essayé de comprendre qu'elle(s) différence(s) expérimentale(s) pourrai(en)t être à l'origine de cette inversion d'effet du CO₂.

Tout d'abord, dans les expériences conduisant à un effet toxique du CO₂ en condition de stress oxydant, le dénominateur commun est le fait que les bactéries passent par un état de latence au cours duquel il n'y a pas de multiplication cellulaire. C'est le cas, lors de l'étalement sur gélose (Cuny et al. 2007) et lors d'un switch entre le milieu anaérobie et aérobie. D'autre part, le second point commun de leurs expériences est le fait que la concentration en H₂O₂ perçue est très faible (car appliquée sur milieu LB agar). Notre étude a permis de mettre en évidence, *in vitro*, que le CO₂ interfère avec la réaction de Fenton conduisant, dans le cas du p-NDA, à une diminution de son oxydation. De plus, nous

avons montré, *in vivo* et de façon directe (changement de la concentration en CO₂ atmosphérique) et indirecte (changement de la concentration en bactéries) que le CO₂ peut supprimer la létalité mode 1 dépendante et diminuer la fréquence de mutation lors d'un stress au H₂O₂. Nos résultats *in vitro* et *in vivo* sont en adéquation avec ceux obtenus *in silico* et par conséquent, sont autant de preuves quant à la formation du CO₃^{•-} *in vivo* et à l'implication du CO₂ dans la dynamique des ROS.

I. La diminution du fer libre est responsable de la sensibilité d'*E. coli* via le mode 1

Lors de ma thèse j'ai validé expérimentalement le modèle d'équations différentielles permettant de simuler la concentration en ROS pendant un stress au H₂O₂. Le modèle a permis de comprendre la dynamique de l'oxydation de l'ADN d'*E. coli* lors d'un stress aux faibles concentrations d'H₂O₂. L'ensemble des résultats *in silico* et *in vitro* suggèrent que la diminution du fer libre est responsable de la diminution de l'oxydation de l'ADN *via* la diminution de la concentration en HO[•]. En effet, seule une baisse de la concentration en HO[•] peut expliquer la diminution de l'oxydation du p-NDA aux fortes concentrations en H₂O₂ puisque le H₂O₂ ou le O₂^{•-} ne réagissent pas avec le p-NDA (Wolfe et al., 2002). L'amélioration de la survie d'*E. coli* après la mortalité des cellules par le mode 1 était expliquée par le « quenching » des HO[•] par le H₂O₂ (Imlay and Linn, 1986). Une analyse mathématique prenant en compte les enzymes qui éliminent le H₂O₂ (Ahp, KatG et KatE) et le taux de réaction du HO[•] avec les composés organiques de la cellule suggère que le « quenching » du HO[•] par le H₂O₂ est négligeable dans le phénomène mode 1 (partie 2.2 du papier). Le « quenching » des HO[•] par le H₂O₂ ralentirait l'oxydation de l'ADN mais ne serait pas responsable du mode 1. L'ensemble des résultats permet de faire l'hypothèse que la limitation en fer libre dans la cellule (probablement due à un manque de recyclage) est responsable du phénomène mode 1. En effet le Fe²⁺ est consommé pendant la réaction de Fenton et le recyclage du Fe³⁺ en Fe²⁺ est nécessaire pour alimenter la réaction de Fenton. Des réducteurs cellulaires comme la glutathione, la L-cystéine, le NAD(P)H et le FADH₂ peuvent potentiellement recycler le Fe³⁺ en Fe²⁺. Cependant, la réaction des réducteurs cellulaires avec le H₂O₂ pourrait diminuer leur concentration ce qui ralentirait le recyclage du fer (Brumaghim et al., 2003). La simulation de l'évolution de la concentration en NADH en fonction de la concentration en H₂O₂ est en accord avec ces observations (Figure 2 du papier). De plus, mes résultats de sensibilité au H₂O₂ montrent que la sensibilité via le mode 1 est inhibée en présence d'un chélateur de fer, confirmant ces observations.

II. L'augmentation de la concentration cellulaire conduit à une disparition du mode 1 chez *E. coli*

Lors des simulations de l'évolution des ROS en fonction de la concentration en H_2O_2 , nous avons constaté que le paramètre « concentration en cellules » avait une influence sur les concentrations en HO^\bullet prédites (Figure 6). En effet, alors que les concentrations en $\text{CO}_3^{\bullet-}$ et HO^\bullet passent par un maximum pour 10^5 cfu/mL respectivement à 10 M et à 1 mM en H_2O_2 , rien de ceci n'est observé pour 10^8 cfu/mL. Ceci suggère l'absence de mode 1 à 10^8 cfu/mL. Mes résultats expérimentaux ont permis de constater une perte de la létalité mode 1 dépendante entre 10^5 cfu/mL et 10^8 cfu/mL pour le mutant $\Delta recA$ et le mutant Hpx. De façon surprenante j'ai montré que la perte du mode 1 est indépendante de la vitesse de consommation du H_2O_2 à la plus forte concentration en bactérie puisque la perte du mode 1 est toujours effective chez un mutant Hpx alors que la souche est dépourvue des systèmes d'élimination du H_2O_2 (les catalases et les alkyl hydroperoxydases) (Figure 3 et 4). Mes résultats sont en adéquation avec les simulations effectuées *via* la modélisation des ROS (Figure papier 7). Comme la variation de la quantité de matière organique entre 10^5 et 10^8 cfu/mL pouvait cependant interagir avec le H_2O_2 , j'ai vérifié que la concentration en H_2O_2 n'était pas affectée par la concentration en bactéries. Mes résultats ont montré que le mutant Hpx perçoit la même concentration en H_2O_2 quelle que soit la concentration en bactéries testée.

III. L'augmentation de la concentration en CO_2 conduit à une diminution de la létalité mode 1 dépendante chez *E. coli*

Puisque la perte du mode 1 à 10^8 cfu/mL n'est pas due à la concentration en H_2O_2 perçue par les cellules, nous avons émis l'hypothèse que la perte du mode 1 serait la conséquence d'une titration du HO^\bullet par un excès de $\text{CO}_{2\text{dissous}}$ produit lors de la respiration des bactéries. En effet, la cinétique d'échange liquide/air est relativement lente par rapport à la vitesse de production du CO_2 par les bactéries et ceci même sous agitation (200 rpm). La conséquence directe de ce phénomène est l'apparition d'une saturation en $\text{CO}_{2\text{dissous}}$. Une façon indirecte de tester l'hypothèse selon laquelle, la perte du mode 1 serait due à cette saturation en $\text{CO}_{2\text{dissous}}$ a été d'augmenter artificiellement les échanges gazeux pendant la croissance bactérienne. J'ai montré que le mode 1 réapparaît dans ces conditions (Figure 6). Les résultats suggèrent que l'augmentation du CO_2 diminue la concentration en HO^\bullet responsable de la réaction de

Fenton. Cette hypothèse est en accord avec la diminution de l'oxydation du p-NDA via le HO[•] à 1000 ppm de CO₂ comparé à 0 ppm. La diminution du HO[•] serait due à sa réaction avec le CO₂ formant du CO₃^{•-} (Figure introduction 3).

Ces résultats sont aussi en accord avec les prédictions *in silico* et *in vitro* concernant l'oxydation du p-NDA *via* la réaction de Fenton. En effet, en prenant en compte l'ensemble des réactions chimiques présentes en solution, les simulations *in silico* aboutissent à une diminution de l'oxydation du p-NDA, lorsque la concentration en CO₂_{dissous} augmente et ceci pour toutes les concentrations en H₂O₂ testées (Figure 9). J'ai obtenu les mêmes résultats *in vitro*. Il semblerait que l'oxydation du p-NDA par le CO₃^{•-} soit plus faible que l'oxydation par le HO[•]. En effet, si la réactivité du p-NDA au HO[•] et au CO₃^{•-} était équivalente, nous aurions observé une augmentation de l'oxydation du p-NDA aux fortes concentrations en CO₂. La diminution de l'oxydation du p-NDA *via* le HO[•] n'est donc pas compensée par l'augmentation de l'oxydation *via* le CO₃^{•-}.

Ainsi, il est possible de prédire que tout substrat (présent à la même concentration que le p-NDA) ayant une constante de réaction au moins 50 fois plus faible pour le CO₃^{•-} que pour le HO[•], serait moins oxydé à 1000 ppm qu'à 0 ppm de CO₂. Stadtman et Berlett (1991) ont observé ce type de phénomène sur les acides aminés proline, arginine, lysine et thréonine, bien que leurs conditions opératoires soient significativement différentes (anaérobie, présence de bicarbonate en forte concentration en remplacement du CO₂...). Inversement, il est possible de prédire qu'un substrat (présent à la même concentration que le p-NDA) sera plus oxydé à 1000 ppm qu'à 0 ppm si sa constante de réaction avec du CO₃^{•-} est 50 fois plus forte que celle avec du HO[•]. C'est par exemple le cas de la méthionine qui d'après les constantes de réactions serait plus oxydée à 1000 ppm qu'à 0 ppm en CO₂ (Davies, 2006). Enfin, à la différence du p-NDA dont l'oxydation diminue avec la concentration en CO₂, il est connu que l'oxydation des groupements thiols par le H₂O₂ est stimulée par l'augmentation de la concentration en CO₂ (Celeste et al. 2007). En effet, le HCO₄⁻ généré par réaction entre le H₂O₂ et le CO₂_{dissous}, a une réactivité environ 100 fois plus élevée que le H₂O₂ sur les groupements thiols (Celeste et al. 2007). Il apparaît donc clairement que le CO₂ module positivement ou négativement l'oxydation des macromolécules.

Tous les résultats vont dans le sens d'une part d'une diminution de la concentration en HO[•] et d'autre part d'une augmentation de la concentration en CO₃^{•-} entre 40 et 1000 ppm en CO₂. La sensibilité due au mode 1 étant liée aux dommages à l'ADN causés par le HO[•], nous avons voulu savoir quel était l'impact de la concentration en CO₂ sur la létalité d'*E. coli* par le mode 1 à 40 et 1000 ppm et si le CO₃^{•-} *in vivo* pouvait avoir un impact sur les dommages à l'ADN.

En effet, lors des expériences *in vitro*, nous avons montré que même si la concentration en $\text{CO}_3^{\cdot-}$ était prédite comme 50 fois plus élevée que celle du HO^{\cdot} , l'oxydation du p-NDA était diminuée car la vitesse d'oxydation du p-NDA par le $\text{CO}_3^{\cdot-}$ est plus faible que celle du HO^{\cdot} . N'ayant que peu d'éléments quant à la vitesse d'oxydation de l'ADN par le $\text{CO}_3^{\cdot-}$, nous ne pouvions prévoir l'évolution de la létalité d'*E. coli* via le mode 1. Ainsi, l'expérience *in vivo* a permis de montrer que malgré l'augmentation de la concentration en CO_2 (et donc en $\text{CO}_3^{\cdot-}$), la létalité par le mode 1 était diminuée à 1000 ppm par rapport à 40 ppm en CO_2 (Figure 8). Comme pour les simulations et expériences menées *in vitro*, les conséquences de la baisse de la concentration en HO^{\cdot} ne sont pas compensées par l'augmentation en $\text{CO}_3^{\cdot-}$. La diminution de la létalité via le mode 1 en présence de 1000 ppm de CO_2 est en accord avec la diminution de la fréquence de mutation en présence de 5 % de CO_2 par rapport à 50 ppm (Figure 10). De façon surprenante, quand j'ai réalisé les expériences de fréquence de mutation à la rifampicine, j'ai obtenu à chaque fois deux maximums d'augmentation de la fréquence d'un facteur 20 à 100 (donnés non présentées). Cependant selon l'expérience, les maximums étaient décalés en fonction de la concentration en H_2O_2 ne permettant pas de faire une représentation sous forme de moyennes et écart-types. Aucune explication simple permet d'interpréter ce profil de fréquence de mutation. Quoi qu'il en soit pour chaque expérience, la fréquence de mutation est plus faible à 5 % de CO_2 par rapport à 50 ppm. Mes résultats vont dans le sens que le $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formé par réaction entre le CO_2 et le HO^{\cdot} a une moins bonne réactivité pour l'ADN que le HO^{\cdot} . En diminuant la concentration en HO^{\cdot} dans la cellule, le CO_2 permettrait donc de protéger l'ADN et augmenterait la survie d'*E. coli* lors du mode 1 de stress au H_2O_2 .

Hydrogen peroxide induced cell death: One or two modes of action?

Lionel Uhl, Audrey Gerstel, Maialène Chabalier and Sam Dukan

Institut de Microbiologie de la Méditerranée – Université Aix-Marseille, Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS UMR7283, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France.

**Corresponding author: sdukan@imm.cnrs.fr, Aix-Marseille Université, Laboratoire de Chimie Bactérienne (UMR7283), Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille (France). Fax: +33 4 91 71 89 14; Tel: +33 4 91 16 46 01.*

Abstract

Imlay and Linn show that exposure of logarithmically growing *Escherichia-coli* to hydrogen peroxide (H_2O_2) leads to two kinetically distinguishable modes of cell killing. Mode one killing is pronounced near 1 mM concentration of H_2O_2 and is caused by DNA damage, whereas mode-two killing requires higher concentration (> 10 mM). The second mode seems to be essentially due to damage to all macromolecules. This phenomenon has also been observed in Fenton *in vitro* systems with DNA nicking caused by hydroxyl radical (HO^\bullet).

To our knowledge, there is currently no mathematical model for predicting mode one killing *in vitro* or *in vivo* after H_2O_2 exposure.

We propose a simple model, using *Escherichia coli* as a model organism and a set of ordinary differential equations. Using this model, we show that available iron and cell density, two factors potentially involved in ROS dynamics, play a major role in the prediction of the experimental results obtained by our team and in previous studies. Indeed the presence of the mode one killing is strongly related to those two parameters.

To our knowledge, mode-one death has not previously been explained. Imlay and Linn (Imlay and Linn 1986) suggested that perhaps the amount of the toxic species was reduced at high concentrations of H_2O_2 because hydroxyl (or other) radicals might be quenched directly by hydrogen peroxide with the concomitant formation of superoxide anion (a less toxic species). We demonstrate (mathematically and numerically) that free available iron decrease is necessary to explain mode one killing which cannot appear without it and that H_2O_2 quenching or consumption is not responsible for mode-one death.

We are able to follow ROS concentration (particularly responsible for mode one killing) after exposure to H_2O_2 . This model therefore allows us to understand two major parameters involved in the presence or not of the first killing mode.

1 Introduction

The principal reactive oxygen species (ROS) — superoxide $O_2^{\bullet-}$, hydrogen peroxide H_2O_2 , and the hydroxyl radical HO^\bullet — are generated by sequential reductions of molecular oxygen and are continually produced in cells. Oxidative stress results from an imbalance between exposure to ROS and defenses against ROS, potentially causing damage to all

macromolecules (Imlay, 2013). There is increasing evidence to suggest that the cumulative damage caused by ROS contributes to many diseases, including age-related disorders, such as Parkinson’s disease and Alzheimer’s disease, and cancer (Jimenez-Del-Rio and Velez-Pardo, 2012).

The ability of bacteria to cope with these ROS species has been studied in detail (Fridovich, 1978; Keyer and Imlay, 1996; Park et al., 2005; Kowald et al., 2006; Gonzalez-Flecha and Demple, 1995; Seaver and Imlay, 2004; Hillar et al., 2000; Aslund et al. 1999). Briefly, in *Escherichia coli*, cytoplasmic superoxide dismutases (Mn-SOD and Fe-SOD) constitute the principal system responsible for keeping $O_2^{\bullet-}$ concentration below 2×10^{-10} M (Imlay and Fridovich, 1991). Alkyl hydroperoxide reductase (Ahp) and catalases (KatG and KatE) keep H_2O_2 concentration below 20 nM (Seaver and Imlay, 2001). These concentrations of these two ROS species need to be kept very low as they are linked to the formation of HO^\bullet via the Fenton reaction ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^\bullet + HO^- + Fe^{3+}$), against which cells have no known defense (Imlay et al. 1988). Indeed, $O_2^{\bullet-}$ rapidly destroys the [4Fe-4S] clusters of dehydratases, leading to the release of reactive iron (Fe^{2+}), which may then react with H_2O_2 to generate HO^\bullet (Fenton reaction).

Imlay and Linn (Imlay and Linn 1986; Imlay et al. 1988) show that exposure of logarithmically growing *E. coli* to H_2O_2 involves two kinetically modes of cell killing. Mode one killing pronounced near 1 mM concentration of H_2O_2 is caused by DNA damage, whereas mode-two killing appears with higher concentration (> 10 mM) and seems to be essentially due to damage to all macromolecules.

In this study, we aimed to use *E. coli* as a model organism, to investigate *ROS* dynamics and to understand the presence or not of the first killing mode. We used data from a large number of articles dealing with enzyme or molecule concentrations, kinetic properties and chemical reaction rate constants to generate a mathematical model based on a set of ordinary differential equations relating to fundamental principles of mass balance and reaction kinetics. To our knowledge, no such mathematical model allowing the prediction of ROS concentration and explanation of mode one killing, after H_2O_2 exposure, has ever been developed before.

2 Materials and methods

All numerical simulations were carried out using the MATLAB ODE solver ode15s for stiff differential equations. The multistep solver ode15s is a variable order solver based on the numerical differentiation formulas.

3 Results and discussion

3.1 The key role of free iron, its decrease during oxidative stress

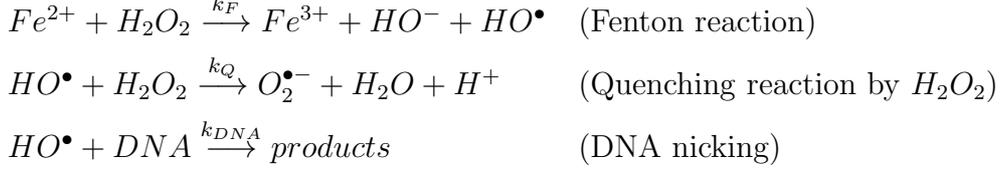
The first aim of this study was to determine whether *in vivo* Fe^{2+} should be taken into account as variable when trying to predict the mode one killing. Our interest in Fe^{2+} stems from its involvement in the Fenton reaction, which leads to the formation of HO^\bullet . It is therefore important to determine whether Fe^{2+} concentration can be assumed to be constant, as a first approximation, or whether it must be treated as variable, when estimating HO^\bullet concentration. Indeed, literature shows studies considering free iron as a constant (Antunes et al., 1996) and other presenting iron evolution (Bertrand 2014).

Our study will not mention copper. Indeed although either copper or iron can reduce H_2O_2 *in vitro*, iron is the responsible species *in vivo*. Indeed, the amount of available copper may be too small. Imlay indicates that mutants that lose the ability to control copper levels exhibit normal resistance to H_2O_2 (Macomber et al. 2007). Thus, copper is liganded by the large pool of intracellular thiols (including glutathione which is in millimolar concentration) that blocks the participation of copper in HO^\bullet formation *in vitro*. Moreover, H_2O_2 -oxidizable copper is located in the periplasm; therefore, most of the copper-mediated hydroxyl radical formation occurs in a compartment far away from DNA.

