



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITE DE METZ
IUT DE METZ**



THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ
Discipline : Microbiologie – Immunologie

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	20010955
Cote	S/M2 01/32
Loc	Magasin

Présentée par
Marie-Laure LEDRICH

**MISE EN EVIDENCE ET ETUDE COMPARATIVE DES PROTEINES DE
TRANSPORT DE FER ET D'AUTRES METAUX CHEZ *RALSTONIA EUTROPHA*
CH34 ET SOUCHES DERIVEES**

Soutenue publiquement le
14 Décembre 2001

Devant le jury composé de :

Professeur HEULIN Thierry
Professeur MEYER Jean-Marie
Docteur AUBRY
Docteur FALLA Jaïro
Professeur VASSEUR Paule

CNRS - CEA, Cadarache
Institut de Botanique, Strasbourg
LCM3B, Nancy
IUT de Metz, Metz
E.B.S.E., Metz

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

UNIVERSITE DE METZ
IUT DE METZ

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ
Discipline : Microbiologie – Immunologie

Présentée par
Marie-Laure LEDRICH

**MISE EN EVIDENCE ET ETUDE COMPARATIVE DES PROTEINES DE
TRANSPORT DE FER ET D'AUTRES METAUX CHEZ *RALSTONIA EUTROPHA*
CH34 ET SOUCHES DERIVEES**

Soutenue publiquement le
14 Décembre 2001

Devant le jury composé de :

Professeur HEULIN Thierry
Professeur MEYER Jean-Marie
Docteur AUBRY
Docteur FALLA Jaïro
Professeur VASSEUR Paule

CNRS - CEA, Cadarache
Institut de Botanique, Strasbourg
LCM3B, Nancy
IUT de Metz, Metz
E.B.S.E., Metz

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

A mes parents...

Avant-Propos

La région LORRAINE a été partenaire de ce projet en cofinçant une partie de la thèse.

Cette étude a été effectuée sous la direction du Professeur Paule VASSEUR et du Docteur Jaïro FALLA au sein de l'équipe d'Immunologie – Microbiologie de l'IUT de Metz, délocalisé à Thionville – Yutz (57) rattachée à l'EBSE de l'Université de Metz (57).

Remerciements

A l'issue de cette étude, je tiens à adresser ma profonde reconnaissance au Docteur Jaïro FALLA, pour ses conseils, ses compétences, sa disponibilité mais également pour sa compréhension et son soutien permanent.

Je souhaite également remercier vivement le Professeur Paule Vasseur pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail, pour ses conseils et sa disponibilité.

Mes remerciements vont aussi au Professeur Jean-Marie Meyer, qui a accepté d'analyser cette thèse.

Je tiens également à adresser mes remerciements au Professeur Thierry Heulin, pour l'attention qu'il a accordé à ce travail, comme rapporteur de l'étude.

Je remercie le Docteur Aubry pour avoir accepté d'être jury de cette thèse.

J'associe à ce travail mes collègues thésards, ainsi que l'ensemble du personnel de l'IUT de Thionville-Yutz pour leur aide et leur gentillesse.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à mes amis, ma famille, pour leur soutien inconditionnel, leurs conseils et surtout pour m'avoir « supportée » et aidée tout au long de ce travail.

SOMMAIRE :

I. INTRODUCTION	1
II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
II.1. Les métaux.....	6
II.1.1. Classifications	7
II.1.2. Propriétés et toxicité du cadmium, du cobalt et du zinc	8
a. Le cadmium (Cd^{2+})	8
b. Le cobalt (Co^{2+})	8
c. Le zinc (Zn^{2+})	9
II.2. Rappels sur la structure des enveloppes des bactéries à Gram négatif.....	10
II.2.1. Membrane externe.....	11
a. Composition	11
b. Rôle de la membrane externe.....	12
II.2.2. Le peptidoglycane	12
a. Composition	12
b. Rôle	13
II.2.3. Membrane cytoplasmique	13
a. Composition	13
b. Rôle	14
II.3. <i>Ralstonia eutropha</i> CH34	15
II.3.1. Origine	15
II.3.2. Caractéristiques macroscopiques et biochimiques	16
II.3.3. Génétique et systèmes de résistances aux métaux lourds	17
a. Génétique du système <i>czc</i>	17
b. Localisation et poids moléculaire des protéines composant le système <i>czc</i>	18
c. Mécanisme d'expulsion des métaux	18
d. Régulation du système <i>czc</i>	20