3.1.1 A simple in vitro system

The simplest *in vitro* system was proposed by Luo *et al.* (1994) only considering 80 nM of Fe^{2+} and 17 μ M DNA. They show that DNA nicking is maximal at 0.05 mM H_2O_2 concentration after a 7.5 minutes experiment.

The chemical reactions which describe this system are :



The resulting dynamical system of ordinary differential equation is :

$$\begin{aligned}
\frac{d[HO^\bullet]}{dt} &= k_F [Fe^{2+}] [H_2O_2] - k_Q [HO^\bullet] [H_2O_2] - k_{DNA} [DNA] [HO^\bullet] \\
\frac{d[Fe^{2+}]}{dt} &= -k_F [Fe^{2+}] [H_2O_2] \\
\frac{d[H_2O_2]}{dt} &= -k_F [Fe^{2+}] [H_2O_2] - k_Q [HO^\bullet] [H_2O_2] \\
\frac{d[DNA]}{dt} &= -k_{DNA} [DNA] [HO^\bullet]
\end{aligned}$$

Taking the reaction rate constants found in literature, $k_F = 4.4 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ (Park et al., 2005), $k_Q = 2.7 \times 10^7 \text{ M s}^{-1}$ (Buxton et Greenstock, 1988) and $k_{DNA} = 4.7 \times 10^9 \text{ M s}^{-1}$ (Michaels and Hunt, 1973), the simulation shows exactly the same maximum (figure 1) when reporting average DNA nicking (during time experiment) versus H_2O_2 concentration.

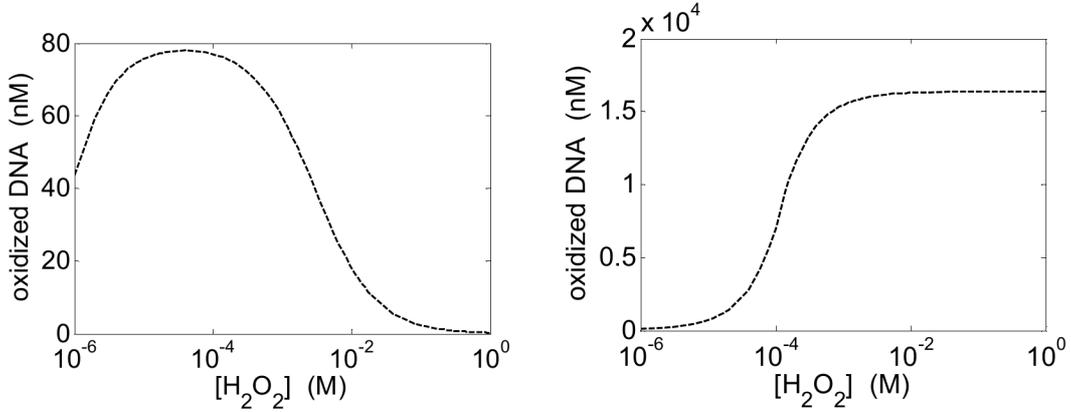


Figure 1: Simulation for H_2O_2 -mediated mode 1 killing (left panel) in a Fenton system obtained with 80 nM of Fe^{2+} and 17 μM DNA. Mode one killing disappear (right panel) when free iron is artificially taken constant (the dynamical system has been modified by taken $d[Fe^{2+}]/dt = 0$).

In this system, it is obvious that free iron decreases because there is no way of recycling; nevertheless we present a hypothetic simulation considering free iron as a constant. This hypothetic simulation realized with $d[Fe^{2+}]/dt = 0$ makes clear the need to take into

account free iron as a variable even in a simple system in order to see mode one killing; and it also shows that iron decrease is responsible of the first killing mode. Imlay first discussion (Imlay et al. 1986) concerning the quenching of HO^\bullet with H_2O_2 in order to interpret mode one killing have to be forgotten. The quenching only slows down the DNA oxidation (caused by HO^\bullet) but it cannot be responsible for the mode one killing.

3.2 Mathematical analysis of the in vivo Fenton system

DNA nicking involves a reaction between DNA and HO^\bullet , therefore, in order to see mode one killing, HO^\bullet concentration must reach a maximum as a function of exogenous H_2O_2 concentration. Considering *in vivo* Fenton system we have to take into account H_2O_2 scavenging enzyme (Alkyl hydroperoxide reductase and catalases). Let us examine whether this system is consistent with a maximum level of HO^\bullet concentration when challenging H_2O_2 . Our model does not take into account molecules compartmentalization (see justification in Supplementary Material B).

HO^\bullet depends on time t and $[H_2O_2]_{out}$ (exogenous H_2O_2 concentration). If HO^\bullet reaches a maximum value, that implies that a mathematical derivative of HO^\bullet versus $[H_2O_2]_{out}$ reached zero. Before evaluating $\frac{d[HO^\bullet]}{d[H_2O_2]_{out}}$, we need to know how HO^\bullet levels change.

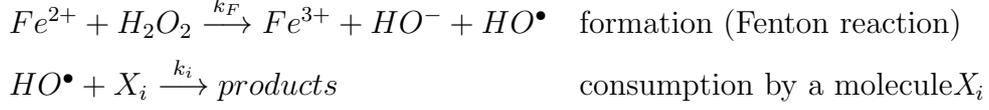
The most important cellular sinks for hydroxyl radical are reactions with major cellular components like proteins, metabolomes,... The quenching reaction (with H_2O_2) may be relevant under *in vitro* conditions when H_2O_2 concentration is very high (and DNA concentration very low), but under a physiological setting or even when cells are exposed to external H_2O_2 , H_2O_2 will not be a major sink for hydroxyl radical. Indeed, reaction rate constant of HO^\bullet between organic cellular compounds (like proteins, metabolomes,...) are closed to diffusion limit rate constant $k_{diff} \approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and organic cellular compounds concentration [*Organic*] is higher than 10 mM, therefore under the mode one killing where H_2O_2 concentration is under 4 mM, we can write the inequality :

$$\frac{v_{organic\ sinks}}{v_{quenching}} = \frac{k_{diff} [Organic] [HO^\bullet]}{k_Q [H_2O_2] [HO^\bullet]} = \frac{k_{diff} [Organic]}{k_Q [H_2O_2]} \approx 10^3 \gg 1$$

This inequality means that the quenching reaction can be neglected in the study of mode one killing.

Moreover, concerning HO^\bullet production, we do not consider Haber-Weiss reaction, a reaction whose relevance *in vivo* is questionable (Koppenol, 2001; Liochev and Fridovich,

2002). In fact, when adding this reaction, we saw no significant change in ROS or DNA kinetic. Therefore, within cells, for a given exogenous H_2O_2 concentration, HO^\bullet levels obey the following reactions:



In vivo, because HO^\bullet reacts with various molecules we generalise the system and demonstrate that we need to consider available iron as a variable.

Proof by contradiction (*reductio ad absurdum*): Suppose that free iron is constant.

Considering N reactions (of rate constant k_i between an organic X_i compound and HO^\bullet) and assuming X_i concentration is constant because X_i is in large excess (for example DNA, proteins, metabolomes,...). Therefore HO^\bullet levels obey the following kinetic differential equation:

$$\frac{d[HO^\bullet]}{dt} = k_F [Fe^{2+}] [H_2O_2] - \sum_{i=1}^N k_i [HO^\bullet] [X_i]$$

The resolution of this equation gives:

$$[HO^\bullet] = \left(\int_0^t k_F [Fe^{2+}] [H_2O_2] \exp \left(\sum_{i=1}^N k_i [X_i] t' \right) dt' \right) \exp \left(- \sum_{i=1}^N k_i [X_i] t \right) \quad (*)$$

Internal H_2O_2 concentration is also dependent on t and $[H_2O_2]_{out}$, as follows:

$$[H_2O_2] = f(t, [H_2O_2]_{out})$$

In addition, the more exogenous H_2O_2 added, the more H_2O_2 penetrates the cell, so f is a monotonic increasing function of $[H_2O_2]_{out}$ and $\frac{\partial f([H_2O_2]_{out}, t)}{\partial [H_2O_2]_{out}} > 0$. The mathematical derivative of HO^\bullet versus $[H_2O_2]_{out}$ gives:

$$\frac{d[HO^\bullet]}{d[H_2O_2]_{out}} = \left(\int_0^t k_F [Fe^{2+}] \frac{\partial f([H_2O_2]_{out}, t')}{\partial [H_2O_2]_{out}} \exp \left(\sum_{i=1}^N k_i [X_i] t' \right) dt' \right) \exp \left(- \sum_{i=1}^N k_i [X_i] t \right)$$

This expression obviously indicates that $\frac{d[HO^\bullet]}{d[H_2O_2]_{out}} > 0$ because all terms are positive.

For this reason, in this model, there should be no peak when changes in HO^\bullet levels are plotted against exogenous H_2O_2 levels. This conclusion is in contradiction with mode one killing observation, therefore we must consider Fe^{2+} concentration to decrease with increasing H_2O_2 concentration.

We can notice that a direct proof, without supposing free iron constant, gives by derivation of (*) :

$$\frac{d[HO^\bullet]}{d[H_2O_2]_{out}} = \left(\int_0^t k_F F_{(Fe^{2+}, H_2O_2)} \exp \left(\sum_{i=1}^N k_i [X_i] t' \right) dt' \right) \times \exp \left(- \sum_{i=1}^N k_i [X_i] t \right)$$

where $F_{(Fe^{2+}, [H_2O_2])} = \left[[Fe^{2+}] \frac{\partial f([H_2O_2]_{out}, t')}{\partial [H_2O_2]_{out}} + [H_2O_2] \frac{\partial [Fe^{2+}]}{\partial [H_2O_2]_{out}} \right]$

This expression can reach zero only if:

$$\underbrace{[Fe^{2+}]}_{>0} \underbrace{\frac{\partial f([H_2O_2]_{out}, t')}{\partial [H_2O_2]_{out}}}_{>0} + \underbrace{[H_2O_2]}_{>0} \frac{\partial [Fe^{2+}]}{\partial [H_2O_2]_{out}} = 0$$

It demonstrates that necessarily $\frac{\partial [Fe^{2+}]}{\partial [H_2O_2]_{out}} < 0$, meaning that $[Fe^{2+}]$ is a monotonic decreasing function of $[H_2O_2]_{out}$.

So, to explain the experimental curve for DNA nicking *in vitro*, we must consider Fe^{2+} concentration to decrease with increasing H_2O_2 concentration.

3.2.1 Mathematical model

The first difference between *in vivo* and *in vitro* experiments is the value of H_2O_2 exogenous concentration needed to reach maximum in the mode one killing (Imlay et al., 1988). This difference is for a number of reasons. First cell membrane and cell scavenger (Ahp and catalase) reduce H_2O_2 concentration within the cell; therefore mode one killing appears with higher concentration of H_2O_2 concentration *in vivo*. Then there are many sinks for hydroxyl radical and free iron evolution has to take its recycling into account. The model has to be completed with the following equations, of course we only present the major reaction involved in the description of the mode one killing; for instance we do not add reaction between organic compounds and H_2O_2 which is negligible when compared to enzymatic dismutation. This model is deliberately simple in order to examine the predominant effects.

Internal hydrogen peroxide kinetics

$$\begin{aligned}
\frac{d[H_2O_2]}{dt} = & k_{prod}^{H_2O_2} && : \text{Endogenous production} \\
& - \frac{k_{cat}^{Ahp} [Ahp] [H_2O_2]}{[H_2O_2] + K_M^{Ahp}} && : \text{Dismutation by Ahp } H_2O_2 \xrightarrow{Ahp} H_2O + 1/2O_2 \\
& - \frac{k_{cat}^{Kat} [Kat] [H_2O_2]}{[H_2O_2] + K_M^{Kat}} && : \text{Dismutation by Kat } H_2O_2 \xrightarrow{Kat} H_2O + 1/2O_2 \\
& - k_{diff} ([H_2O_2] - [H_2O_2]_{ex}) && : \text{Diffusion across cell membrane} \\
& - k_F [H_2O_2] [Fe^{2+}] && : \text{Fenton reaction}
\end{aligned}$$

External hydrogen peroxide concentration ($[H_2O_2]_{out}$) strongly depends on cell number (noted n), indeed, the higher cell density, the faster the media is detoxified. The cell density involvement will be discussed in section 3.

External hydrogen peroxide kinetics

$$\frac{d[H_2O_2]_{out}}{dt} = k_{diff} \frac{n \cdot V_{internal}}{V_{external}} ([H_2O_2] - [H_2O_2]_{out})$$

$V_{internal}$ represents intracellular solvent-accessible volume.

Cell numbers n double every 20 minutes according to an exponential law.

Hydroxyl radical kinetics

We consider N reactions of rate constant k_i between an organic X_i compound (proteins, metabolites,...) and HO^\bullet . Nevertheless, DNA was treated separately (out of the sum) in order to examine its damage during oxidative stress, so it comes to the following equations:

$$\frac{d[HO^\bullet]}{dt} = k_F [Fe^{2+}] [H_2O_2] - \sum_{i=1}^N k_i [X_i] [HO^\bullet] - k_{DNA} [DNA] [HO^\bullet]$$

$$\frac{d[DNA]}{dt} = -k_{DNA} [DNA] [HO^\bullet]$$

Recycling of free iron

Free available Fe^{2+} is oxidized during Fenton reaction but Fe^{3+} is then reduced by cellular reductants. However, the identity of the biological reductants *in vivo* remains unclear (Valko et al., 2005), Fe^{3+} might also be reduced at varying reaction rates by a range of cellular reductants, such as glutathione, L-cysteine, NAD(P)H and FADH₂ (Imlay, 2003). The kinetic of iron recycling has to take into account the fact that reductant concentrations also decrease with increasing value of exogenous concentration of H_2O_2 because of reductant reactions with various ROS. For instance Brumaghim *et al.* report that *in vivo* NADH concentration reduce by half when challenging about 0.2 mM of H_2O_2 (Fig. 2). Therefore we corrected recycling rate with a Hill factor (noted f) of coefficient 1 (because decrease is hyperbolic) often used to describe reaction of inhibition (Polynikis et al., 2009). We consider here that H_2O_2 inhibits the efficiency of the reductants to recycle Fe^{3+} into Fe^{2+} .

For instance, reduction by NADH gives the kinetic rate:

$$v_{red}^{NADH} = k_{NADH} [Fe^{3+}] [NADH]$$

where $[NADH] = f_{NADH}[NADH]_0$ and $f_{NADH} = \frac{C_{1/2}^{NADH}}{[H_2O_2] + C_{1/2}^{NADH}}$ where $C_{1/2}^{NADH}$ is the H_2O_2 concentration needed to reduce by half the initial concentration of NADH.

$[NADH]_0$ represents NADH concentration without oxidative stress.

Hill correction factor fits Brumaghim experimental results by taking $C_{1/2}^{NADH} = 0.2$ mM (this value was found using a least square approximation).

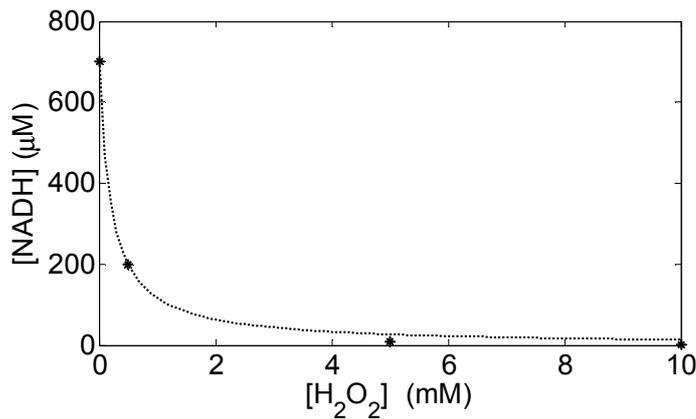


Figure 2: *in vivo* NADH levels after H_2O_2 challenge of *E. coli* (* marker for Brumaghim measurements and dots for our mathematical model).

We can then write Fe^{3+} reduction kinetic rate by NADH :

$$v_{red}^{NADH} = k_{NADH} [Fe^{3+}] [NADH]_0 \frac{C_{1/2}^{NADH}}{[H_2O_2] + C_{1/2}^{NADH}}$$

or

$$v_{red}^{NADH} = k_{NADH} [NADH]_0 [Fe] \frac{[Fe] - [Fe^{2+}]}{[Fe]} \frac{C_{1/2}^{NADH}}{[H_2O_2] + C_{1/2}^{NADH}}$$

because $[Fe^{3+}] = [Fe] - [Fe^{2+}]$ where $[Fe]$ represents the total free available iron concentration in cell.

We can also write

$$v_{red}^{NADH} = v_{max}^{NADH} \frac{[Fe] - [Fe^{2+}]}{[Fe]} \frac{C_{1/2}^{NADH}}{[H_2O_2] + C_{1/2}^{NADH}}$$

where $v_{max}^{NADH} = k_{NADH} [NADH]_0 [Fe]$

According to Brumaghim *et al.* (2003) NADH oxidation experiment, 16 μM of *in vitro* initial NADH concentration are oxidized by 80 μM of Fe^{3+} with an initial rate constant (obtained by measurement of NADH absorbance at 340 nm) $k_{NADH} [Fe^{3+}] = 2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, so with physiological concentration, the maximal rate constant for Fe^{3+} reduction will be near $k_{NADH} [NADH]_0 [Fe] = 10^{-7} \text{ M s}^{-1}$.

Brumaghim *et al.* produce the same study with NADPH, and according to their experimental results we have $k_{NADPH} [NADPH]_0 [Fe] = 4 \times 10^{-9} \text{ M s}^{-1}$ and $C_{1/2}^{NADPH} = 4 \text{ mM}$.

Moreover, cell counts many reductants like ascorbate which may represent an alternative way to generate Fe^{2+} (Hsieh and Hsieh, 2000). Thiols and in particular glutathione GSH in physiological systems, are important agents responsible for helping to maintain aerobic cells in a reducing state, despite an oxidizing environment. Nevertheless, a growing body of evidence suggests that thiols, as electron donors of metal-catalyzed oxidation systems, can paradoxically be responsible for the generation of reactive oxygen species (Giannessi *et al.*, 1993). For instance, Netto and Stadtman (1996) report that Dithiothreitol reduces Fe^{3+} with a constant rate near $2.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, therefore $v_{max}^{RSH} = k_{RSH} [Fe] [RSH]_0 \geq 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$.

We can notice that the upper limit for $v_{max}^{Red} = k_{Red} [Fe] [Red]_0$ is near 10^3 M s^{-1} (using the rate constant of diffusion limited reaction which is near $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, and assuming $[Red] \leq 10^{-2} \text{ M}$ and $[Fe] \approx 20 \mu\text{M}$). Of course the real (but unknown) value should be much weaker.

By adding N reductants (noted R_i), reduction rate can be written :

$$v_{red} = \sum_{i=1}^N \left(v_{\max,i} \frac{[Fe] - [Fe^{2+}]}{[Fe]} \frac{C_{1/2}^i}{[H_2O_2] + C_{1/2}^i} \right)$$

Of course, we cannot find the values of all kinetic constants in literature for *in vivo* system whereas it is a crucial issue; we therefore use an average formula with only two constants:

$$v_{red} = v_{\max} \frac{C_0}{[H_2O_2] + C_0} \frac{[Fe] - [Fe^{2+}]}{[Fe]}$$

When $[H_2O_2] \rightarrow C_0$, the efficiency of the reduction is reduced by half, v_{\max} represents the maximal rate of Fe^{3+} reduction, this rate is obtained in a hypothetical scheme when $[H_2O_2] \rightarrow 0$ (meaning that reductants are the most efficient at low H_2O_2 concentration) and when $[Fe^{2+}] \rightarrow 0$ (meaning that Fe^{3+} concentration is maximal).

We then have to examine the involvement of these two constants (v_{\max} and C_0) on mode one killing. Finally free iron kinetic is approached to:

$$\frac{d[Fe^{2+}]}{dt} = -k_F [Fe^{2+}] [H_2O_2] + v_{\max} \frac{C_0}{[H_2O_2] + C_0} \frac{[Fe] - [Fe^{2+}]}{[Fe]}$$

The figure 3 represents the principal interactions between the reagents used in the mathematical model.

Scheme of the model

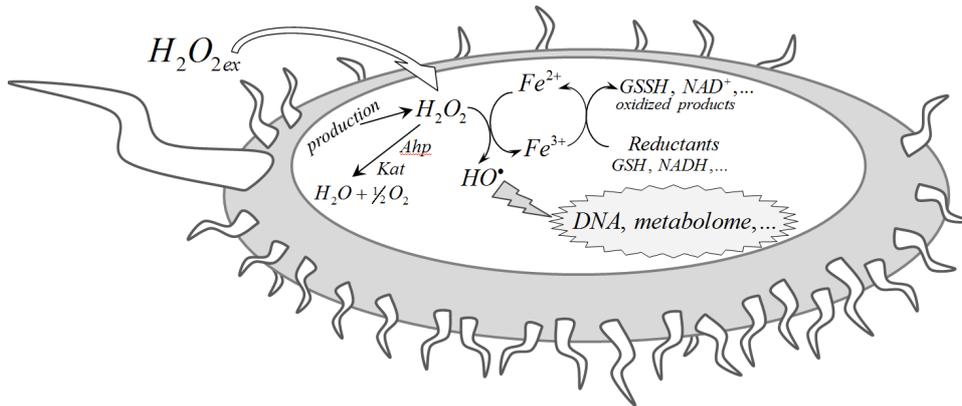


Figure 3: Scheme of ROS interaction in the mathematical model.

3.2.2 Choice of kinetic constants

According to Park et al. (2005) experiments, at 37°C and neutral pH, the Fenton rate constant for DNA-bound iron was $k_F = 4400 \text{ M s}^{-1}$ but this constant is higher when iron

is bound to ATP. As mode one killing concerns DNA damage, we use $k_F = 4400 \text{ M s}^{-1}$ for our simulation. Indeed HO^\bullet reacts very fast and therefore only impacts the nearest organic compounds.

DNA concentration refers to nitrogenous bases concentration, this concentration is set to $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, corresponding to approximately 4.6×10^6 pairs (with the proportion of each base set at 25 %, which is close to the value proposed by the CBS genome atlas database of Hallin and Ussery (2004)).

We then consider N reactions of rate constant k_i between an organic X_i compound (or site) and HO^\bullet ($\sum_{i=1}^N k_i [X_i] [HO^\bullet]$). For instance Bennett et al. (2009) report total metabolome concentration of 300 mM (100 millions metabolites/cell) greatly exceeded the reported total protein concentration of 7 mM (2.4 million proteins/cell). Nevertheless, with an average of 400 residues per protein, it represents 2,8 M of feeding sites for HO^\bullet .

We assume that $\sum_{i=1}^N k_i [X_i] \approx 7.3 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ (Supplementary Material A), which corresponds to a mean rate constant of $2 \times 10^9 \text{ M s}^{-1}$ for reaction between HO^\bullet and organic compounds.

3.2.3 Position and width of mode one killing

Position of mode one killing corresponds to the concentration of H_2O_2 where the maximum of DNA damage occurs. Position and width of mode one killing of course depend on reaction rate constants and in particular on the recycling rate of free iron characterized by v_{\max} and C_0 . Mode one killing can also be described by its intensity (DNA oxidized proportion) but it is impossible to directly link bacterial survival curve to intensity of DNA oxidized proportion whereas survival bacterial curve should occur at the same position and should present approximately the same shape. Therefore we focus on the position and the width of mode one killing. We previously show the particular importance of iron evolution; therefore we will next focus on the two parameters v_{\max} and C_0 introduced to describe its kinetic.

The influence of v_{\max}

For next simulations we set $C_0 = 1 \text{ mM}$ (the influence of this constant will be discussed later) and we observe the influence of the parameter v_{\max} . According to the previous

discussion $v_{\max} > 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$.

Figure 4 shows that an increasing value of v_{\max} involves a higher position of mode-one killing but also a higher intensity of DNA oxidation. Indeed v_{\max} is linked to the cell potential to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} and therefore to drive Fenton reaction more efficiently.

The simulations are consistent with the mode-one killing experimental position near 1-3 mM.

When Fe^{2+} recycling rate is too high (inset fig. 4) mode-one killing disappear because Fe^{2+} concentration remains constant.

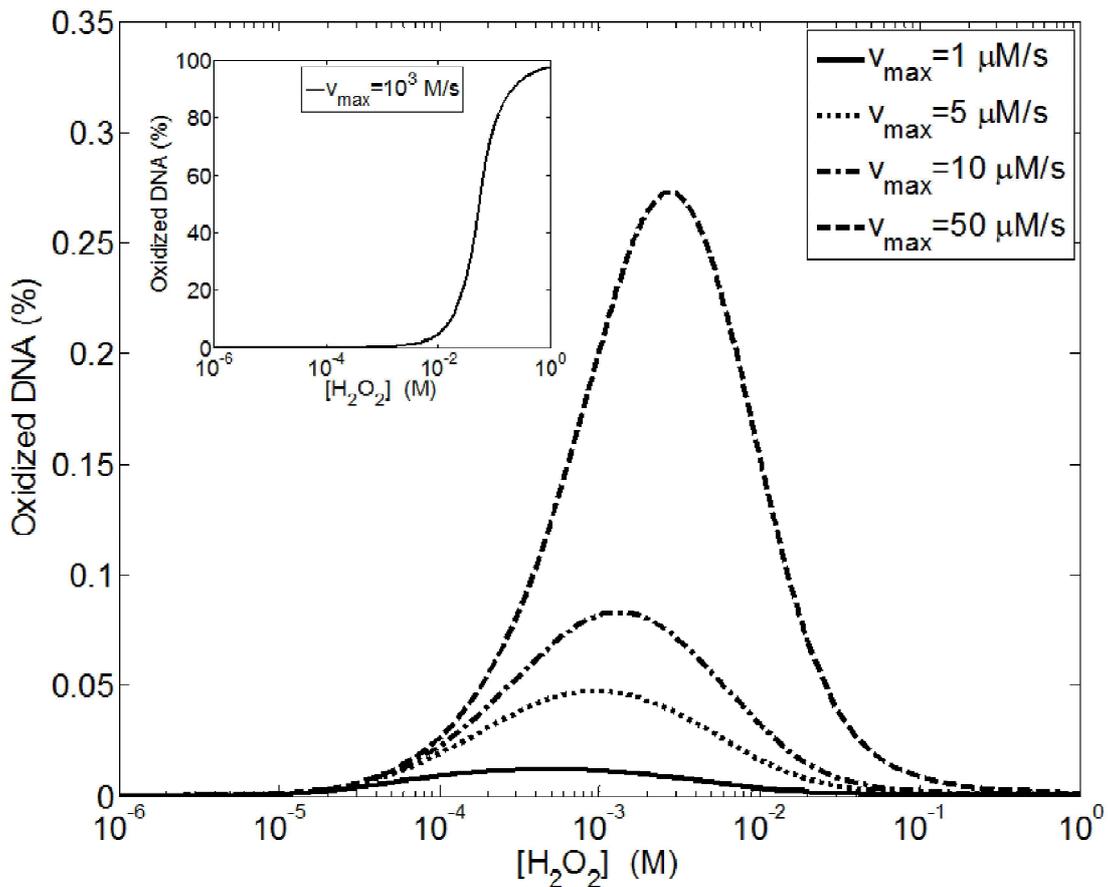


Figure 4: Average DNA oxidation (during 15 minutes) dependence upon H_2O_2 external concentration and maximal Fe^{2+} recycling rate v_{\max} . C_0 is set to 1 mM. Initially, cell density was set to 10^7 cell/mL. The kinetic parameters used for the simulation are gathered in table 1.

Moreover, Imlay et al., (Imlay et al. 1988) showed that if the availability of cellular reducing equivalents is increased as the result of respiration inhibition (through cyanide and NADH dehydrogenase mutations), mode I killing was enhanced. Our model is able

to reproduce this phenomenology, as demonstrated by the direct correlation between the v_{\max} parameter and the percentage of oxidized DNA (Figure 4).

The influence of C_0

As C_0 is increasing, mode-one killing is shifting into high position and high intensity according to figure 5. In order to fit with Imlay's experimental results C_0 has to stay in a range between 0.1 and 1 mM.

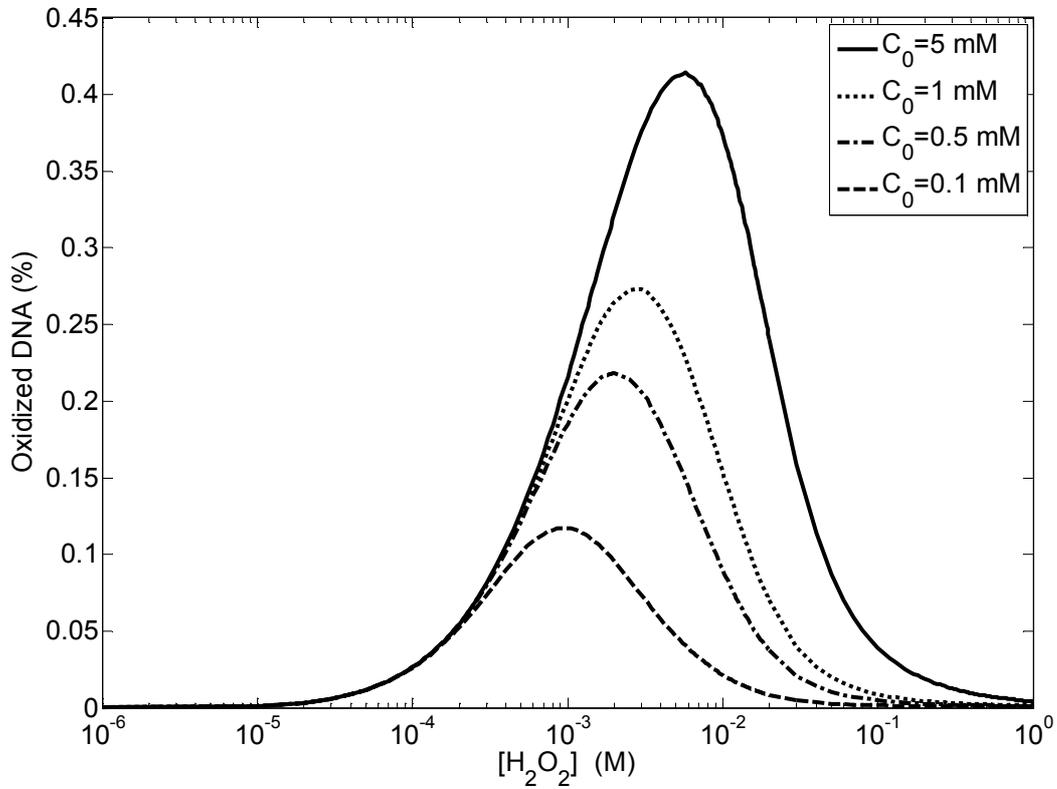


Figure 5: Average DNA oxidation (during 15 minutes) dependence upon H_2O_2 external concentration and parameter C_0 . v_{\max} is set to $50 \mu\text{M s}^{-1}$. Initially, cell density was set to 10^7 cell/mL. The kinetic parameters used for the simulation are gathered in table 1.

The influence of free available iron [Fe]

Iron chelators such as dipyrindyl that can penetrate bacteria prevent external H_2O_2 from damaging DNA by reducing free available iron thanks to chelation (Imlay et al.,

1988). Over-expression of ferritin, a storage protein that specifically sequesters iron also prevents damage (Keyer et al., 1995). But *E. coli* mutants that over-import iron are more sensitive to DNA damage when challenging external H_2O_2 (Touati et al., 1995). Figure 6 reports the same conclusion with increasing damage when free available iron concentration increases.

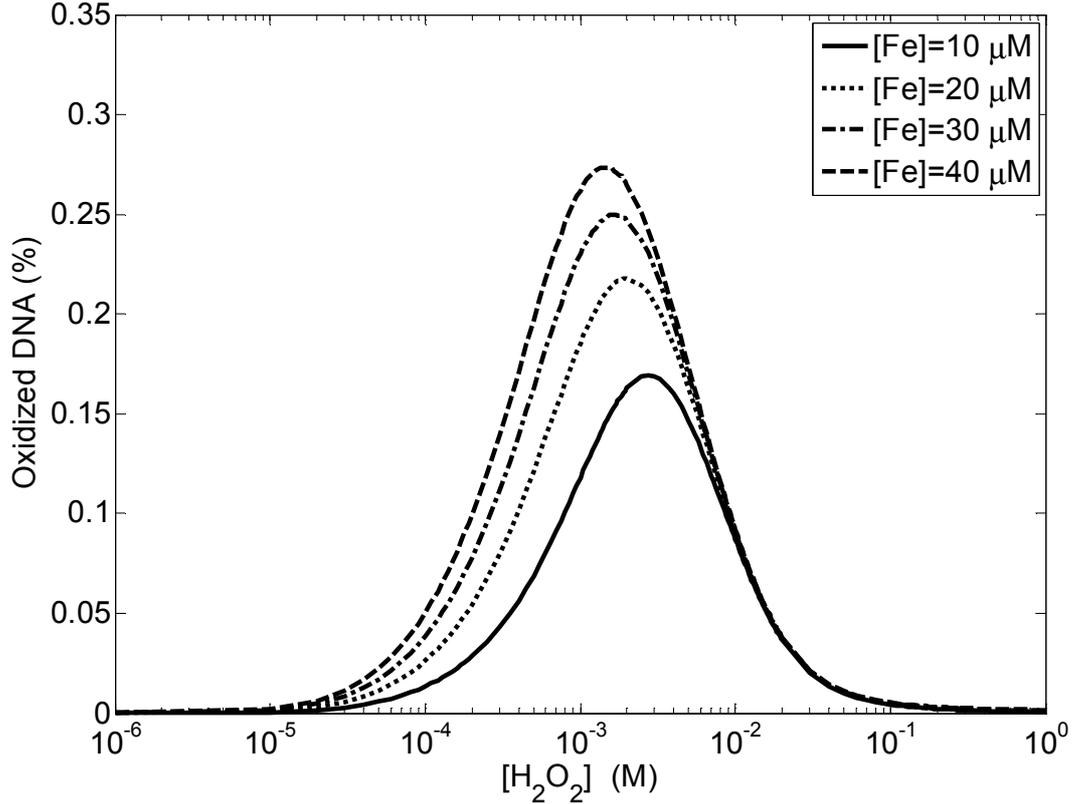


Figure 6: DNA oxidation (average during 15 minutes) dependence upon H_2O_2 external concentration and free available iron concentration. Parameter C_0 is set to 0.5 mM and v_{\max} is set to $50 \mu\text{M s}^{-1}$. Initially cell density was set to 10^7 cell/mL. The kinetic parameters used for the simulation are gathered in table 1.

3.3 Cell density involvement.

Under conditions of exogenous H_2O_2 stress, H_2O_2 elimination is dependent on cell density. However, nothing is currently known about internal H_2O_2 concentration during H_2O_2 exposure. Under these conditions, internal H_2O_2 concentration results mostly from influx due to diffusion across the cell membrane, because endogenous production is negligible.

Moreover, the more cell density increases, the faster the medium is detoxified. This phenomenon involves a decrease in exogenous H_2O_2 concentration and consequently in internal H_2O_2 concentration. Figure 7 reports *in vivo* experimental detoxification of the medium with two different concentrations (A) and it also shows the corresponding *in silico* simulation which correctly fits the experiment (B).

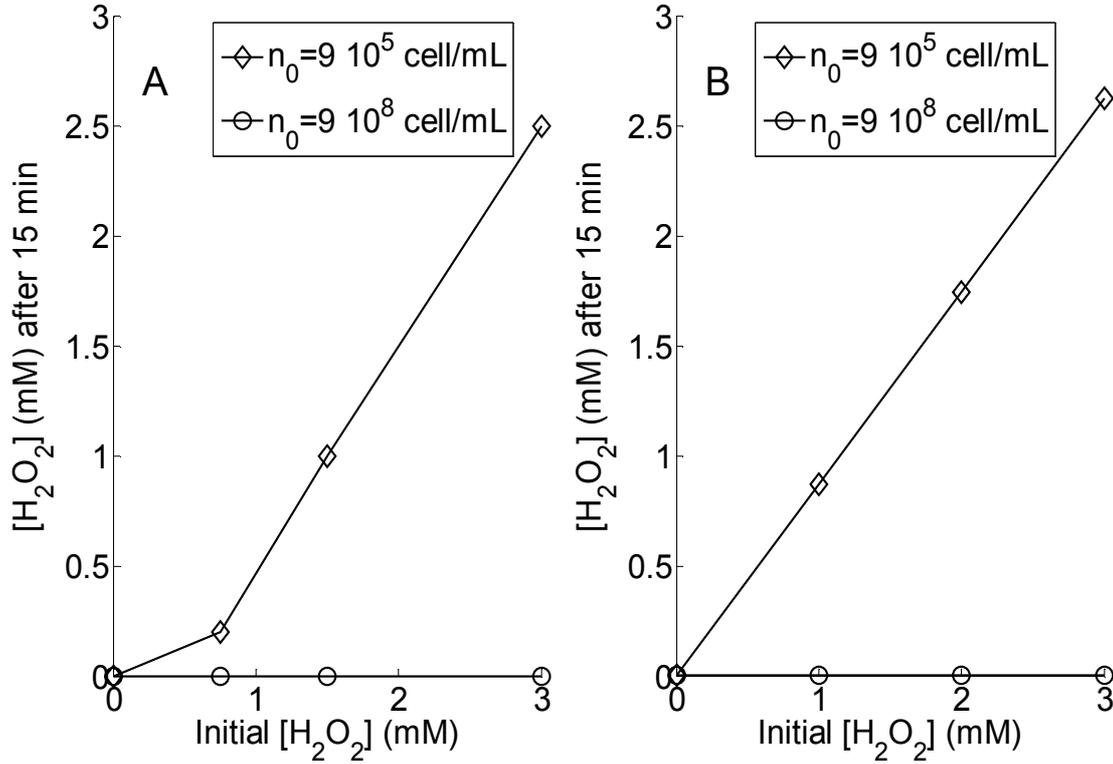


Figure 7: *E. coli* (MG1655) (*in vivo* A) cells were grown aerobically in liquid LB broth, at 37°C, with shaking at 160 rpm. When the OD_{600} reached 1, the cells (diluted till 9×10^5 /ml or not diluted) were exposed to various concentrations of H_2O_2 for 15 minutes. Extracellular H_2O_2 concentration was determined by TECAN readings at OD_{560} , with the Amplex® red hydrogen peroxide/peroxidase kit. Extracellular H_2O_2 concentration, determined after 15 minutes of incubation with various amounts of exogenous H_2O_2 , in a wild-type strain incubated in LB, at 37°C, in the presence of 400 ppm CO_2 . Exogenous H_2O_2 concentration simulated under the same experimental conditions (*in silico* B).