e. Génétique du système cnr	20
f. Régulation du système cnr	21
II.3.4. Souches dérivées de <i>Ralstonia eutropha</i> CH34 : <i>Ralstonia eutropha</i> 1153 et <i>Ralstonia eutropha</i> 104.....	22
II.4. Un système de transport du fer, assuré par un ligand spécifique : le sidérophore	
II.4.1. Mécanisme(s) de liaison du fer au sidérophore	25
II.4.2. Mécanisme de transport du complexe sidérophore-fer chez <i>Ralstonia eutropha</i> CH34.....	27
II.4.3. Libération du fer dans le cytoplasme et stockage	29
II.4.4. Régulation du système de transport de fer	30
a. Régulation par la protéine Fur.....	30
b. Régulation positive.....	30
II.5. Techniques de séparation des enveloppes bactériennes.....	32
II.6. Techniques de purification de protéines membranaires	33
II.6.1. Extraction des protéines membranaires des molécules qui lui sont liées....	34
a. Solubilisation des protéines membranaires par action d'un solvant organique .	34
b. Solubilisation des protéines membranaires par action d'un détergent.....	35
c. Optimisation de l'étape de solubilisation	36
II.6.2. Purification des protéines solubilisées (ou séparation)	37
a Séparation basée sur la taille des protéines	37
b. Séparation basée sur la spécificité de la protéine : chromatographie d'affinité et immunoaffinité.....	38
c. Séparation basée sur la charge de la protéine.....	38
II.6.3. Concentration des protéines purifiées.....	41
La précipitation.....	41
La lyophilisation	41
La filtration	42
La dialyse.....	42

II.7. Techniques d'analyses des protéines des enveloppes bactériennes	43
II.7.1 Méthodes biochimiques	43
a. Electrophorèses dénaturante / non dénaturante	43
b. Types de colorations	45
II.7.2. Les méthodes immunologiques	48
a. Optimisation de la réponse immunitaire	49
b. Production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux.....	50
c. Anticorps monoclonaux / anticorps polyclonaux ?	51
II. 8. Techniques d'évaluation de l'activité des protéines membranaires	53
III. MATERIEL ET METHODES	55
III.1. Conditions de culture bactérienne	56
III.1.1. Matériel biologique	56
III.1.2. Milieu et conditions de culture	56
III.1.3. Tests de pureté des souches	57
III.1.4. Détermination de la concentration maximale d'inhibition (CMI) pour le cobalt, le zinc et le cadmium	58
III.2. Obtention des enveloppes de <i>Ralstonia eutropha</i> CH34.....	59
III.2.1. Lavages des cellules	60
III.2.2. Isolement de la membrane externe	60
III.2.3. Isolement de la membrane cytoplasmique	60
III.2.4. Isolement du peptidoglycane.....	61
III.2.5. Dosage des marqueurs membranaires	62
a. Dosage du 2-céto-3-désoxyoctanate (KDO)	62
b. Dosage de la succinate déshydrogénase	63
c. Dosage des hexosamines par la méthode de Montreuil et Spik (1963)	63
d. Evaluation de la quantité de protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA).....	64
e. Mesure du poids sec	64
III.3. Etude et comparaison des enveloppes de <i>Ralstonia eutropha</i> CH34, 1153 et	

104 par électrophorèse SDS-PAGE	65
III.3.1. Composition des Gels	65
III.3.2. Préparation des tampons et des échantillons	65
III.3.3. Coloration au Bleu de Coomassie.....	65
III.3.4. Coloration au noir soudan	66
III.3.5. Méthode de conservation des gels.....	66
III.4. Mise au point d'une technique de purification des protéines de la membrane externe de <i>Ralstonia eutropha</i> CH34	67
III.4.1. Protocole de purification des protéines membranaires de <i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i> CH34.....	67
III.4.2. Suivi de la purification par électrophorèse SDS-PAGE	69
III.5. Identification et rôle de la protéine de 45 kDa, mise en évidence au niveau de la membrane externe de <i>Ralstonia eutropha</i> 104	70
III.5.1. Rôle de la protéine de 45 kDa : méthode de dialyse.....	70
a. Obtention de la membrane externe.....	71
b. Obtention des sidérophores	71
c. Métaux testés	71
d. Mise en place du suivi de dialyse.....	71
e . Dosage par absorption atomique	72
III.6. Identification des protéines composant le système <i>czc</i> chez <i>Ralstonia eutropha</i> par méthode immunologique	73
III.6.1. Sélection des séquences d'acides aminés.....	73
III.6.2. Matériel biologique	73
III.6.3. Préparation et injections des immunogènes.....	73
III.6.4. Obtention des sérums	74
III.6.5. Analyse des sérums par Western Blot	74
III.7. Perspectives : Mise en évidence du passage du fer ferreux par le système de résistance <i>czc</i>	76

IV. RESULTATS ET ANALYSE.....	77
IV.1. Vérification de la pureté des souches	78
IV.1.1. Objectif	78
IV.1.2. Résultats et discussion	79
IV.2. Suivi de la croissance bactérienne – choix du milieu de culture.....	80
IV.2.1.Objectif.....	80
IV.2.2. Protocole.....	80
IV.2.3. Résultats et discussion	80
IV.3. Fractionnement des enveloppes cellulaires de <i>Ralstonia eutropha</i> CH34, suivi de pureté	83
IV.3.1. Objectif.....	83
IV.3.2. Protocole expérimental	83
IV.3.3. Résultats et discussion	83
IV.4. Analyse par électrophorèse de la membrane externe de <i>Ralstonia eutropha</i> CH34 pour la mise en évidence de(s) protéine(s) de transport du fer	86
IV.4.1. Objectif.....	86
IV.4.2. Protocole.....	86
IV.4.3. Résultats et discussion	87
IV.5. Comparaison des enveloppes de <i>Ralstonia eutropha</i> CH34, 104 et 1153, pour l'identification des protéines impliquées dans les transport de fer et de résistance czc.....	90
IV.5.1.Analyse des protéines des enveloppes de <i>Ralstonia eutropha</i> CH34, 104 et 1153 par électrophorèse SDS-PAGE.....	90
a. Objectifs	90
b. Protocole.....	90
c. Résultats et discussion	91
- Analyse des membranes externes	91
-Nature de la protéine de 45 kDa au niveau de la membrane externe de <i>Ralstonia eutropha</i> 104	93

-Analyse des fractions de peptidoglycanes et membranes cytoplasmiques.....	96
IV.6. Purification de protéines de la membrane externe de <i>Ralstonia eutropha</i> , impliquées dans le transport de fer.....	98
IV.6.1. Objectif.....	98
IV.6.2. Protocole : Optimisation de la méthode	98
a. Analyse du protocole 1	102
b. Analyse du protocole 2.....	107
c. Analyse du protocole 3.....	110
d. Analyse du protocole 4.....	113
e. Analyse du protocole 5.....	118
IV.6.3. Synthèse et conclusions concernant la purification de la protéine membranaire de 45 kDa.....	122
IV.7. Etude de l'adsorption du fer ferrique, du cobalt, zinc et cadmium par la membrane externe de <i>Ralstonia eutropha</i> 104	124
IV.7.1. Objectif.....	124
IV.7.2. Protocole : technique de dialyse	124
IV.7.3. Analyse et discussion	124
IV.7.4. Isothermes d'adsorption du cadmium, cobalt, zinc sur la membrane externe de <i>Ralstonia eutropha</i> 104	126
IV.7.5. Analyse et discussion	128
IV.8. Démonstration du système czc	130
IV.8.1. Objectif.....	130
IV.8.2. Protocole : Choix des séquences acides aminés pour la production d'anticorps polyclonaux	131
a. Analyse des anticorps polyclonaux produits contre la séquence aminée czc A....	131
b. Analyse des anticorps polyclonaux produits contre la séquence aminée czc B	133
c. Analyse des anticorps polyclonaux produits contre la séquence aminée czc C....	136
d. Analyse des anticorps polyclonaux produits contre la séquence aminée czc D....	138
e. Conclusions concernant le système czc	140

IV.9. Perspectives et premiers résultats	142
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	144
VI. LISTE BIBLIOGRAPHIQUE	149

ABREVIATIONS :

AE :	aminoéthyl
AFNOR :	Association Française de NORmalisation
BCA :	acide bicinchoninique
CHAPS :	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CMC :	concentration critique de micelles
CMI :	Concentration Maximale d’Inhibition
DCPIP :	2,6-dichlorophénolindophénol
DEAE :	diéthylaminoéthyl
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA :	Enzyme Linked Immuno Assay
GF :	chromatographie de filtration sur gel
HIC :	chromatographie d’interactions hydrophobes
IEC :	chromatographie d’échanges ioniques
Ig :	Immunoglobuline
KDO :	2-céto-3-désoxyoctanate
LPS :	LipoPolySaccharides
nPOE :	n-octylpolyoxyéthylène
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PEG :	PolyEthylèneGlycol
PMS :	Phénazine MéthoSulfate
PMSF :	PhénylMéthylSulFate
RPC :	chromatographie en phase inversée
SDH :	succinate déshydrogénase
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TAM :	TriethylAminoMethyl
TBS :	TRIS Buffer Saline
TTBS :	Tween 20-TRIS Buffer Saline
TEAE :	TriEthylAminoEthyl

VI. LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

Les métaux, couramment utilisés dans l'industrie (métallurgie, automobile, etc...), sont de plus en plus présents dans les écosystèmes. Leur présence dans les sols et l'eau, peut être une source de contamination de la chaîne alimentaire (Bruins *et al.*, 2000 ; Briat et Lebrun, 1999).