As reported in figure 8, simulation shows that depending on cell density external average H_2O_2 concentration can be two orders of magnitude lower as the initial H_2O_2 exogenous concentration. This difference is involved in the disappearance of the mode one killing at high cell density as observed in figure 9.

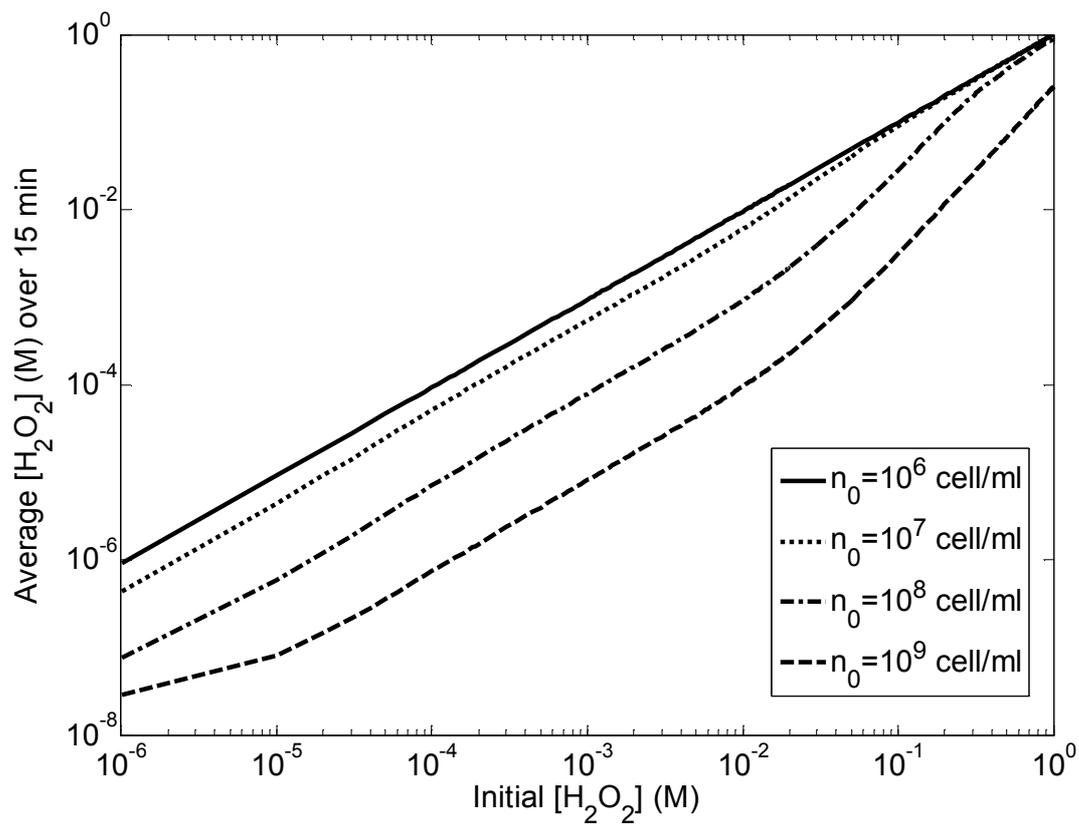


Figure 8: Simulation of the average H_2O_2 external concentration dependence with cell density and initial H_2O_2 exogenous concentration. The kinetic parameters used for the simulation are gathered in table 1.

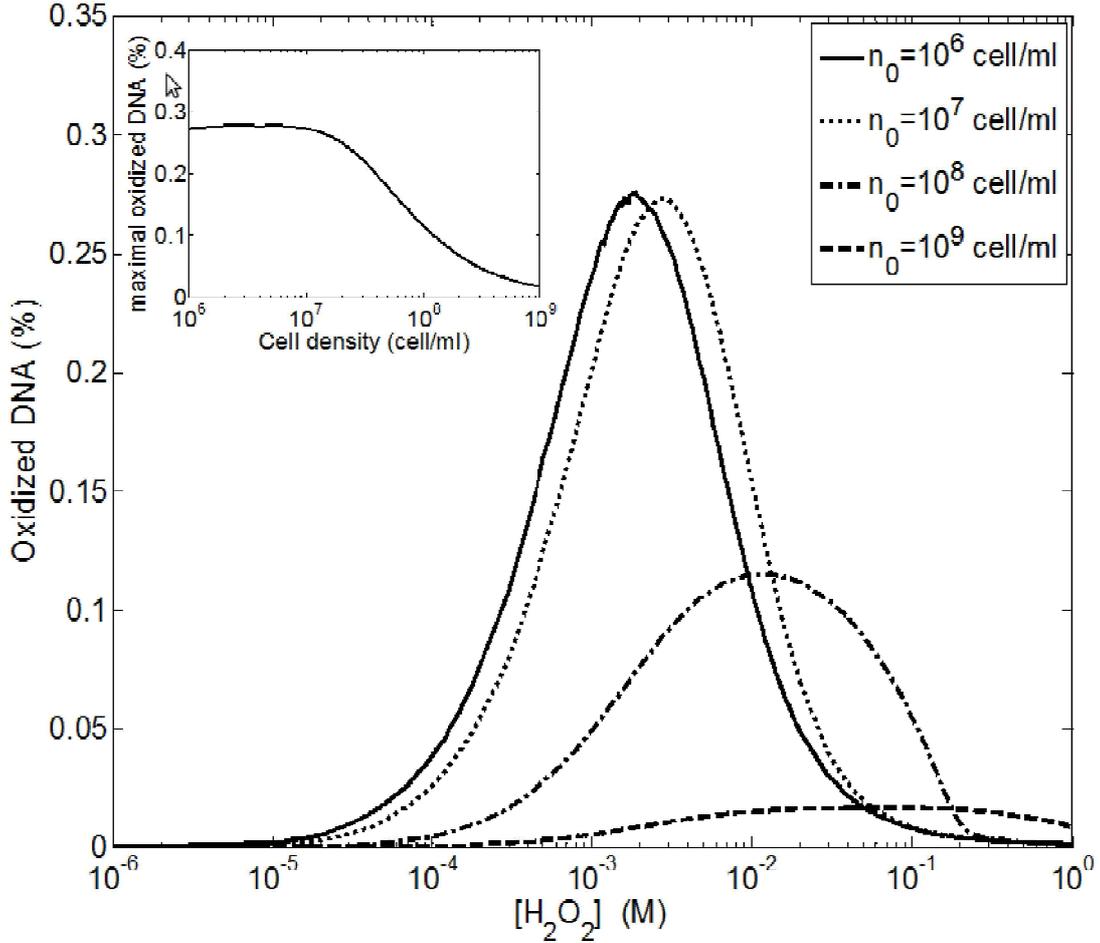


Figure 9: Simulation of the average oxidized DNA proportion dependence with cell density and initial H_2O_2 exogenous concentration. Inset shows the maximal oxidized DNA proportion dependence with cell density. The kinetic parameters used for the simulation are gathered in table 1.

The major characteristics (intensity, width, position) of mode one killing is strongly dependent on cell density. Whereas the mode one killing seems to be present under 3×10^7 cell/ml, it disappears over 10^8 cell/ml. This phenomenon has been observed experimentally by our team (unpublished data). Indeed even at 10^8 cell/ml the mode one killing may disappear because it may be combined with mode two killing which emerges after 10 mM. This phenomenon is particularly non linear (see inset of figure 9) whereas external average H_2O_2 concentration follows a nearly linear evolution compared with initial H_2O_2 exogenous or compared with cell density.

4 Conclusions

We present here a simple model that allows the understanding of DNA oxidation dynamics within *E. coli* after H_2O_2 exposure. The objective of the model presented is to essentially describe in a dynamic way the nature of H_2O_2 toxicity to an organism, in this case *E. coli*. Even if this model could seem imperfect, we believe that the scientific community will be able to challenge and improve it. For instance, using this approach, we were able to demonstrate iron or cell density involvement in HO^\bullet dynamic and by consequence in DNA oxidation within *E. coli*. Indeed, without taking into account the evolution of those two parameters, we were not able to reproduce mode one killing experimental results obtained in the literature. Moreover the first killing mode can only be explained with iron decrease and not with quenching reactions which are responsible for slowing down oxidation but not for the oxidation peak.

“Remember that all models are wrong; the practical question is how wrong do they have to be to not be useful.”

— Box and Draper, Empirical Model-Building, p. 74

Acknowledgment

We thank A. Dumont, E. Fugier, A. Cornish-Bowden for carefully reading the manuscript. We are especially grateful to J. A. Imlay and O. Augusto for helpful discussions, ideas, and comments on the manuscript.

References

Antunes, F., Salvador, A., Marinho, H.S., Alves, R., Pinto, R.E., 1996. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model. Free Radic. Biol. Med. 21, 917-43.

Aslund, F.M., Zheng, J., Beckwith, Storz, G., 1999. Regulation of the OxyR transcriptional factor by hydrogen peroxide and the cellular thioldisulfide status. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 61616165.

Bertrand, R.L., 2014. Lag phase-associated iron accumulation is likely a microbial counter- strategy to host iron sequestration: role of the ferric uptake regulator (fur). *J. Theor. Biol.* 21, 359:72-9.

Brumaghim, J.L., Li, Y., Henle, E., Linn, S., 2003. Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in *Escherichia coli*: changes in enzyme levels and nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III). *J. Biol. Chem.* 278, 42495-504.

Fridovich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880.

Giannessi, M., Del Corso, A., Cappiello, M., Voltarelli, M., Marini, I., Barsacchi, D., Garland, D., Camici, M., Mura, U., 1993. Thiol-dependent metal-catalyzed oxidation of bovine lens aldose reductase. I. studies on the modification process. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 423-429.

Gonzalez-Flecha, B., Demple, B., 1995. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 13681-7.

Hallin, P.F., Ussery, D.W., 2004. CBS Genome Atlas Database: a dynamic storage for bioinformatic results and sequence data. *Bioinformatics.* 20, 3682-6.

Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A.G., Loewen, P.C., 2000. Modulation of the activities of catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 59, 58685875.

Hsieh, Y.H., Hsieh, Y.P., 2000. Kinetics of Fe(III) reduction by ascorbic acid in aqueous solutions. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 1569-73.

Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol* 11, 443-454.

Imlay, J.A., Linn, S., 1986. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol* 166, 519-27.

Imlay, J.A., Chin, S.M., Linn, S., 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240, 640-642.

Imlay, J.A., Fridovich, I., 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266, 6957-65.

Imlay, J.A., Linn, S., 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302-9.

Imlay, J. A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.

Jimenez-Del-Rio, M., Velez-Pardo, C., 2012. The bad, the good and the ugly about oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID 163913.

Keyer, K., Gort, A.S., Imlay, J.A., 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* 177, 6782-6790.

Keyer, K., Imlay, J.A., 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl Acad Sci USA* 93, 13635-40.

Koppenol, W. H., 2001. The Haber-Weiss cycle 70 years later. *Redox Rep.* 6, 229-34.

Kowald, A., Lehrach, H., Klipp, E., 2006. Alternative pathways as mechanism for the negative effects associated with overexpression of superoxide dismutase. *J. Theor. Biol.* 238, 828-40.

Liochev, S.I., Fridovich, I., 2002. The Haber-Weiss cycle 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* 7, 59-60.

Luo, Y., Han, Z., Chin, S.M., Linn, S., 1994. Three chemically distinct types of oxidants formed by iron-mediated Fenton reactions in the presence of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91, 12438-42.

Macomber, L., Rensing, C., Imlay, J.A., 2007. Intracellular Copper Does Not Catalyze the Formation of Oxidative DNA Damage in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189, 16161626.

Michaels, H. B., Hunt, J. W., 1973. Reactions of the hydroxyl radical with polynucleotides. *Radiat. Res.* 56, 57-70.

Netto, L.E., Stadtman, E.R., 1996. The Iron-Catalyzed Oxidation of Dithiothreitol Is a Biphasic Process: Hydrogen Peroxide Is Involved in the Initiation of a Free Radical Chain of Reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 233-42.

Park, S., You, X, Imlay, J.A., 2005. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx-mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 9317-22.

Polynikis, A., Hogan, S.J., di Bernardo, M., 2009. Comparing different ODE modelling approaches for gene regulatory networks. *J. Theor. Biol.* 261, 511-30.

Seaver, L.C., Imlay, J.A., 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183(24), 7173-81.

Seaver, L.C., Imlay, J.A., 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183(24), 7182-89.

Seaver, L.C., Imlay, J.A., 2004. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J. Biol. Chem.* 279, 4874248750.

Touati, D., M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard, and S. Despied. 1995. Lethal oxida-

tive damage and mutagenesis are generated by iron in Dfur mutants of Escherichia coli: protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 177:2305-2314.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 11611208.

Table

Constants	Value	Reference
$k_{prod}^{H_2O_2}$	$15 \mu\text{M s}^{-1}$	Seaver and Imlay, 2001; 2004
K_M^{Kat}	$5.9 \times 10^{-3} \text{ M}$	Hillar et al., 2000
K_M^{Ahp}	$1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$	Seaver and Imlay, 2001
$k_{cat}^{Kat} [Kat]$	$4.9 \times 10^{-1} \text{ M s}^{-1}$	
$k_{cat}^{Ahp} [Ahp]$	$6.6 \times 10^{-4} \text{ M s}^{-1}$	
k_{diff}	70 s^{-1}	
$V_{internal}$	$3.2 \times 10^{-15} \text{ L}$	Imlay and Fridovich, 1991
k_{DNA}	$4.7 \times 10^9 \text{ M s}^{-1} (*)$	Michaels and Hunt, 1973
k_F	4400 M s^{-1}	Park et al., 2005
Initial Fe^{2+} concentration	By default $20 \mu\text{M} (**)$	
Initial cell density n	From 10^6 to 10^9	
C_0	Tested from 0.1 to 5 mM	This work
v_{max}	Tested from 1 to 50 $\mu\text{M s}^{-1}$ and 3 M s^{-1}	This work
<i>Simulation time</i>	15 minutes	Imlay et al., 1986 – 1988

Table 1: Summary of the different constants used for *in silico* simulations. (*) this value is limited the *in vivo* diffusion-limited rate constant assumed to be $2 \times 10^9 \text{ M s}^{-1}$ (Supplementary Material A). (**) We also tested value from 10 to $40 \mu\text{M}$ for the simulation showed in figure 6.

Constants	Value	Reference
$k_{prod}^{H_2O_2}$	$15 \mu\text{M s}^{-1}$	Seaver and Imlay, 2001; 2004
K_M^{Kat}	$5.9 \times 10^{-3} \text{ M}$	Hillar et al., 2000
K_M^{Ahp}	$1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$	Seaver and Imlay, 2001
$k_{cat}^{Kat} [Kat]$	$4.9 \times 10^{-1} \text{ M s}^{-1}$	
$k_{cat}^{Ahp} [Ahp]$	$6.6 \times 10^{-4} \text{ M s}^{-1}$	
k_{diff}	70 s^{-1}	
$V_{internal}$	$3.2 \times 10^{-15} \text{ L}$	Imlay and Fridovich, 1991
k_{DNA}	$4.7 \times 10^9 \text{ M s}^{-1} (*)$	Michaels and Hunt, 1973
k_F	4400 M s^{-1}	Park et al., 2005
Initial Fe^{2+} concentration	By default $20 \mu\text{M} (**)$	
Initial cell density n	From 10^6 to 10^9	
C_0	Tested from 0.1 to 5 mM	This work
v_{max}	Tested from 1 to $50 \mu\text{M s}^{-1}$ and 3 M s^{-1}	This work
<i>Simulation time</i>	15 minutes	Imlay et al., 1986 – 1988

Table 1: Summary of the different constants used for *in silico* simulations. (*) this value is limited the *in vivo* diffusion-limited rate constant assumed to be $2 \times 10^9 \text{ M s}^{-1}$ (Supplementary Material A). (**) We also tested value from 10 to $40 \mu\text{M}$ for the simulation showed in figure 6.

Kinetic constants

Using Bennett *et al.* (2009) metabolome concentration and Buxton and Greenstock (1988) rate constant we evaluate $\sum_{i=1}^N k_i [X_i]$. For unknown values, we set $k_i = 2 \times 10^9 \text{ Mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (this value is assumed to be the *in vivo* diffusion-limited rate constant), or we use the rate constant of a similar compounds (see Table).

By adding all metabolite of this partial table we obtain $\sum_{\substack{i=1 \\ \text{metabolomes}}}^N [X_i] \approx 230 \text{ mM}$ and $\sum_{\substack{i=1 \\ \text{metabolomes}}}^N k_i [X_i] \approx 243 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ by linear extrapolation, if $\sum_{\substack{i=1 \\ \text{metabolomes}}}^N [X_i] \approx 230$ converge to 300 mM, then $\sum_{\substack{i=1 \\ \text{metabolomes}}}^N k_i [X_i]$ will converge to $3.2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$.

Adding the $7 \times 400 \text{ mM}$ of protein residues that can react by nearly diffusion-limited rate constant ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), it gives $\sum_{\substack{i=1 \\ \text{proteins}}}^N k_i [X_i] \approx 70 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$.

Finally $\sum_{\substack{i=1 \\ \text{organic}}}^N k_i [X_i] \approx 73 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$.

Influence of the viscosity of the medium

Chemical rate constants were estimated in aqueous solutions, in which the rates of diffusion-controlled reactions are limited by viscosity to an estimated 10^{10} M s^{-1} . For our model, the first step towards approximating the cytoplasmic conditions was the re-estimation of all chemical rate constants limited by diffusion phenomena. Indeed, in a diffusion-controlled reaction, the formation of products in second-order chemical reactions occurs more rapidly than the diffusion of reactants. The rate of reaction is thus limited by collision frequency kinetics. Smoluchowski (1917) suggested that the upper limit (almost 10^{10} M s^{-1} in aqueous solution) for the diffusion-limited rates of bimolecular reactions depended on molecule size and shape, but that this limit was also linearly dependent on the diffusion coefficient of the medium. According to the Stocks-Einstein equation, viscosity is one of the major parameters determining the diffusion coefficient of species in condensed media. Some experimental measurements (Lupy-Phelps *et al.*, 1993; Kuimova *et al.*, 2008; Petrasek and Schwille 2008) have indicated that the cytoplasm has a viscosity about one or two orders of magnitude greater than that of water. The diffusion coefficient and, consequently, the diffusion-limited rate of reaction, should be about one or two orders of magnitude lower (100-10 times lower) than that in water. Nevertheless, according to other measurements (Mastro *et al.*, 1984; Kushmerick and Podolsky, 1969), diffusion

of small molecules in the cytoplasm is only 2-5 times lower than in aqueous solutions, therefore we assumed that all second-order reaction rate constants would be limited to $2 \times 10^9 \text{ M s}^{-1}$ in cytoplasm which is only five time less than in aqueous solution.