De nombreux micro-organismes (*Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha*) exposés à ces métaux dans leur environnement naturel développent divers systèmes de résistance, phénomène traduisant l'adaptation de certaines souches à ces pressions métalliques. A l'heure actuelle, seuls des procédés chimiques (floculation, réduction ou oxydation par ajout d'un acide ou d'une base) sont utilisés pour remédier à ce type de pollution. Ces processus peuvent être à l'origine d'importantes variations de pH des milieux dépollués. C'est pourquoi, les bactéries présentent un intérêt évident pour la dépollution des milieux contaminés.

Ralstonia eutropha CH34 est l'un des principaux représentants du groupe de bactéries chimiolithotrophes facultatives, dont la présence dans des milieux contenant de fortes concentrations en métaux lourds est ubiquitaire (Collard *et al.*, 1994). Cette souche contient deux mégaplasmines pMOL28 (168 kb) et pMOL30 (238 kb) portant plusieurs opérons, codant pour les résistances au cobalt, zinc et cadmium (czc) et au cobalt, nickel (cnr).

De plus, cette bactérie développe un système spécifique du transport du fer, élément indispensable à sa croissance. Ce système est codé par le chromosome bactérien. Son expression, à la surface cellulaire est toutefois modulée par la teneur en fer ferrique.

Le but de ce travail est d'identifier le fonctionnement de ces deux systèmes protéiniques, qui semblent être liés (Namiranian *et al.*, 1997 ; Gilis *et al.*, 1998).

Les caractéristiques de *Ralstonia eutropha* CH34 et des souches dérivées (1153 et 104), le rôle des métaux dans l'environnement, ainsi que les techniques d'études de protéines, seront développées dans l'analyse bibliographique.

Au terme de la présentation du matériel et des méthodes mis en œuvre, la partie expérimentale et la discussion des résultats seront exposées. Deux souches dérivées de *Ralstonia eutropha* CH34 ont été utilisées (*Ralstonia eutropha* 1153 et 104) et des techniques d'identification des protéines constituant ces systèmes ont été développées. Après avoir purifié les enveloppes et comparé leur composition protéique par électrophorèse, les protéines du système *czc* ont été identifiées en produisant des anticorps polyclonaux spécifiques.

Ralstonia eutropha 104, souche dépourvue des plasmides de résistance a été étudiée pour révéler une éventuelle captation des métaux par le système de transport de fer.

Les conclusions présenteront le modèle *czc*, la localisation et le poids moléculaire des protéines qui le composent. Elles révéleront une protéine membranaire d'environ 45 kDa, synthétisée par *Ralstonia eutropha* 104 et détailleront des éléments de réponse quand à son rôle. Enfin, le mécanisme d'absorption de métaux toxiques (cobalt, zinc, cadmium) par cette souche sera mis en évidence.

II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

L'analyse bibliographique a pour premier objectif de clarifier la place du cobalt, du zinc, du cadmium et du fer dans l'environnement. Toxiques pour les microorganismes à forte concentration, ils sont toutefois indispensables à certains mécanismes cellulaires. Dans une première partie, les systèmes de régulation de la présence de ces métaux et leur rôle dans des mécanismes cellulaires seront abordés.

Nous présenterons dans une seconde partie la souche *Ralstonia eutropha* CH34, qui de par sa capacité à bio-accumuler ces métaux, est utilisée dans la dépollution des sols et des eaux (Diels *et al.*, 1995), ainsi que certaines de ses souches dérivées (*Ralstonia eutropha* 104 et *Ralstonia eutropha* 1153).

Le système de résistances *czc* (cobalt, zinc, cadmium) de *Ralstonia eutropha* CH34 est basé sur l'expulsion de ces métaux (Silver et Phung, 1996). Cette bactérie synthétise également un mécanisme de transport du fer très spécifique, élément peu bio-disponible mais essentiel à la survie de la cellule.

Ces deux mode de transport, le premier facultatif (expression plasmidienne), l'autre inductible mais constitutif (porté par le chromosome) semblent liés (Gilis *et al.*, 1996).

La connaissance des protéines impliquées dans ces deux systèmes de transport et l'identification de liens éventuels entre ces mécanismes est un élément important dans la remédiation biologique de ces éléments minéraux toxiques.

II.1. Les métaux

La croûte terrestre ne contient pas moins de 68 éléments traces, éléments minéraux dont la concentration dans ce compartiment est inférieure à 0,1 %. Certains de ces éléments, aussi appelés oligo-éléments, tels le zinc, le cadmium, le cuivre, le cobalt, le nickel ou le magnésium, sont essentiels à la survie bactérienne, car ils interviennent comme co-facteurs enzymatiques (Prescott *et al.*, 1995 ; Juste *et al.*, 1995) (tableau I).

Tableau I : exemples de métabolismes nécessitant des métaux, Pelmont, 1993.

Elément co-facteur	Fonction métabolique - Mécanisme Enzymatique
Magnésium (Mg ²⁺)	Rôle dans l'intégrité structurale de la paroi bactérienne, co-facteur de nombreuses enzymes comme les kinases
Calcium (Ca ²⁺)	Se lie à des enzymes extracellulaires, telles les protéases et amylases
Molybdate (Mo ²⁺)	Nitrate réductases, nitrogénases, certaines réductases
Manganèse (Mn ²⁺)	Co-facteur de sueroxyde dismutase, déshydratase, PEP carbokinase, citrate synthétase
Cobalt (Co ²⁺)	Glutamate mutase, méthylmalonyl-CoA mutase (enzymes à coenzymes dérivées de la vitamine B12). Intervient aussi dans la méthanogénèse et comme co-facteur : peptidases, ariginase
Cuivre (Cu ²⁺)	Cytochrome oxydase, oxygénases, nitrite réductase, superoxyde dismutase, et certains transporteurs d'électrons
Nickel (Ni ²⁺)	Co-facteur de l'uréase, certaines hydrogénases, certaines réductases
Zinc (Zn ²⁺)	Co-facteur ou élément structural de l'alcool déshydrogénase, la phosphatase alcaline, ARN et ADN-polymérases
Sélénium (Se ²⁺)	Glycocolle réductase, formiate déshydrogénase
Tungstène (W ²⁺)	Certaines formate déshydrogénases

II.1.1. Classifications

Notre étude s'est portée plus particulièrement sur le cobalt, le zinc et le cadmium mais *Ralstonia eutropha* CH34 présente des résistances à au moins 9 métaux : cobalt (Co), nickel (Ni), zinc (Zn), cadmium (Cd), plomb (Pb), mercure (Hg), thallium (Tl), cuivre (Cu) ainsi qu'aux chromates. Des études récentes ont révélé des résistances au gadolinium (Andrès *et al.*, 2000) et au sélénium (Roux *et al.*, 2001). Classés comme métalloïdes dans la classification de Mendeleiev, ils sont couramment trouvés sous le terme générique de « métaux lourds » dans la bibliographie. Cette première classification périodique classe les éléments par numéro atomique croissant, en fonction de leur structure électronique. Ainsi, les métaux cités font partie des métaux de transition. Ces éléments présentent au moins deux valences, mais le zinc, le cobalt et le cadmium sont stables à une électrovalence de 2.

Une seconde classification, basée sur la capacité de ces ions à se lier à des anions F^- , OH^- et d'autres anions oxygénés, est proposée par Ahrland *et al.*, en 1958 et modifiée par Pearson (1963). Cette classification a l'avantage d'appréhender l'affinité des métaux étudiés pour les bio-molécules.

Enfin, la classification de Nieboer et Richardson (1980), propose une classification basée sur l'affinité des ions pour un ligand. Ils sont répartis en trois classes : A, B et intermédiaires, suivant l'affinité de la liaison formée. La classe A regroupe les éléments formant des liaisons avec l'oxygène, ceux de la classe B forment des liaisons avec l'azote et le soufre. La classe intermédiaire, qui comprend les éléments pour lesquels *Ralstonia eutropha* CH34 présente des résistances, correspond aux éléments formant des liaisons avec l'oxygène, l'azote et le soufre. Il est à remarquer que cette classification distingue aussi les éléments en fonction de leur valence.

II.1.2. Propriétés et toxicité du cadmium, du cobalt et du zinc

a. Le cadmium (Cd)

Cet élément est principalement retrouvé dans les roches sédimentaires, riches en carbone, en sulfates et en phosphore. Sa mobilité dépend du pH : sa bio-disponibilité est accrue à pH alcalin. La présence de cet élément, très toxique, résulte essentiellement de l'épandage d'engrais phosphatés (80 % des apports), mais aussi de la métallurgie du fer et de l'acier, du trafic routier et de l'activité urbaine (Juste *et al.*, 1995).

Bien que les intoxications au cadmium soient en général liées à l'activité professionnelle, des intoxications alimentaires, directement liées à son caractère cumulatif existent (Boisset, 1996). La toxicité du cadmium est liée à sa capacité à inhiber l'accumulation du zinc sur ses sites de fixation protéique. Ce mécanisme est à l'origine de la perturbation de la biosynthèse nucléaire et protéique, et de la régulation de certains métabolismes cellulaires (Boisset, 1996). La localisation multiple des cibles du cadmium en font un néphrotoxique, un ostéotoxique, un cancérigène mais il agit également sur le système cardio-vasculaire et la reproduction (Viala, 1998 ; Boisset ; 1996).

b. Le cobalt (Co)

Ce métalloïde entre dans la composition de certaines peintures et laques, mais il est également utilisé comme pigment dans l'industrie de la poterie, de la céramique et du verre (Jensen et Tüchsen, 1990).