Metabolites X_i	Concentration $[X_i]$ (Mol l^{-1})	Rate constant k_i ($\text{Mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	cumulative $\sum_{i=1}^N k_i [X_i]$ (10^6 s^{-1})
Glutamate	9.6×10^{-2}	2.3×10^8	22
Glutathione	1.7×10^{-2}	1.3×10^{10} (*)	56
Fructose-1,6-bisphosphate	1.5×10^{-2}	2.6×10^8	60
ATP	9.6×10^{-3}	8.9×10^9 (*)	79
UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine	9.2×10^{-3}	4×10^9 for uridine (*)	97
Hexose-P	8.8×10^{-3}	1.4×10^9 for glucose-P	115
UTP	8.3×10^{-3}	4×10^9 for uridine (*)	131
GTP	4.9×10^{-3}	8×10^9 for guanosine (*)	141
dTTP	4.6×10^{-3}	4.7×10^9 for thymidine (*)	150
Aspartate	4.2×10^{-3}	7.5×10^7	151
Valine	4.0×10^{-3}	8.5×10^8	159
Glutamine	3.8×10^{-3}	8.4×10^8	166
6-Phosphogluconate	3.8×10^{-3}	3.0×10^9 for gluconate (*)	174
CTP	2.7×10^{-3}	6.1×10^9 (*)	179
Alanine	2.6×10^{-3}	7.7×10^7	180
NAD ⁺	2.6×10^{-3}	3.2×10^9 (*)	185
UDP-glucose	2.5×10^{-3}	4×10^9 for uridine (*)	190
Glutathione disulfide	2.4×10^{-3}	9.3×10^9 (*)	194
Uridine	2.1×10^{-3}	4×10^9 (*)	199
Citrate	2.0×10^{-3}	5×10^7	199
UDP	1.8×10^{-3}	4×10^9 for uridine (*)	202

Malate	1.7×10^{-3}	8.6×10^9 (*)	206
3-Phosphoglycerate	1.5×10^{-3}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	209
Glycerate	1.4×10^{-3}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	211
Coenzyme A	1.4×10^{-3}	3.1×10^9 (*)	214
Citrulline	1.4×10^{-3}	1.2×10^9	217
Pentose-P	1.3×10^{-3}	1.6×10^9 for ribose	220
Glucosamine-6-phosphate	1.2×10^{-3}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	222
Acetylphosphate	1.1×10^{-3}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	224
Gluconolactone	1.0×10^{-3}	1.7×10^9	226
GDP	6.8×10^{-4}	8×10^9 for guanosine (*)	228
Acetyl-CoA	6.1×10^{-4}	3.1×10^9 for CoA (*)	229
Carbamylaspartate	5.9×10^{-4}	7.5×10^7 for aspartate	229
Arginine	5.7×10^{-4}	3.5×10^9 (*)	230
Succinate	5.7×10^{-4}	3.1×10^8	230
UDP-glucuronate	5.7×10^{-4}	4×10^9 for uridine (*)	231
ADP	5.6×10^{-4}	8.1×10^9 (*)	232
Asparagine	5.1×10^{-4}	4.9×10^7	233
α -Ketoglutarate	4.4×10^{-4}	8.3×10^8 for glutaric	233
Lysine	4.1×10^{-4}	3.5×10^8	234
Proline	3.9×10^{-4}	3.1×10^8	234
dTDP	3.8×10^{-4}	4.7×10^9 for thymidine (*)	235
Dihydroxyacetone-P	3.7×10^{-4}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	235
Homocysteine	3.7×10^{-4}	3.5×10^{10} (*)	236
CMP	3.6×10^{-4}	6.5×10^9 (*)	237
Deoxyribose-5-P	3.0×10^{-4}	2.1×10^9	237
Isoleucine+leucine	3.0×10^{-4}	1.8×10^9	238
AMP	2.8×10^{-4}	4.1×10^9 (*)	238
Inosine monophosphate	2.7×10^{-4}	2.6×10^9 (*)	239
PRPP	2.6×10^{-4}	1.6×10^9 for ribose	239

Succinyl-CoA	2.3×10^{-4}	3.1×10^9 for CoA (*)	240
Inosine triphosphate	2.1×10^{-4}	4×10^9 for inosine	240
Guanine	1.9×10^{-4}	9.2×10^9 (*)	241
Phosphoenolpyruvate	1.8×10^{-4}	3.7×10^7 for pyruvate	241
<i>S</i> -Adenosyl-L-methionine	1.8×10^{-4}	8.5×10^9 for methionine (*)	241
Threonine	1.8×10^{-4}	5.1×10^8	241
FAD	1.7×10^{-4}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	242
Methionine	1.5×10^{-4}	8.5×10^9 (*)	242
2,3-Dihydroxybenzoic acid	1.4×10^{-4}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	242
NADPH	1.2×10^{-4}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	242
Fumarate	1.2×10^{-4}	6.0×10^9 (*)	243
Phenylpyruvate	9.0×10^{-5}	$? \Rightarrow 2 \times 10^9$	243

Table : Ordered kinetic rate constants and concentration of the major metabolites in *E.coli*.

(*) values limited *in vivo* by the diffusion-limited rate constant assumed to be $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

References

Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J., Rabinowitz, J. D., 2009. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 5, 593 - 599.

Buxton, G. V., Greenstock, C. L., 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 17, 513886.

Kuimova, M.K., Yahioglu, G., Lewitt, J.A., Suhling, K., 2008. Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 6672- 6673.

Kushmerick, M.J., Podolsky, R.J., 1969. Ionic mobility in muscle cells. *Science.* 166,

1297-8.

Luby-Phelps, K., Mujumdar, S., Mujumdar, R.B., Ernst, L. A., Galbraith, W., Waggoner, A.S., 1993. A novel fluorescence radiometric method confirms the low solvent viscosity of the cytoplasm. *Biophysical J.* 65, 236-242.

Mastro, A.M., Babich, M.A., Taylor, W.D., Keith, A.D., 1984. Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81, 3414-8.

Petrasek, Z., Schwille, P., 2008. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical J.* 94, 14371448.

Smoluchowski, M., 1917. Attempt for a mathematical theory of kinetic coagulation of colloid solutions. *Z. Phys. Chem.* 92, 129.

Homogeneous model versus compartmentalization

The algorithm generally used to study the compartmentalization of molecule in *E. coli* is the Next-Sub-volume Method. The method is published as supplementary material to Elf and Ehrenberg (Elf et al. 2003 and Elf and Ehrenberg 2004). It is a Gillespie-like (Gillespie 1976 and 1977) method approaching the spatial effects of diffusive phenomena and chemical reaction.

According to the Next Sub-volume Method, the side length ℓ of the square sub-volumes has to satisfy the two inequalities

$$R \ll \ell \text{ and } \tau_{diff} = \frac{\ell^2}{6D} \ll \tau_{react} (*)$$

where R is the larger radius of a molecule of substrat

and D the diffusion constant of H_2O_2

τ_{diff} represents the characteristic time of diffusion

τ_{react} represents the characteristic time of reaction

The first inequality indicates that dissociation events can be properly defined within sub-volumes. The second criterion specifies that the time for any molecule to leave a sub-volume is much smaller than the shortest reaction time τ_{min} among the molecular species, so that all molecules are homogeneously distributed within the sub-volumes.

For example, the 3D simulations are typically performed with $\ell = 0,1 \mu\text{m}$ and the depth $h = \ell$ of the sub-volumes, which is many times larger than the average radius of a substrat even protein.

Considering the H_2O_2 molecule maximal number, the reaction initially follows a pseudo-first order kinetic with rate constant $k' = k[H_2O_2]$ and the characteristic time of reaction is therefore $\tau = 1/k'$. This time has to be compared to the characteristic time of diffusion of H_2O_2 : $\tau_{diff} = \frac{\ell^2}{6D} \approx 10^{-6}$ s (with H_2O_2 diffusion constant $D = 2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). This comparison gives $\tau = 1/k' = 1/k[H_2O_2] \gg 10^{-6}$ or $[H_2O_2] \ll 10^6/k$. Even with very high rate constant such as $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, the inequality imposes $[H_2O_2] \ll 1 \text{ M}$.

In conclusion, while $[H_2O_2] \ll 1 \text{ M}$, the diffusion is faster than the reaction rate and we do not need to consider compartmentalization.

References

Elf, J.; Doncic, A.; Ehrenberg, M. Mesoscopic reaction-diffusion in intracellular signalling. Fluctuation and noise in biological, biophysical and biomedical systems. *Proc. Of SPIE*, vol 5110, 2003.

Elf, J.; Ehrenberg, M.; Spontaneous separation of bi-stable biochemical systems into spatial domains of opposite phases. *Syst. Biol.*, vol. 1, Dec. 2004

Gillespie, D. T. General method for numerically simulating stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *J. Comput. Phys.* 22:403434, 1976.

Gillespie, D. T. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J. Phys. Chem.* 81:23402361, 1977.

Matériels et Méthodes

Partie I :
**Maturation du régulateur
transcriptionnel SoxR**

I. Milieux de culture

Les différentes souches utilisées pendant l'étude sont cultivées en milieu riche Luria Bertani (LB) ou en milieu minimum MOPS (d'après la composition de Garboczi, 1988) supplémenté avec du glucose (0,4 %), du MgSO_4 (1 mM), de la vitamine B1 (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et les acides aminés (0,5 mM). Les milieux solides ont été effectués en supplémentant le milieu LB avec 1,5 % d'agar. Les composés redox actifs, le 2'2-dipyridyl et les antibiotiques proviennent de chez Sigma Aldrich[®].

II. Conditions de culture

II.1. Croissance en milieu liquide

Les différentes souches d'*E. coli* testées sont cultivées à 37°C en milieu LB (contenant 0,1 mM d'IPTG pour la surproduction de SoxR) sous agitation (160 rotations par minute) ou en milieu minimum supplémenté des vingt acides aminés ou des vingt acides aminés moins la leucine, la valine et l'isoleucine. En début de phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600}=0,2$), le phénazine méthosulfate, le 2-2'dipyridyl ou la norfloxacin sont ajoutés. La croissance cellulaire en milieu liquide est suivie par mesure de la DO_{600} ou par suivi de la CFU/mL. Pour effectuer le suivi de la CFU/mL, 30 μL de culture sont prélevés et dilués en série dans du PBS. La dilution est effectuée dans une microplaque de 96 puits provenant de chez Greiner[®]. 5 μL de chaque dilution sont déposés sur une boîte LB agar. Après 16h d'incubation à 37°C, le nombre de CFU/mL est évalué.

II.2. Croissance en milieu solide

Les différentes souches d'*E. coli* testées sont cultivées à 37°C jusqu'en début de phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600}=0,2$). 30 μL de culture sont prélevés et dilués dans du tampon phosphate. La dilution est effectuée dans une microplaque de 96 puits provenant de chez Greiner[®]. 5 μL de chaque dilution sont déposés sur boîte LB agar (supplémenté de 0,1 mM d'IPTG pour la surproduction de SoxR) contenant ou non différentes concentrations de phénazine méthosulfate, de paraquat, de ménadione ou de norfloxacin et incubés pendant 16h à 37°C.

Les cultures en anaérobiose ont été effectuées en boîte à gant. Les différentes souches d'*E. coli* testées sont cultivées en milieu LB supplémenté de nitrate de potassium (20 mM) comme accepteur terminal d'électron et de sodium molybdate (5 μM) dans des tubes Falcon[®] à 37°C et sans agitation. Au bout de trois heures de croissance, 30 μL de culture sont prélevés et

dilués en série dans du tampon phosphate pré-incubé en anaérobie depuis la veille. La dilution est effectuée dans une microplaque de 96 puits provenant de chez Greiner®. 5 µL de chaque dilution sont déposés sur boîte LB agar supplémenté ou non avec du nitrate de potassium (20 mM) et du sodium molybdate (5 µM) contenant ou non différentes concentrations de phénazine méthosulfate, pré-incubé en anaérobie depuis la veille.

III. Test d'activité de la β-galactosidase

Les différentes souches d'*E. coli* testées contenant la fusion *PsoxS::lacZ* sont cultivées en aérobie ou en anaérobie en milieu LB ou en milieu minimum supplémenté des vingt acides aminés ou des vingt acides aminés moins la leucine, la valine et l'isoleucine, en présence ou en absence de phénazine méthosulfate, de 2-2'dipyridyl ou de norfloxacine ajoutés en début de phase exponentielle de croissance ($DO_{600}=0,2$). Des échantillons de 100 µL de culture sont prélevés à différents temps après l'addition de phénazine méthosulfate, de 2-2'dipyridyl ou de norfloxacine et ajoutés dans 900 µL de tampon Z (Na_2HPO_4 0,06 M ; NaH_2PO_4 0,04 M ; KCl 0,01 M pH 7) et maintenus dans de la glace. En parallèle la DO_{600} est prélevée. Quand tous les prélèvements ont été effectués, 100 µL de chloroforme et 50 µL de SDS 0,1 % sont ajoutés au tampon Z contenant les cellules. La solution est mélangée au Vortex® puis incubée pendant 5 minutes dans un bain-marie à 28°C. La réaction est initiée par ajout de 200 µL d'ONPG (4 mg/mL). Les tubes sont rapidement mélangés et incubés dans le bain-marie à 28°C. Lorsque la solution se colore en jaune, la réaction est stoppée par ajout de 500 µL de Na_2CO_3 (1 M). Les tubes sont maintenus à l'obscurité jusqu'au moment de la mesure au spectrophotomètre des DO_{420nm} et DO_{550nm} . Le calcul de l'activité β-galactosidase est effectué grâce à la formule suivante :

$$\text{Unités Miller} = DO_{420nm} - (1,75 \times DO_{550nm}) / t \times v \times DO_{600nm}$$

La DO_{600nm} reflète la densité cellulaire contenu dans l'échantillon à tester. t est le temps (exprimé en minutes) entre le début de la réaction (ajout de l'ONPG) et la fin de la réaction (ajout du Na_2CO_3). Enfin v est le volume (exprimé en mL) de culture bactérienne utilisé dans la réaction. Le protocole d'activité β-galactosidase a été effectué selon Miller (Miller, 1972).

IV. Analyse de la quantité de protéines IscU et SufC par western blot

Les différentes souches d'*E. coli* testées sont cultivées en aérobie ou en anaérobie en milieu LB en présence ou en absence de phénazine méthosulfate (30 μ M) ajouté en début de phase exponentielle de croissance ($DO_{600}=0,2$). Des échantillons de 1 mL sont prélevés au bout de deux heures d'incubation avec le phénazine méthosulfate. Les culots cellulaires sont repris dans du TSTD (préparé selon Miller) et déposés sur un gel dénaturant de polyacrylamide (15% pour IscU et 13% pour SufC). Après migration, le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose avec le Pierce G2 fast blotter de chez ThermoScientific®. Puis la membrane est pré-incubée dans un bain de PBS/tween/lait avant d'être hybridée avec un anti-corps primaire de lapin anti-IscU ou anti-SufC puis un anticorps secondaire de souris anti-lapin couplé à la peroxydase. Les protéines IscU et SufC sont révélées grâce au kit ECL®.

V. Construction plasmidique : clonage de *soxR* dans le vecteur pTrc99A

Le gène *soxR* est amplifié sur le chromosome d'*E. coli* (MG1655), avec les oligonucléotides (5'-ggcccatggaaaagaattaccg) et (5'-gcgcgatccttagtttggatcttccagca), contenant respectivement les sites de restriction *NcoI* et *BamHI*. Les produits PCR obtenus ainsi que le vecteur pTrc99A sont purifiés avec le kit Wizard® puis digérés par les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI*. Les produits de la digestion sont à nouveau purifiés par le kit Wizard® et ligués pendant 16h à 15°C avec la T4 DNA ligase. Les produits de ligation sont dialysés puis électroporés dans la souche MG1655. Les transformants sont sélectionnés sur boîtes LB contenant de l'ampicilline (50 μ g/mL). La construction obtenue est vérifiée par séquençage avec les oligonucléotides (5'gacaattaatcatccggctcg) ou (5'tcagaccgcttctgcttct).

VI. Construction des souches

La souche BE1000 est une fusion traductionnelle $P_{soxS}::lacZ$ qui produit une protéine hybride SoxS-LacZ contenant les 7 premiers acides aminés de SoxS. La fusion contient une région allant des 111 nucléotides en amont du +1 de transcription de *soxS* jusqu'aux 21 premiers nucléotides de la région codante de *soxS*.

Les souches utilisées pendant l'étude (tableau 1) ont été construites par transduction avec le phage P1. La veille, la souche donatrice et la souche réceptrice sont mises en culture en milieu LB. Le matin, 5 mL de milieu LB, 100 μ L de la pré-culture de la souche donatrice, 100 μ L de $CaCl_2$ (1M) et 100 μ L de phage sont mélangés et incubés sous agitation à 37°C. Après 3h30, 100 μ L de chloroforme sont ajoutés à la culture et mélangés au Vortex®. Le lysat phagique est récupéré après 10 minutes d'incubation. En parallèle 5 mL de milieu LB et 25 μ L de pré-

culture de la souche réceptrice sont mélangés et incubés sous agitation à 37°C. Après 3h30, 100 µL de CaCl₂ (1M) sont ajoutés et la culture est placée sous agitation à 37°C pendant 30 minutes. 4 mL de culture de la souche réceptrice et 1 mL de lysat phagique provenant de la souche donatrice sont mélangés et placés à 37°C sans agitation pendant 15 minutes. Le culot cellulaire est récupéré et lavé deux fois avec 1 mL de LB contenant du citrate (5 mM), mélangé à 1 mL de LB contenant du citrate de sodium (5 mM) et incubé pendant 1h30 à 37°C puis étalé sur boîte LB agar contenant du citrate de sodium (2 mM) et l'antibiotique de sélection. La construction est vérifiée par PCR dans les transductants obtenus.