Le cobalt est essentiellement retrouvé dans les roches magmatiques (de 100 à 200 mg/kg de roche), mais aussi dans les roches sédimentaires (inférieur à 20 mg/kg de roche) et les roches acides (inférieur à 15 mg/kg de roche). L'altération des roches par action d'oxydants ou d'acides, libère le cobalt sous forme bivalente ou trivalente. Les chélateurs organiques sont très mobiles dans les sols, contrairement aux complexes formés avec des matières organiques. Toutefois, la norme AFNOR U44-041 ne l'a pas retenu comme métal à surveiller dans les sols et les stations d'épurations (Juste *et al.*, 1995).

Au niveau cellulaire, cet élément est nécessaire à la formation de vitamine B12. Cependant, à forte concentration, des tests *in vitro* ont révélé son action mutagène sur les chromosomes et les gènes des cellules végétales et animales (Beyersmann et Hartwig, 1992 ; Jensen et Tüchsen, 1990). La formation d'un gloïtre, consécutive à une diminution de l'activité thyroïdienne, a également été observée (Barceloux, 1999 ; Stevens *et al.*, 1998). Enfin, une augmentation du taux d'hémoglobine, des fibroses intestinales et des problèmes cardiaques ont pu être associés à l'industrie du cobalt et du tungstène (Barceloux, 1999).

c. Le zinc (Zn)

Il représente 0,0065 % de la croûte terrestre (Juste *et al.*, 1995). Il est essentiellement présent dans les roches magmatiques (entre 40 et 120 mg/kg), dans les roches argileuses et les schistes (entre 80 et 120 mg/kg). Dans les roches sédimentaires, il est souvent lié au cuivre, au fer ou au plomb. Sa mobilité le rend facilement absorbable par les végétaux (Juste *et al.*, 1995). Il est largement utilisé par l'industrie : il entre dans la composition d'alliages, dans la production de batteries, des gouttières ou de feuilles de toitures. Sa présence dans l'environnement est aussi liée à l'épandage, à l'activité urbaine et au trafic routier. Ses dérivés organiques sont des fongicides.

Cet élément est toxique par inhalation de fumées et de vapeurs, ses sels sont irritants et caustiques. Il est à l'origine de dermites par contacts prolongés, cependant aucune propriété cancérogène n'a été identifiée à ce jour (Viala, 1998). Toutefois, les sulfates de zinc ont des propriétés antiseptiques et les oxydes sont utilisés comme médicament topique (Viala, 1998).

II.2. Rappels sur la structure des enveloppes des bactéries à GRAM négatif

Les bactéries à GRAM négatif sont souvent impliquées dans les processus de dépollutions, car la complexité de leurs enveloppes externes et leur large distribution dans l'environnement leur permettent de s'adapter à des conditions environnementales extrêmes.

Les enveloppes des bactéries à Gram négatif sont constituées d'un espace périplasmique contenant le peptidoglycane (de 1 à 3 nm d'épaisseur) et entouré de deux membranes (figure 1) :

- la membrane externe en contact avec le milieu extracellulaire.
- la membrane cytoplasmique, orientée vers le milieu intracellulaire.

Certaines souches bactériennes possèdent en outre un glycocalyx qui protège la membrane externe du milieu extérieur (Prescott *et al.*, 1995).