Souches Bactériennes

Souches	Génotype	Source ou référence
BP196	MG1655 Δ <i>iscUA</i> :: <i>Cm</i>	B. Py
BP198	MG1655 Δ <i>suf</i> :: <i>Cm</i>	B. Py
AG011	MG1655 Δ <i>sodA</i> :: <i>kan</i>	Cette étude
BE258	MG1655 Δ <i>sodB</i> :: <i>kan</i>	B. Ezraty
AG004	MG1655 Δ <i>sodA</i> :: <i>Kan</i> Δ <i>iscUA</i> :: <i>Cm</i>	Cette étude
AG005	MG1655 Δ <i>sodB</i> :: <i>Kan</i> Δ <i>iscUA</i> :: <i>Cm</i>	Cette étude
AG006	MG1655 Δ <i>sodA</i> :: <i>Kan</i> Δ <i>suf</i> :: <i>Cm</i>	Cette étude
AG007	MG1655 Δ <i>sodB</i> :: <i>Kan</i> Δ <i>suf</i> :: <i>Cm</i>	Cette étude
BE259	MG1655 Δ <i>sodA</i> :: <i>Cm</i> Δ <i>sodB</i> :: <i>kan</i>	B. Ezraty
AG024	MG1655 Δ <i>sodAB</i> :: <i>Kan</i> Δ <i>iscUA</i> :: <i>Cm</i>	Cette étude
AG025	MG1655 Δ <i>sodAB</i> :: <i>Kan</i> Δ <i>suf</i> :: <i>Cm</i>	Cette étude
BE1000	MG1655 (PM1205 dérivée) <i>P</i> _{<i>soxS</i>} :: <i>lacZ</i> Δ <i>ara</i> <i>BAD</i> <i>ara</i> ⁺ <i>mal</i> :: <i>lacI</i> ^q	B. Ezraty
AG030	BE1000 Δ <i>iscUA</i> :: <i>Cm</i>	Cette étude
AG031	BE1000 Δ <i>suf</i> :: <i>Cm</i>	Cette étude
AG035	BE1000 Δ <i>soxR</i> :: <i>Kan</i>	Cette étude
AG042	BE1000 Δ <i>rsxB</i> :: <i>Kan</i>	Cette étude
AG043	BE1000 Δ <i>nfuA</i> :: <i>Kan</i>	Cette étude
AG044	BE1000 Δ <i>yggX</i> :: <i>Kan</i>	Cette étude
AG045	BE1000 Δ <i>rseC</i> :: <i>Kan</i>	Cette étude
AG047	BE1000 Δ <i>rsxC</i> :: <i>Kan</i>	Cette étude
DV901	MG1655 <i>P</i> _{<i>iscR</i>} :: <i>lacZ</i>	D. Vinella
BP239	MG1655 Δ <i>suf</i> :: <i>Cm</i> <i>P</i> _{<i>iscR</i>} :: <i>lacZ</i>	B. Py
DV922	MG1655 Δ <i>iscUA</i> :: <i>Cm</i> <i>P</i> _{<i>iscR</i>} :: <i>lacZ</i>	D. Vinella

DV915	MG1655 Δ <i>iscR</i> :: <i>Kan P_{iscR}::lacZ</i>	D. Vinella
PM2081	MG1655 <i>P_{sufA}::lacZ</i>	P. Mandin
FG003	MG1655 Δ <i>iscR</i> :: <i>Kan P_{sufA}::lacZ</i>	F. Guillot
FG004	MG1655 Δ <i>fur</i> :: <i>Kan P_{sufA}::lacZ</i>	F. Guillot
FG020	MG1655 Δ <i>iscR \Delta</i> <i>fur</i> :: <i>Kan P_{sufA}::lacZ</i>	F. Guillot

Partie II :

L'effet du CO₂ sur le stress au H₂O₂ chez *E. coli*

I. Milieux et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées durant l'étude sont cultivées à 37°C en milieu liquide Luria Bertani (LB) ou en milieu solide par ajout d'agar (1,5%). La croissance cellulaire en milieu liquide a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm (DO600). La croissance bactérienne à différentes [CO₂] atmosphérique est effectuée en milieu liquide. Pour cela, le milieu de culture est équilibré par bullage d'air (N₂, O₂) contenant différentes [CO₂] (50 et 1000 ppm). Pour ce faire, une pipette Cellstar® de 1 mL provenant de chez Greiner bio-one® est sectionnée au niveau de la graduation 5 ou 2 selon si elle est destinée à une fiole de 100 ou 50 mL. La pipette, introduite dans la fiole, est raccordée à un tuyau, lui-même relié à une bouteille de gaz (mélange d'N₂ et d'O₂) contenant aussi 40 ou 1000 ppm de CO₂. Les bouteilles de gaz proviennent de la société Air-liquide®.

II. Solutions tampons

Le PBS 10X contient du chlorure de sodium (NaCl 80 g/L), du chlorure de potassium (KCl 2 g/L), du sodium phosphate dibasique anhydre (Na₂HPO₄ 14,4 g/L) et du potassium phosphate monobasique (KH₂PO₄ 2,7 g/L). La solution est équilibrée à PH 7,4. Le Tris-HCl contient du Tris-HCl à 127 g/L et du Tris (base) à 23,6 g/L. La solution est équilibrée à pH 7,5.

III. Suivi de l'oxydation du p-NDA via la réaction de Fenton en fonction de la [CO₂] atmosphérique

La réaction de Fenton, conduisant à la formation des HO• et CO₃^{•-}, est obtenue in vitro en mélangeant du sulfate ferreux (FeSO₄ de 0 à 350 M) et du H₂O₂ (de 0 à 40 mM) dans différentes solutions « tampons » à pH 6,5. Le N, N 4 nitroso-diméthyle aniline (p-NDA) est utilisé pour révéler la présence des radicaux dans la solution. Son oxydation provoque un changement de son absorbance à 440 nm selon la réaction suivante. Différentes concentrations de FeSO₄ (de 0 à 350 μM) et 45 μM de p-NDA sont mis en présence dans différentes solutions tampons (qsp 1,5 mL). La réaction est initiée par ajout du H₂O₂ (0 à 40 mM) puis le mélange est homogénéisé par Vortex®. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, une dilution au 1/10^e est effectuée dans de l'eau milli-Q®. La densité optique de la dilution est mesurée par lecture au spectromètre à 440 nm.

Une fois les conditions opératoires identifiées (75 μM FeSO₄; 45 μM p-NDA; 0 à 40 mM d'H₂O₂ et eau milli-Q®), l'impact de la [CO₂] atmosphérique sur l'oxydation du p-NDA a été suivi. Pour ce faire, l'eau milli-Q® stérile est équilibrée par bullage d'un air contenant 0 ou 1000 ppm de CO₂ et préchauffée à 37°C sous une agitation de 160 rpm. Après 45 minutes de

bullage à 0 ppm en CO₂, le pH est de 8,3 et de 5,9 pour 1000 ppm de CO₂. Après avoir ajusté le pH à 6,5, l'eau est à nouveau équilibrée par bullage pendant 15 minutes. Les solutions mères de FeSO₄ et H₂O₂ sont équilibrées par bullage pendant 15 minutes puis conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

Après avoir ajouté l'eau (1145 µL), le FeSO₄ (22,5µL) et le p-NDA (300µL) dans un tube Eppendorf® de 2 mL, le mélange est équilibré pendant 2 minutes à la teneur en CO₂ souhaitée. Pour ce faire, une aiguille immergée dans le mélange transperce le tube Eppendorf®. L'aiguille est reliée à une bouteille de gaz par l'intermédiaire d'un tuyau. Afin de créer une voie de sortie de gaz, quatre trous sont préalablement effectués dans le tube Eppendorf® à l'aide d'une aiguille. La réaction est ensuite initiée par ajout du H₂O₂. La solution est mélangée par Vortex® et incubée à 37°C pendant 15 minutes. Après une dilution au 1/10^e, la lecture de la DO₄₄₀ nm est effectuée.

IV. Survie d'*E. coli* à un stress au H₂O₂ en fonction de la concentration en bactéries

Une culture liquide réalisée dans 25 mL de milieu LB est incubée à 37°C avec agitation sur la nuit. 250 µL de cette culture sont ajoutés à 25 mL de milieu LB et mis à incuber jusqu'à DO₆₀₀=0,3 (pour chaque nouvelle inoculation, le milieu LB est préalablement préchauffé à 37°C pendant 45 minutes sous agitation). Après une dilution du milieu de croissance au 1/100^e, les bactéries sont incubées jusqu'à DO₆₀₀=1. A cette densité optique, la concentration cellulaire est de 3 à 9.10⁸ cfu/mL suivant la souche testée (annexe 2). Les bactéries prélevées à DO₆₀₀=1, subissent ou pas une dilution au 1/1000^e dans du milieu LB préchauffé à 37°C et sont exposées à différentes concentrations en H₂O₂ (de 0 à 5 mM) pendant 15 minutes à 37°C sous agitation (160 rpm). L'action du H₂O₂ est arrêtée par ajout de 200 U de catalase. 100 µL de chaque milieu de culture sont soumis à une série de dilutions en cascade dans du tampon phosphate (0,05 M; pH 7,4; 4°C) et sont étalés sur boîte LB agar. Les colonies sur boîtes sont dénombrées au bout de 16h d'incubation à 37°C. Après cette période d'incubation, l'absence de colonies supplémentaires est observée.

V. Survie d'*E. coli* à un stress au H₂O₂ à 40 et 1000 ppm de CO₂

L'ensemble des cultures est équilibré par bullage à des atmosphères correspondant à 40 ou 1000 ppm de CO₂ comme décrit dans la partie 1. Une culture liquide réalisée dans 25 mL de milieu LB est incubée à 37°C avec agitation sur la nuit. 250 µL de cette culture sont ajoutés à 25 mL de milieu LB et mis à incuber jusqu'à DO₆₀₀=0,3 (pour chaque nouvelle inoculation, le

milieu LB est préalablement préchauffé à 37°C pendant 45 minutes sous agitation). Après une dilution du milieu de croissance au 1/100^e, les bactéries sont incubées jusqu'à DO₆₀₀=1. A cette densité optique, les bactéries sont exposées à différentes concentrations en H₂O₂ (de 0 à 5 mM) pendant 15 minutes à 37°C sous agitation (160 rpm). L'action du H₂O₂ est arrêtée par ajout de 200 U de catalase. 100 µL de chaque culture sont soumis à une série de dilutions en cascade dans du tampon phosphate (0,05 M; pH 7,4; 4°C) et sont étalés sur boîte LB agar. Les colonies sur boîtes sont dénombrées au bout de 16h d'incubation à 37°C. Après cette période d'incubation, l'absence de colonies supplémentaires est observée. La même expérience est effectuée en présence d'un chélateur de fer (2,2' dipyridyl à 1 mM).

VI. Dosage du peroxyde d'hydrogène

Le dosage est effectué avec le kit Amplex® red hydrogen peroxide / peroxidase de chez Invitrogen®. Le kit contient un réactif, l'Amplex® red (10-acetyl-3, 7, dihydroxyphenoxazine) qui en combinaison avec la HRP (horseradish peroxidase) peut détecter le H₂O₂ contenu dans un échantillon biologique. En présence de la peroxidase, l'Amplex® red réagit avec le peroxyde d'hydrogène avec une stoechiométrie 1 : 1 pour donner un produit d'oxydation rouge, la résorufine. En suivant le même protocole que celui décrit ci-dessus, les bactéries sont incubées jusqu'à DO₆₀₀=1 (voir paragraphe 4). Après ajout des différentes concentrations de H₂O₂ (de 0 à 15 mM) et incubation durant 15 minutes, 1 mL est centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Afin d'éviter que la dégradation du H₂O₂ se poursuive, le surnageant (contenant le H₂O₂), est séparé du culot en prenant soin de ne pas prélever de cellules. Le surnageant est ensuite dilué au 1/100^e dans de l'eau milli-Q® stérile pour que la [H₂O₂] soit située dans la gamme détectable par le kit (jusqu'à 25 µM d'H₂O₂). 40 µL de tampon, fourni par le kit, sont déposés dans les puits d'une microplaque de 96 puits de chez Greiner bio-one®. 10 µL d'échantillon sont mis en présence du tampon. La réaction est initiée par ajout du mélange réactionnel (154 µg d'Amplex® red, 60µL de DMSO, 100 µL de HRP et tampon qsp 5 mL). La lecture de l'absorbance est effectuée au TECAN à 560 nm.

VII. Fréquence de mutation à la rifampicine

Les souches sont cultivées en présence de 40 ppm ou 5 % de CO₂ puis exposées à différentes concentrations de H₂O₂ comme décrit dans la partie 1. 1 mL de chaque culture est centrifugé pendant 10 minutes à 6000 rpm et le culot est resuspendu dans 2 mL de milieu LB puis incubé à 37°C sous agitation toute la nuit. Les cultures sont diluées dans du tampon phosphate (0,05

M ; pH 7,4 ; 4°C) et déposées sur boîte LB agar contenant ou non de la rifampicine (100 µg/mL). Les colonies sont dénombrées au bout de 48h, période après laquelle aucune colonie supplémentaire n'est observée. La fréquence de mutation est calculée en divisant le nombre de colonies obtenues sur boîte contenant de la rifampicine par le nombre de colonies obtenues sur la boîte contenant uniquement du LB.

Annexe

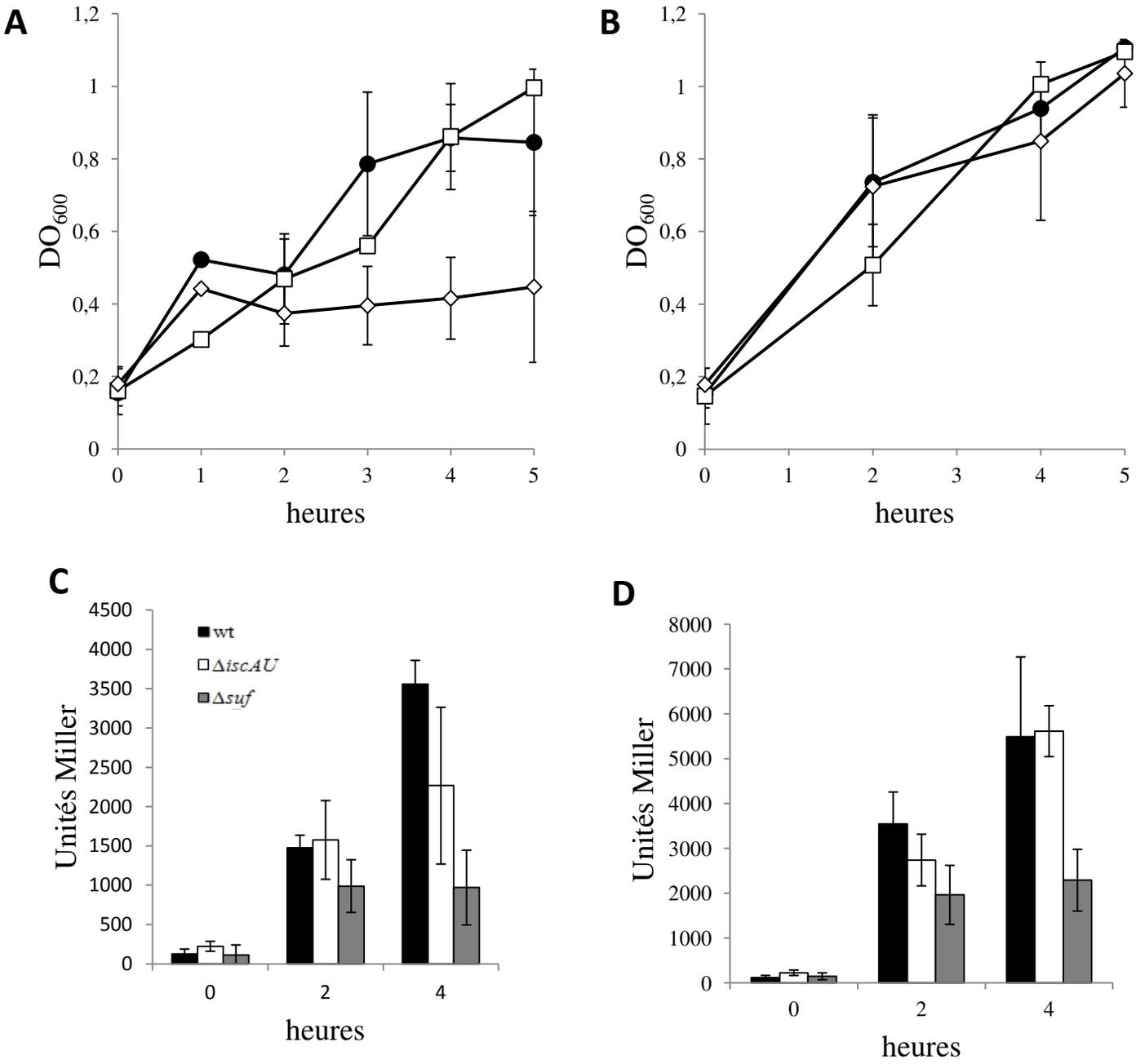


Figure annexe 1 : L'ajout des acides-aminés branchés restaure la croissance du mutant Δsuf en aérobie et en présence de PMS.

Les souches BE101 (WT) (●), AG030 ($\Delta iscUA$) (□) et AG031 (Δsuf) (◇) sont cultivées en milieu minimum glucose contenant (AC) les 20 acides aminés moins l'isoleucine, la valine et la leucine (-ILV) (BD) ou contenant les 20 acides aminés (+ILV). Le PMS (12 μ M) est ajouté (t = 0) en début de phase exponentielle de croissance, et la DO_{600nm} est mesurée au cours du temps. Sur les mêmes cultures l'expression de la fusion $P_{soxS}::lacZ$ en milieu minimum contenant les 20 acides aminés (C) (-ILV) ou (D) (+ILV) a été mesurée pour les souches BE001 (WT) (noir), AG030 ($\Delta iscUA$) (blanc) et AG031 (Δsuf) (gris). Les expériences ont été réalisées plus de trois fois et les moyennes et écart-types sont représentés.

Références bibliographiques

- Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S.R., Bonomi, F., and Pastore, A. (2009). Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 390–396.
- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000). IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis : sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 7856–7862.
- Aiba, H., Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1987). Function of MicF as an antisense RNA in osmoregulatory expression of the *ompF* gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *169*, 3007–3012.
- Al-Maghrebi, M., Fridovich, I., and Benov, L. (2002). Manganese supplementation relieves the phenotypic deficits seen in superoxide-dismutase-null *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* *402*, 104–109.
- Almeida, C.C., Romão, C.V., Lindley, P.F., Teixeira, M., and Saraiva, L.M. (2006). The Role of the Hybrid Cluster Protein in Oxidative Stress Defense. *J. Biol. Chem.* *281*, 32445–32450.
- Aly, S.A., Boothe, D.M., and Suh, S.-J. (2015). A novel alanine to serine substitution mutation in SoxS induces overexpression of efflux pumps and contributes to multidrug resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* *70*, 2228–2233.
- André, G., Haudecoeur, E., Monot, M., Ohtani, K., Shimizu, T., Dupuy, B., and Martin-Verstraete, I. (2010). Global regulation of gene expression in response to cysteine availability in *Clostridium perfringens*. *BMC Microbiol.* *10*, 234.
- Angelini, S., Gerez, C., Choudens, S.O., Sanakis, Y., Fontecave, M., Barras, F., and Py, B. (2008). NfuA, a New Factor Required for Maturing Fe/S Proteins in *Escherichia coli* under Oxidative Stress and Iron Starvation Conditions. *J. Biol. Chem.* *283*, 14084–14091.
- Anjem, A., and Imlay, J.A. (2012). Mononuclear Iron Enzymes Are Primary Targets of Hydrogen Peroxide Stress. *J. Biol. Chem.* *287*, 15544–15556.
- Anjum, M.F., Green, J., and Guest, J.R. (2000). YeiL, the third member of the CRP-FNR family in *Escherichia coli*. *Microbiol. Read. Engl.* *146 Pt 12*, 3157–3170.
- Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol.* *141*, 391–396.
- Augusto, O., Bonini, M.G., Amanso, A.M., Linares, E., Santos, C.C.X., and De Menezes, S.L. (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion : two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* *32*, 841–859.
- Averyanov, A. (2009). Oxidative burst and plant disease resistance. *Front. Biosci. Elite Ed.* *1*, 142–152.
- Ayala-Castro, C., Saini, A., and Outten, F.W. (2008). Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *72*, 110–125, table of contents.
- Balk, J., and Schaedler, T.A. (2014). Iron cofactor assembly in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *65*, 125–153.

- Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2008). Iron-Sulphur Cluster Biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1112–1119.
- Bang, I.-S., Liu, L., Vazquez-Torres, A., Crouch, M.-L., Stamler, J.S., and Fang, F.C. (2006). Maintenance of Nitric Oxide and Redox Homeostasis by the *Salmonella* Flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.* 281, 28039–28047.
- Barras, F., Loiseau, L., and Py, B. (2005). How *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* build Fe/S proteins. *Adv. Microb. Physiol.* 50, 41–101.
- Beinert, H. (2000). Iron-sulfur proteins : ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* 5, 2–15.
- Benov, L.T., and Fridovich, I. (1994). *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 269, 25310–25314.
- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.
- Berlett, B.S., Chock, P.B., Yim, M.B., and Stadtman, E.R. (1990). Manganese(II) catalyzes the bicarbonate-dependent oxidation of amino acids by hydrogen peroxide and the amino acid-facilitated dismutation of hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 389–393.
- Bielski, B.H., Arudi, R.L., and Sutherland, M.W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 258, 4759–4761.
- Bitoun, J.P., Wu, G., and Ding, H. (2008). *Escherichia coli* FtnA Acts as an Iron Buffer for Re-assembly of Iron-Sulfur Clusters in Response to Hydrogen Peroxide Stress. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 21, 693–703.
- Blanc, B., Clémancey, M., Latour, J.-M., Fontecave, M., and Ollagnier de Choudens, S. (2014). Molecular Investigation of Iron–Sulfur Cluster Assembly Scaffolds under Stress. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 7867–7869.
- Blanc, B., Gerez, C., and Ollagnier de Choudens, S. (2015). Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems : Biochemistry of the bacterial ISC system. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1436–1447.
- Bodenmiller, D.M., and Spiro, S. (2006). The *yjeB* (*nsrR*) Gene of *Escherichia coli* Encodes a Nitric Oxide-Sensitive Transcriptional Regulator. *J. Bacteriol.* 188, 874–881.
- Bors, W., Michel, C., and Saran, M. (1979). On the nature of biochemically generated hydroxyl radicals. Studies using the bleaching of p-nitrosodimethylaniline as a direct assay method. *Eur. J. Biochem. FEBS* 95, 621–627.
- Boyd, E.S., Thomas, K.M., Dai, Y., Boyd, J.M., and Outten, F.W. (2014). Interplay between Oxygen and Fe–S Cluster Biogenesis : Insights from the Suf Pathway. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 5834–5847.

- Boylan, J.A., Lawrence, K.A., Downey, J.S., and Gherardini, F.C. (2008). *Borrelia burgdorferi* membranes are the primary targets of reactive oxygen species. *Mol. Microbiol.* *68*, 786–799.
- Bromilow, R.H. (2004). Paraquat and sustainable agriculture. *Pest Manag. Sci.* *60*, 340–349.
- Brumaghim, J.L., Li, Y., Henle, E., and Linn, S. (2003). Effects of Hydrogen Peroxide upon Nicotinamide Nucleotide Metabolism in *Escherichia coli* changes in enzyme levels and nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III). *J. Biol. Chem.* *278*, 42495–42504.
- Butala, M., Sonjak, S., Kamenšek, S., Hodošek, M., Browning, D.F., Žgur-Bertok, D., and Busby, S.J.W. (2012). Double locking of an *Escherichia coli* promoter by two repressors prevents premature colicin expression and cell lysis. *Mol. Microbiol.* *86*, 129–139.
- Carlioz, A., and Touati, D. (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* *5*, 623–630.
- Chahal, H.K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., and Outten, F.W. (2009). The SufBCD Fe-S scaffold complex interacts with SufA for Fe-S cluster transfer. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 10644–10653.
- Chander, M., and Demple, B. (2004). Functional Analysis of SoxR Residues Affecting Transduction of Oxidative Stress Signals into Gene Expression. *J. Biol. Chem.* *279*, 41603–41610.
- Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2006). HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 11087–11095.
- Chandramouli, K., Unciuleac, M.-C., Naik, S., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2007). Formation and Properties of [4Fe-4S] Clusters on the IscU Scaffold Protein†. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 6804–6811.
- Constantinidou, C., Hobman, J.L., Griffiths, L., Patel, M.D., Penn, C.W., Cole, J.A., and Overton, T.W. (2006). A Reassessment of the FNR Regulon and Transcriptomic Analysis of the Effects of Nitrate, Nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 Adapts from Aerobic to Anaerobic Growth. *J. Biol. Chem.* *281*, 4802–4815.
- Crack, J., Green, J., and Thomson, A.J. (2004). Mechanism of Oxygen Sensing by the Bacterial Transcription Factor Fumarate-Nitrate Reduction (FNR). *J. Biol. Chem.* *279*, 9278–9286.
- Crack, J.C., Green, J., Hutchings, M.I., Thomson, A.J., and Le Brun, N.E. (2012). Bacterial Iron–Sulfur Regulatory Proteins As Biological Sensor-Switches. *Antioxid. Redox Signal.* *17*, 1215–1231.
- Crack, J.C., Stapleton, M.R., Green, J., Thomson, A.J., and Brun, N.E.L. (2013). Mechanism of [4Fe-4S](Cys)₄ Cluster Nitrosylation Is Conserved among NO-responsive Regulators. *J. Biol. Chem.* *288*, 11492–11502.

- Crack, J.C., Munnoch, J., Dodd, E.L., Knowles, F., Bassam, M.M.A., Kamali, S., Holland, A.A., Cramer, S.P., Hamilton, C.J., Johnson, M.K., et al. (2015). NsrR from *Streptomyces coelicolor* Is a Nitric Oxide-sensing [4Fe-4S] Cluster Protein with a Specialized Regulatory Function. *J. Biol. Chem.* *290*, 12689–12704.
- Crane, B.R., Sudhamsu, J., and Patel, B.A. (2010). Bacterial Nitric Oxide Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 445–470.
- Cristóbal, R.E. de, Vincent, P.A., and Salomón, R.A. (2006). Multidrug resistance pump AcrAB-TolC is required for high-level, Tet(A)-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* *58*, 31–36.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M.N., Scott, C., Thomson, A.J., Green, J., and Poole, R.K. (2002). NO sensing by FNR : regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* *21*, 3235–3244.
- Cupp-Vickery, J.R., Urbina, H., and Vickery, L.E. (2003). Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *330*, 1049–1059.
- Dahl, J.-U., Gray, M.J., and Jakob, U. (2015). Protein Quality Control under Oxidative Stress Conditions. *J. Mol. Biol.* *427*, 1549–1563.
- Dai, Y., and Outten, F.W. (2012). The *E. coli* SufS-SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS-IscU. *FEBS Lett.* *586*, 4016–4022.
- Daung-nkern, J., Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S. (2010). Inactivation of *nfuA* enhances susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolone antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1831–1832.
- Demple, B., Johnson, A., and Fung, D. (1986). Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 7731–7735.
- Díaz, A., Loewen, P.C., Fita, I., and Carpena, X. (2012). Thirty years of heme catalases structural biology. *Arch. Biochem. Biophys.* *525*, 102–110.
- Dietrich, L.E.P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., and Newman, D.K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *61*, 1308–1321.
- Dietrich, L.E.P., Teal, T.K., Price-Whelan, A., and Newman, D.K. (2008). Redox-Active Antibiotics Control Gene Expression and Community Behavior in Divergent Bacteria. *Science* *321*, 1203–1206.
- Ding, H., and Clark, R.J. (2004). Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem. J.* *379*, 433–440.
- Ding, H., and Demple, B. (2000). Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5146–5150.

- Ding, H., Hidalgo, E., and Dimple, B. (1996). The Redox State of the [2Fe-2S] Clusters in SoxR Protein Regulates Its Activity as a Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* *271*, 33173–33175.
- Estellon, J., Ollagnier de Choudens, S., Smadja, M., Fontecave, M., and Vandenbrouck, Y. (2014). An integrative computational model for large-scale identification of metalloproteins in microbial genomes : a focus on iron-sulfur cluster proteins. *Met. Integr. Biometal Sci.* *6*, 1913–1930.
- Ezraty, B., Chabalier, M., Ducret, A., Maisonneuve, E., and Dukan, S. (2011). CO₂ exacerbates oxygen toxicity. *EMBO Rep.* *12*, 321–326.
- Ezraty, B., Vergnes, A., Banzhaf, M., Duverger, Y., Huguenot, A., Brochado, A.R., Su, S.-Y., Espinosa, L., Loiseau, L., Py, B., et al. (2013). Fe-S Cluster Biosynthesis Controls Uptake of Aminoglycosides in a ROS-Less Death Pathway. *Science* *340*, 1583–1587.
- Fleischhacker, A.S., Stubna, A., Hsueh, K.-L., Guo, Y., Teter, S.J., Rose, J.C., Brunold, T.C., Markley, J.L., Münck, E., and Kiley, P.J. (2012). Characterization of the [2Fe-2S] Cluster of *Escherichia coli* Transcription Factor IscR. *Biochemistry (Mosc.)* *51*, 4453–4462.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.-I., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2003). Proteomic Discovery of Cellular Substrates of the ClpXP Protease Reveals Five Classes of ClpX-Recognition Signals. *Mol. Cell* *11*, 671–683.
- Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur clusters : ever-expanding roles. *Nat. Chem. Biol.* *2*, 171–174.
- Fontecave, M., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2008). Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria : Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* *474*, 226–237.
- Fridovich, I. (2013). Oxygen : How Do We Stand It? *Med. Princ. Pract.* *22*, 131–137.
- Fujikawa, M., Kobayashi, K., and Kozawa, T. (2012). Direct Oxidation of the [2Fe-2S] Cluster in SoxR Protein by Superoxide distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* *287*, 35702–35708.
- Fujikawa, M., Kobayashi, K., and Kozawa, T. (2015). Redox-dependent DNA distortion in a SoxR protein-promoter complex studied using fluorescent probes. *J. Biochem. (Tokyo)* *157*, 389–397.
- Gaudu, P., and Weiss, B. (1996). SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10094–10098.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C., and Kelley, W.L. (2007). The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli* : a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol. Microbiol.* *66*, 840–857.
- Giel, J.L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F.R., and Kiley, P.J. (2006). IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *60*, 1058–1075.

- Giel, J.L., Nesbit, A.D., Mettert, E.L., Fleischhacker, A.S., Wanta, B.T., and Kiley, P.J. (2013). Regulation of iron-sulphur cluster homeostasis through transcriptional control of the Isc pathway by [2Fe-2S]-IscR in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 87, 478–492.
- Gilberthorpe, N.J., Lee, M.E., Stevanin, T.M., Read, R.C., and Poole, R.K. (2007). NsrR : a key regulator circumventing *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* oxidative and nitrosative stress *in vitro* and in IFN- γ -stimulated J774.2 macrophages. *Microbiology* 153, 1756–1771.
- Goldsmith-Fischman, S., Kuzin, A., Edstrom, W.C., Benach, J., Shastry, R., Xiao, R., Acton, T.B., Honig, B., Montelione, G.T., and Hunt, J.F. (2004). The SufE sulfur-acceptor protein contains a conserved core structure that mediates interdomain interactions in a variety of redox protein complexes. *J. Mol. Biol.* 344, 549–565.
- Gort, A.S., and Imlay, J.A. (1998). Balance between Endogenous superoxide Stress and Antioxidant Defenses. *J. Bacteriol.* 180, 1402–1410.
- Gort, A.S., Ferber, D.M., and Imlay, J.A. (1999). The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32, 179–191.
- Gralnick, J., and Downs, D. (2001). Protection from superoxide damage associated with an increased level of the YggX protein in *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 8030–8035.
- Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E.T., Thomson, A.J., and Guest, J.R. (1996). Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. *Biochem. J.* 316, 887–892.
- Greenberg, J.T., and Demple, B. (1989). A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J. Bacteriol.* 171, 3933–3939.
- Gruner, I., Frädrieh, C., Böttger, L.H., Trautwein, A.X., Jahn, D., and Härtig, E. (2011). Aspartate 141 Is the Fourth Ligand of the Oxygen-sensing [4Fe-4S]²⁺ Cluster of *Bacillus subtilis* Transcriptional Regulator Fnr. *J. Biol. Chem.* 286, 2017–2021.
- Gu, M., and Imlay, J.A. (2011). The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Mol. Microbiol.* 79, 1136–1150.
- Gu, M., and Imlay, J.A. (2013). Superoxide poisons mononuclear iron enzymes by causing mismetallation. *Mol. Microbiol.* 89, 123–134.
- Haines, S., Arnaud-Barbe, N., Poncet, D., Reverchon, S., Wawrzyniak, J., Nasser, W., and Renaud-Mongénie, G. (2015). IscR Regulates Synthesis of Colonization Factor Antigen I Fimbriae in Response to Iron Starvation in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 197, 2896–2907.
- Hassan, H.M., and Fridovich, I. (1978). Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253, 8143–8148.

- Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y., and Linn, S. (1999). Sequence-specific DNA Cleavage by Fe²⁺-mediated Fenton Reactions has Possible Biological Implications. *J. Biol. Chem.* *274*, 962–971.
- Heurlier, K., Thomson, M.J., Aziz, N., and Moir, J.W.B. (2008). The Nitric Oxide (NO)-Sensing Repressor NsrR of *Neisseria meningitidis* has a compact Regulon of genes involved in NO synthesis and detoxification. *J. Bacteriol.* *190*, 2488–2495.
- Hidalgo, E., and Demple, B. (1994). An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO J.* *13*, 138–146.
- Hoff, K.G., Silberg, J.J., and Vickery, L.E. (2000). Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 7790–7795.
- Huet, G., Daffé, M., and Saves, I. (2005). Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of [Fe-S] cluster assembly : evidence for its implication in the pathogen's survival. *J. Bacteriol.* *187*, 6137–6146.
- Hug, S.J., and Leupin, O. (2003). Iron-catalyzed oxidation of arsenic(III) by oxygen and by hydrogen peroxide : pH-dependent formation of oxidants in the Fenton reaction. *Environ. Sci. Technol.* *37*, 2734–2742.
- Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Howes, B.D., Garcia-Serres, R., Clémancey, M., Latour, J.-M., Smulevich, G., and Pastore, A. (2011). The role of CyaY in iron sulfur cluster assembly on the *E. coli* IscU scaffold protein. *PLoS One* *6*, e21992.
- Imlay, J.A. (2008). Cellular Defenses against superoxide and hydrogen Peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 755–776.
- Imlay, J.A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress : lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 443–454.
- Imlay, J.A. (2015). Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species. *Annu. Rev. Microbiol.* *69*, null.
- Imlay, J.A., and Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *266*, 6957–6965.
- Imlay, J.A., and Linn, S. (1986). Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* *166*, 519–527.
- Isabella, V.M., Lapek Jr, J.D., Kennedy, E.M., and Clark, V.L. (2009). Functional analysis of NsrR, a nitric oxide-sensing Rrf2 repressor in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* *71*, 227–239.
- Jang, S., and Imlay, J.A. (2010). Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Mol. Microbiol.* *78*, 1448–1467.

- Jiang, D., Hatahet, Z., Blaisdell, J.O., Melamede, R.J., and Wallace, S.S. (1997). *Escherichia coli* endonuclease VIII : cloning, sequencing, and overexpression of the *nei* structural gene and characterization of *nei* and *nei nth* mutants. *J. Bacteriol.* *179*, 3773–3782.
- Justino, M.C., Almeida, C.C., Teixeira, M., and Saraiva, L.M. (2007). *Escherichia coli* di-iron YtfE Protein is necessary for the repair of stress-damaged iron-sulfur clusters. *J. Biol. Chem.* *282*, 10352–10359.
- Kampinga, H.H., and Craig, E.A. (2010). The HSP70 chaperone machinery : J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 579–592.
- Kang, Y., Weber, K.D., Qiu, Y., Kiley, P.J., and Blattner, F.R. (2005). Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J. Bacteriol.* *187*, 1135–1160.
- Kehrer, J.P. (2000). The Haber–weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* *149*, 43–50.
- Kehres, D.G., Janakiraman, A., Slauch, J.M., and Maguire, M.E. (2002). Regulation of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium mntH* transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺. *J. Bacteriol.* *184*, 3151–3158.
- Keyer, K., and Imlay, J.A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 13635–13640.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., and Kiley, P.J. (1997). Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂ : [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 6087–6092.
- Kiley, P.J., and Beinert, H. (1998). Oxygen sensing by the global regulator, FNR : the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol. Rev.* *22*, 341–352.
- Kiley, P.J., and Beinert, H. (2003). The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 181–185.
- Kim, J.H., Füzéry, A.K., Tonelli, M., Ta, D.T., Westler, W.M., Vickery, L.E., and Markley, J.L. (2009). Structure and dynamics of the iron–sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 6062–6071.
- Kim, J.H., Tonelli, M., and Markley, J.L. (2012). Disordered form of the scaffold protein IscU is the substrate for iron-sulfur cluster assembly on cysteine desulfurase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 454–459.
- Kim, J.H., Bothe, J.R., Frederick, R.O., Holder, J.C., and Markley, J.L. (2014). Role of IscX in iron-sulfur cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 7933–7942.
- Klug, D., Rabani, J., and Fridovich, I. (1972). A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* *247*, 4839–4842.
- Kobayashi, K., and Tagawa, S. (1999). Isolation of reductase for SoxR that governs an oxidative response regulon from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* *451*, 227–230.

- Kobayashi, K., and Tagawa, S. (2004). Activation of SoxR-dependent transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem. (Tokyo)* *136*, 607–615.
- Kobayashi, K., Fujikawa, M., and Kozawa, T. (2014). Oxidative stress sensing by the iron-sulfur cluster in the transcription factor, SoxR. *J. Inorg. Biochem.* *133*, 87–91.
- Koo, M.-S., Lee, J.-H., Rah, S.-Y., Yeo, W.-S., Lee, J.-W., Lee, K.-L., Koh, Y.-S., Kang, S.-O., and Roe, J.-H. (2003). A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. *EMBO J.* *22*, 2614–2622.
- Korshunov, S., and Imlay, J.A. (2010). Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *75*, 1389–1401.
- Korshunov, S.S., and Imlay, J.A. (2002). A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* *43*, 95–106.
- Koutsolioutsou, A., Martins, E.A., White, D.G., Levy, S.B., and Demple, B. (2001). A soxRS-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 38–43.
- Koutsolioutsou, A., Peña-Llopis, S., and Demple, B. (2005). Constitutive soxR mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 2746–2752.
- Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2001). IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 14069–14080.
- Kuo, C.F., Mashino, T., and Fridovich, I. (1987). α , β -Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme. *J. Biol. Chem.* *262*, 4724–4727.
- Kussmaul, L., and Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 7607–7612.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., and Lill, R. (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1050–1055.
- Layer, G., Gaddam, S.A., Ayala-Castro, C.N., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Fontecave, M., and Outten, F.W. (2007). SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* *282*, 13342–13350.
- Lazazzera, B.A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M.C., and Kiley, P.J. (1996). DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* *271*, 2762–2768.
- Lee, J.-H., Yeo, W.-S., and Roe, J.-H. (2004). Induction of the *sufA* operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide : involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor. *Mol. Microbiol.* *51*, 1745–1755.