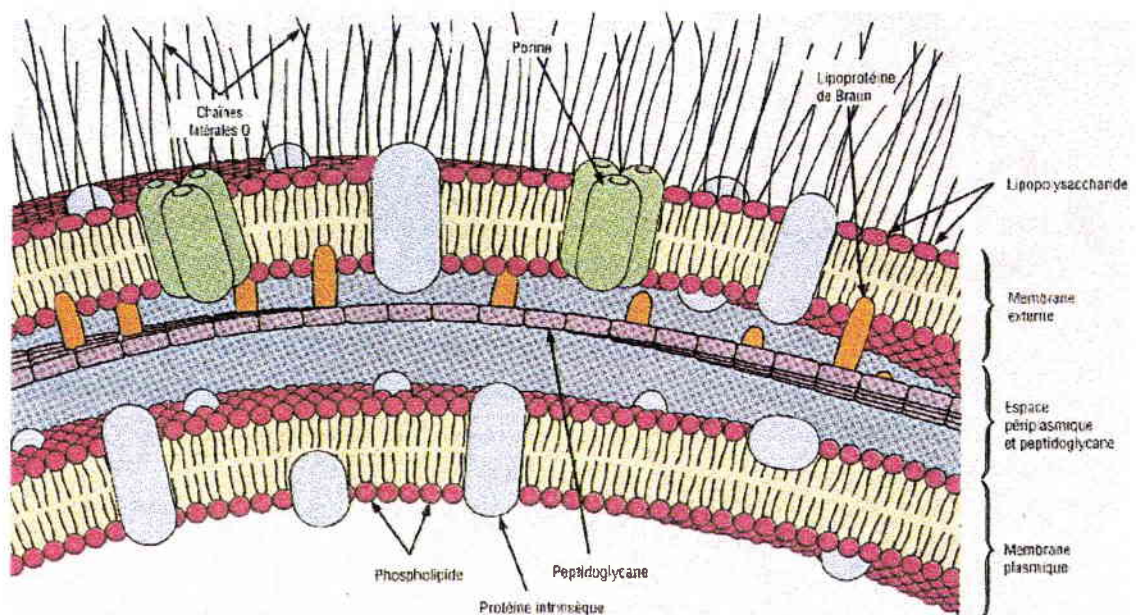


Figure 1 : Schématisation des enveloppes d'une bactérie à GRAM -, Prescott *et al.*, 1995.

II.2.1. Membrane externe

a. Composition

La membrane externe a un rôle de protection de la cellule mais elle constitue également un lieu d'échanges sélectifs entre la bactérie et son environnement (Beveridge *et al.*, 1981 ; Pelmont, 1993). Elle est constituée d'un double feuillet lipidique, composé principalement de lipopolysaccharides (ou LPS) sur la face externe et de phospholipides (PL) sur la face interne, dans lequel sont enchâssées diverses protéines (Figure 1).

Les lipopolysaccharides sont composés de trois régions :

- une partie lipidique appelée lipide A, essentiellement composée de glucosamines phosphorylées, auxquelles sont fixées des acides gras hydroxylés ;
- une partie centrale polysaccharidique, constituée de dix à quinze glucides (aldoheptoses et du 2-céto-3-déoxyoctanate (ou KDO)) ;
- l'antigène O, composé de trois à cinq glucides qui constituent la partie souple de la molécule (Sendra *et al.*, 1998).

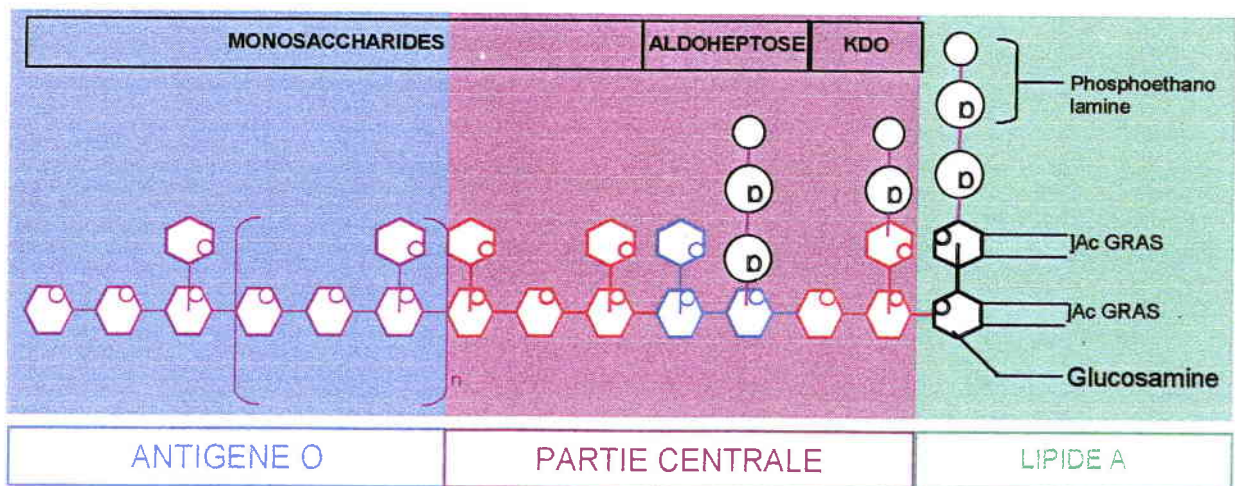


Figure 2 : schématisation de la structure d'un lipopolysaccharide bactérien (Stryer, 1981)

La membrane est composée, d'autre part, d'une à cinq protéines majeures (des porines et des protéines de Braun) et d'une cinquantaine de protéines, de

concentrations moins importantes. Les protéines majeures représentent 50 000 à 200 000 copies par cellules (Pelmont, 1993).

Les autres protéines de la membrane externe sont principalement des récepteurs plus ou moins spécifiques (Prescott *et al.*, 1995).

b. Rôle de la membrane externe

La membrane externe est un lieu d'échanges entre la cellule bactérienne et son milieu environnemental, mais elle intervient également dans le maintien de la structure cellulaire. En effet, les liens entre le peptidoglycane et la membrane externe (protéines de Braun, Omp A) sont à l'origine de la forme de la cellule.