- Lee, J.-H., Lee, K.-L., Yeo, W.-S., Park, S.-J., and Roe, J.-H. (2009a). SoxRS-mediated lipopolysaccharide modification enhances resistance against multiple drugs in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *191*, 4441–4450.
- Lee, K.-C., Yeo, W.-S., and Roe, J.-H. (2008). Oxidant-responsive induction of the *suf* operon, encoding a Fe-S assembly system, through Fur and IscR in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *190*, 8244–824.
- Lee, K.-L., Singh, A.K., Heo, L., Seok, C., and Roe, J.-H. (2015). Factors affecting redox potential and differential sensitivity of SoxR to redox-active compounds. *Mol. Microbiol.* *97*, 808–21.
- Lee, P.E., Demple, B., and Barton, J.K. (2009b). DNA-mediated redox signaling for transcriptional activation of SoxR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 13164–13168.
- Leichert, L.I., Gehrke, F., Gudiseva, H.V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A.K., Strahler, J.R., Andrews, P.C., and Jakob, U. (2008). Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8197–8202.
- Li, D.S., Ohshima, K., Jiralerspong, S., Bojanowski, M.W., and Pandolfo, M. (1999). Knock-out of the *cyaY* gene in *Escherichia coli* does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Lett.* *456*, 13–16.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* *460*, 831–838.
- Lin, C.-N., Syu, W.-J., Sun, W.-S.W., Chen, J.-W., Chen, T.-H., Don, M.-J., and Wang, S.-H. (2010). A role of *ygfZ* in the *Escherichia coli* response to plumbagin challenge. *J. Biomed. Sci.* *17*, 84.
- Liochev, S.I., and Fridovich, I. (1992). Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 5892–5896.
- Liochev, S.I., Hausladen, A., and Fridovich, I. (1999). Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3537–3539.
- Loew, O. (1900). A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science* *11*, 701–702.
- Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M., and Barras, F. (2003). Biogenesis of Fe-S Cluster by the Bacterial Suf System SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.* *278*, 38352–38359.
- Loiseau, L., Gerez, C., Bekker, M., Choudens, S.O., Py, B., Sanakis, Y., Mattos, J.T. de, Fontecave, M., and Barras, F. (2007). ErpA, an iron–sulfur (Fe–S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 13626–13631.
- Lu, J., Yang, J., Tan, G., and Ding, H. (2008). Complementary roles of SufA and IscA in the biogenesis of iron–sulfur clusters in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* *409*, 535–543.
- Malkin, R., and Rabinowitz, J.C. (1966). The reconstitution of *clostridial* ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *23*, 822–827.

- Markley, J.L., Kim, J.H., Dai, Z., Bothe, J.R., Cai, K., Frederick, R.O., and Tonelli, M. (2013). Metamorphic protein IscU alternates conformations in the course of its role as the scaffold protein for iron-sulfur cluster biosynthesis and delivery. *FEBS Lett.* *587*, 1172–1179.
- Massé, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 4620–4625.
- Matsui, M., Tomita, M., and Kanai, A. (2013). Comprehensive computational analysis of bacterial CRP/FNR superfamily and its target motifs reveals stepwise evolution of transcriptional networks. *Genome Biol. Evol.* *5*, 267–282.
- Mavrodi, D.V., Blankenfeldt, W., and Thomashow, L.S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas spp.* biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 417–445.
- Messner, K.R., and Imlay, J.A. (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *274*, 10119–10128.
- Messner, K.R., and Imlay, J.A. (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J. Biol. Chem.* *277*, 42563–42571.
- Mettert, E.L., and Kiley, P.J. (2005). ClpXP-dependent proteolysis of FNR upon loss of its O₂-sensing [4Fe–4S] Cluster. *J. Mol. Biol.* *354*, 220–232.
- Mettert, E.L., and Kiley, P.J. (2007). Contributions of [4Fe–4S]-FNR and integration host factor to *fnr* transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* *189*, 3036–3043.
- Mettert, E.L., and Kiley, P.J. (2015). Fe–S proteins that regulate gene expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1853*, 1284–1293.
- Mettert, E.L., Outten, F.W., Wanta, B., and Kiley, P.J. (2008). The impact of O₂ on the Fe–S cluster biogenesis requirements of *Escherichia coli* FNR. *J. Mol. Biol.* *384*, 798–811.
- Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., and Esaki, N. (2000). Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli* : mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J. Biochem. (Tokyo)* *127*, 559–567.
- Nachin, L., El Hassouni, M., Loiseau, L., Expert, D., and Barras, F. (2001). SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi* : the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol. Microbiol.* *39*, 960–972.
- Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D., and Barras, F. (2003). SufC : an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe–S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.* *22*, 427–437.
- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., and Fuchs, R.P.P. (2000). All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J.* *19*, 6259–6265.
- Neilands, J.B. (1993). Siderophores. *Arch. Biochem. Biophys.* *302*, 1–3.

- Nesbit, A.D., Giel, J.L., Rose, J.C., and Kiley, P.J. (2009). Sequence-specific binding to a subset of IscR-regulated promoters does not require IscR Fe-S Cluster Ligation. *J. Mol. Biol.* *387*, 28–41.
- Netz, D.J.A., Mascarenhas, J., Stehling, O., Pierik, A.J., and Lill, R. (2014). Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell Biol.* *24*, 303–312.
- Nichols, D.S., and McMeekin, T.A. (2002). Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acids. *J. Microbiol. Methods* *48*, 161–170.
- Nunoshiba, T., Hidalgo, E., Amábile Cuevas, C.F., and Demple, B. (1992). Two-stage control of an oxidative stress regulon : the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *J. Bacteriol.* *174*, 6054–6060.
- Okegbe, C., Sakhtah, H., Sekedat, M.D., Price-Whelan, A., and Dietrich, L.E.P. (2011). Redox Eustress : roles for redox-active metabolites in bacterial signaling and behavior. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 658–667.
- Ollagnier-de-Choudens, S., Mattioli, T., Takahashi, Y., and Fontecave, M. (2001). Iron-sulfur cluster assembly : characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J. Biol. Chem.* *276*, 22604–22607.
- Otsuka, Y., Miki, K., Koga, M., Katayama, N., Morimoto, W., Takahashi, Y., and Yonesaki, T. (2010). IscR regulates RNase LS activity by repressing *rnlA* transcription. *Genetics* *185*, 823–830.
- Outten, F.W., Wood, M.J., Muñoz, F.M., and Storz, G. (2003). The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *278*, 45713–45719.
- Outten, F.W., Djaman, O., and Storz, G. (2004). A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *52*, 861–872.
- Palma, M., Zurita, J., Ferreras, J.A., Worgall, S., Larone, D.H., Shi, L., Campagne, F., and Quadri, L.E.N. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the Archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect. Immun.* *73*, 2958–2966.
- Park, S., You, X., and Imlay, J.A. (2005). Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9317–9322.
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W., and Kim, I.H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 5723–5732.
- Partridge, J.D., Bodenmiller, D.M., Humphrys, M.S., and Spiro, S. (2009). NsrR targets in the *Escherichia coli* genome : new insights into DNA sequence requirements for binding and a role for NsrR in the regulation of motility. *Mol. Microbiol.* *73*, 680–694.
- Pastore, A., and Puccio, H. (2013). Frataxin : a protein in search for a function. *J. Neurochem.* *126 Suppl 1*, 43–52.

- Patzer, S.I., and Hantke, K. (1999). SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *181*, 3307–3309.
- Perrin, B.S., and Ichiye, T. (2013). Identifying sequence determinants of reduction potentials of metalloproteins. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* *18*, 599–608.
- Petrova, V.Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A.V., and Schmitt, M.J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* *380*, 393–400.
- Pierson, L.S., and Pierson, E.A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria : impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *86*, 1659–1670.
- Pinske, C., and Sawers, R.G. (2012a). A-Type carrier protein ErpA is essential for formation of an active formate-nitrate respiratory pathway in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *194*, 346–353.
- Pinske, C., and Sawers, R.G. (2012b). Delivery of iron-sulfur clusters to the hydrogen-oxidizing [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli* requires the A-type carrier proteins ErpA and IscA. *PloS One* *7*, e31755.
- Pohl, T., Walter, J., Stolpe, S., Soufo, J.H.D., Grauman, P.L., and Friedrich, T. (2007). Effects of the deletion of the *Escherichia coli* frataxin homologue CyaY on the respiratory NADH : ubiquinone oxidoreductase. *BMC Biochem.* *8*, 13.
- Pomposiello, P.J., and Demple, B. (2000). Identification of SoxS-regulated genes in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *J. Bacteriol.* *182*, 23–29.
- Pomposiello, P.J., Koutsolioutsou, A., Carrasco, D., and Demple, B. (2003). SoxRS-regulated expression and genetic analysis of the *yggX* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *185*, 6624–6632.
- Popescu, C.V., Bates, D.M., Beinert, H., Münck, E., and Kiley, P.J. (1998). Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 13431–13435.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L.E.P., and Newman, D.K. (2007). Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* *189*, 6372–6381.
- Privalle, C.T., and Fridovich, I. (1988). Inductions of superoxide dismutases in *Escherichia coli* under anaerobic conditions. Accumulation of an inactive form of the manganese enzyme. *J. Biol. Chem.* *263*, 4274–4279.
- Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., and Tainer, J.A. (2000). Active and inhibited human catalase structures : ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* *296*, 295–309.
- Py, B., Moreau, P.L., and Barras, F. (2011). Fe-S clusters, fragile sentinels of the cell. *Curr. Opin. Microbiol.* *14*, 218–223.

- Py, B., Gerez, C., Angelini, S., Planel, R., Vinella, D., Loiseau, L., Talla, E., Brochier-Armanet, C., Garcia Serres, R., Latour, J.-M., et al. (2012). Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe-S carrier. *Mol. Microbiol.* *86*, 155–171.
- Rajagopalan, S., Teter, S.J., Zwart, P.H., Brennan, R.G., Phillips, K.J., and Kiley, P.J. (2013). Studies of IscR reveal a unique mechanism for metal-dependent regulation of DNA binding specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 740–747.
- Ramelot, T.A., Cort, J.R., Goldsmith-Fischman, S., Kornhaber, G.J., Xiao, R., Shastry, R., Acton, T.B., Honig, B., Montelione, G.T., and Kennedy, M.A. (2004). Solution NMR structure of the iron-sulfur cluster assembly protein U (IscU) with zinc bound at the active site. *J. Mol. Biol.* *344*, 567–583.
- Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *54*, 881–941.
- Raulfs, E.C., O’Carroll, I.P., Santos, P.C.D., Unciuleac, M.-C., and Dean, D.R. (2008). In vivo iron–sulfur cluster formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 8591–8596.
- Reents, H., Gruner, I., Harmening, U., Böttger, L.H., Layer, G., Heathcote, P., Trautwein, A.X., Jahn, D., and Härtig, E. (2006). *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol. Microbiol.* *60*, 1432–1445.
- Robinson, J.M. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* *131*, 465–469.
- Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., and Barras, F. (2013). Reprint of: Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes : formation, regulation and diversity. *Biochim. Biophys. Acta* *1827*, 923–937.
- Roche, B., Huguenot, A., Barras, F., and Py, B. (2015a). The iron-binding CyaY and IscX proteins assist the ISC-catalyzed Fe-S biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *95*, 605–623.
- Roche, B., Agrebi, R., Huguenot, A., Ollagnier de Choudens, S., Barras, F., and Py, B. (2015b). Turning *Escherichia coli* into a frataxin-dependent organism. *PLoS Genet.* *11*, e1005134.
- Rodionov, D.A., Dubchak, I.L., Arkin, A.P., Alm, E.J., and Gelfand, M.S. (2005). Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria : Comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput. Biol.* *1*.
- Rubio, L.M., and Ludden, P.W. (2008). Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* *62*, 93–111.
- Saito, Y., Uraki, F., Nakajima, S., Asaeda, A., Ono, K., Kubo, K., and Yamamoto, K. (1997). Characterization of endonuclease III (*nth*) and endonuclease VIII (*nei*) mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *179*, 3783–3785.

- Salmon, K., Hung, S., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G.W., and Gunsalus, R.P. (2003). Global Gene expression profiling in *Escherichia coli* K12 the effects of oxygen availability and FNR. *J. Biol. Chem.* 278, 29837–29855.
- Santos, J.A., Alonso-García, N., Macedo-Ribeiro, S., and Pereira, P.J.B. (2014). The unique regulation of iron-sulfur cluster biogenesis in a Gram-positive bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E2251–E2260.
- Santos, J.A., Pereira, P.J.B., and Macedo-Ribeiro, S. (2015). What a difference a cluster makes : the multifaceted roles of IscR in gene regulation and DNA recognition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1854, 1101–1112.
- Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H., and Kiley, P.J. (2001). IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14895–14900.
- Seaver, L.C., and Imlay, J.A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7173–7181.
- Seaver, L.C., and Imlay, J.A. (2004). Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J. Biol. Chem.* 279, 48742–48750.
- Shafirovich, V., Dourandin, A., Huang, W., and Geacintov, N.E. (2001). The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 276, 24621–24626.
- Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Spang, R.J., and Walden, W.E. (2010). Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system : factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *J. Biol. Chem.* 285, 26745–26751.
- Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.-F., Matte, A., Armengod, M.E., and Cygler, M. (2010). Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* 8, e1000354.
- Shin, J.-H., Singh, A.K., Cheon, D.-J., and Roe, J.-H. (2011). Activation of the SoxR regulon in *Streptomyces coelicolor* by the extracellular form of the pigmented antibiotic actinorhodin. *J. Bacteriol.* 193, 75–81.
- Smith, A.D., Agar, J.N., Johnson, K.A., Frazzon, J., Amster, I.J., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2001). Sulfur transfer from IscS to IscU : the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 11103–11104.
- Sobota, J.M., and Imlay, J.A. (2011). Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5402–5407.
- Spiro, S., Gaston, K.L., Bell, A.I., Roberts, R.E., Busby, S.J.W., and Guest, J.R. (1990). Interconversion of the DNA-binding specificities of two related transcription regulators, CRP and FNR. *Mol. Microbiol.* 4, 1831–1838.

- Stadtman, E.R., and Berlett, B.S. (1991). Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* *266*, 17201–17211.
- Stevanin, T.M., Poole, R.K., Demoncheaux, E.A.G., and Read, R.C. (2002). Flavohemoglobin Hmp protects *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* from nitric oxide-related killing by human macrophages. *Infect. Immun.* *70*, 4399–4405.
- Stevanin, T.M., Read, R.C., and Poole, R.K. (2007). The *hmp* gene encoding the NO-inducible flavohaemoglobin in *Escherichia coli* confers a protective advantage in resisting killing within macrophages, but not in vitro : Links with swarming motility. *Gene* *398*, 62–68.
- Sutton, V.R., Stubna, A., Patschkowski, T., Münck, E., Beinert, H., and Kiley, P.J. (2004). Superoxide destroys the [2Fe-2S]²⁺ cluster of FNR from *Escherichia coli*†. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 791–798.
- Suzuki, Y.J., Carini, M., and Butterfield, D.A. (2010). Protein carbonylation. *Antioxid. Redox Signal.* *12*, 323–325.
- Tao, K., Fujita, N., and Ishihama, A. (1993). Involvement of the RNA polymerase α subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. *Mol. Microbiol.* *7*, 859–864.
- Tardat, B., and Touati, D. (1991). Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli* : Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control). *Mol. Microbiol.* *5*, 455–465.
- Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.H., Laval, J., Grollman, A.P., and Nishimura, S. (1991). 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 4690–4694.
- Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2001). Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* *130*, 63–71.
- Tokumoto, U., Nomura, S., Minami, Y., Mihara, H., Kato, S.-I., Kurihara, T., Esaki, N., Kanazawa, H., Matsubara, H., and Takahashi, Y. (2002). Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* *131*, 713–719.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L., and Despied, S. (1995). Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli* : protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* *177*, 2305–2314.
- Tucker, N.P., Le Brun, N.E., Dixon, R., and Hutchings, M.I. (2010). There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response. *Trends Microbiol.* *18*, 149–156.
- Urbina, H.D., Silberg, J.J., Hoff, K.G., and Vickery, L.E. (2001). Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J. Biol. Chem.* *276*, 44521–44526.
- Vickery, L.E., and Cupp-Vickery, J.R. (2007). Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *42*, 95–111.

- Vinella, D., Brochier-Armanet, C., Loiseau, L., Talla, E., and Barras, F. (2009). Iron-Sulfur (Fe/S) Protein Biogenesis : Phylogenomic and Genetic Studies of A-Type Carriers. *PLoS Genet.* 5. e1000497
- Vinella, D., Loiseau, L., Ollagnier de Choudens, S., Fontecave, M., and Barras, F. (2013). In vivo [Fe-S] cluster acquisition by IscR and NsrR, two stress regulators in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 87, 493–508.
- Wang, Y., Wilks, J.C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L., and Newman, D.K. (2011). Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development *via* ferrous iron acquisition. *J. Bacteriol.* 193, 3606–3617.
- Watanabe, S., Kita, A., Kobayashi, K., and Miki, K. (2008). Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4121–4126.
- Wolfe, M.T., Heo, J., Garavelli, J.S., and Ludden, P.W. (2002). Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 5898–5902.
- Wollers, S., Layer, G., Garcia-Serres, R., Signor, L., Clemancey, M., Latour, J.-M., Fontecave, M., and Choudens, S.O. de (2010). Iron-Sulfur (Fe-S) cluster assembly the SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor. *J. Biol. Chem.* 285, 23331–23341.
- Wu, Y., and Outten, F.W. (2009). IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *J. Bacteriol.* 191, 1248–1257.
- Yan, R., Kelly, G., and Pastore, A. (2014). The scaffold protein IscU retains a structured conformation in the Fe-S cluster assembly complex. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* 15, 1682–1686.
- Yeo, W.-S., Lee, J.-H., Lee, K.-C., and Roe, J.-H. (2006). IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol. Microbiol.* 61, 206–218.
- Yukl, E.T., Elbaz, M.A., Nakano, M.M., and Moënne-Loccoz, P. (2008). Transcription Factor NsrR from *Bacillus subtilis* senses nitric oxide with a 4Fe–4S Cluster†. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 13084–13092.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D., and Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* 181, 4639–4643.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., and Storz, G. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570.