Les LPS ont ici un rôle de barrière, filtrant les molécules hydrophobes. Les protéines de la membrane externe permettent l'entrée, le transport et l'excrétion des molécules nécessaires à la vie bactérienne. Ainsi, les **porines** peuvent être comparées à des « canaux », qui sont à l'origine du passage de petites molécules hydrophiles et d'ions (Exner *et al.*, 1995 ; Prescott *et al.*, 1995).

Les **protéines de Braun**, quant à elles, sont des lipoprotéines qui lient le peptidoglycane et la membrane externe.

La membrane externe contient également des **protéines réceptrices**, moins concentrées que les porines, mais intervenant dans plusieurs mécanismes :

- le passage actif d'éléments nutritifs (tel le fer), en réponse à un besoin cellulaire ;
- la conjugaison avec d'autres bactéries ;
- l'entrée de bactériophages et de colicines (Prescott *et al.*, 1995).

II.2.2. Le peptidoglycane

a. Composition

Le peptidoglycane se situe dans l'espace périplasmique, lié à la membrane externe par des ponts covalents. C'est une structure rigide, d'une épaisseur de 1 à 3 nm (chez les bactéries à GRAM négatif), qui maintient la forme de la cellule. Comme son nom l'indique, c'est une chaîne de polysaccharides (acide N-acétyl muramique

(NAM) et N-acétyl glucosamine (NAG)), croisés par l'intermédiaire de liaisons amines à des substituants térapeptidiques (figure 3). Cette structure transversale est caractéristique du peptidoglycane et lui confère ses propriétés.

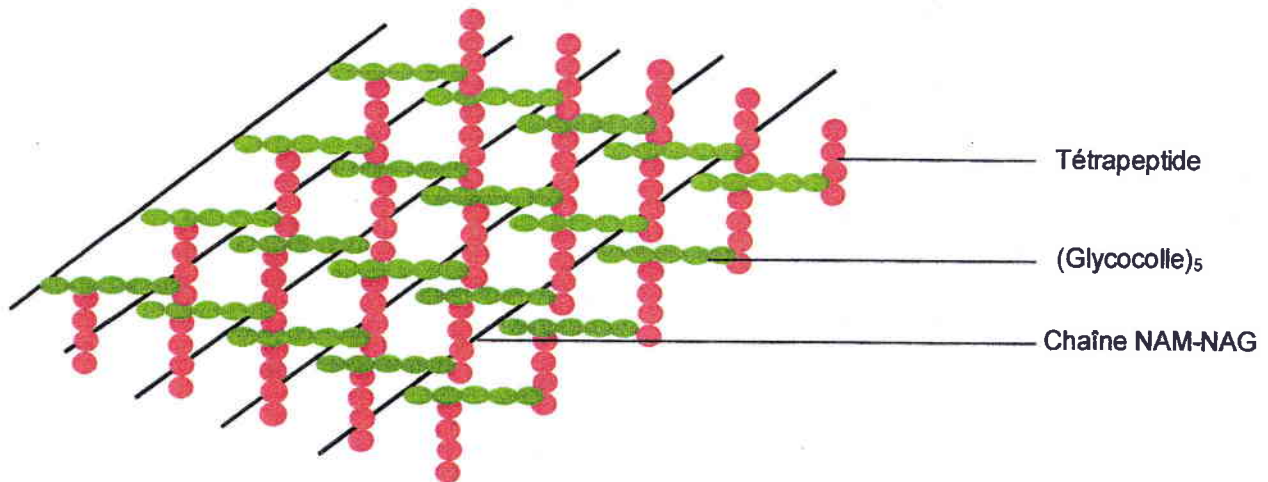


Figure 3 : Structure du peptidoglycane, d'après Pelmont, 1993.

b. Rôle

La structure particulière du peptidoglycane en fait une couche rigide, liée à la membrane externe, dont le principal rôle est de protéger la membrane cytoplasmique et la cellule, contre les pressions osmotiques rencontrées dans le milieu environnant la bactérie (Stryer, 1981 ; Pelmont, 1993).

II.2.3. Membrane cytoplasmique

a. Composition

Cette enveloppe est une bicouche phospholipidique, contenant des protéines, qui représentent 50% de son poids sec (Rogers *et al.*, 1980 ; Pelmont, 1993). Divers types de protéines se situent à ce niveau : des perméases, oxydases, réductases, ATPases, récepteurs, etc...

b. Rôle

La membrane cytoplasmique est, tout comme la membrane externe, un lieu d'échanges mais elle est également le siège de nombreux mécanismes métaboliques assurés par :

- des perméases, dont le rôle est d'offrir à la bactérie une perméabilité sélective vis-à-vis de son environnement (Williams, 1981) ;
- des ATPases et des pompes ioniques, qui permettent les échanges d'ions vers le milieu intra- ou extracellulaire contre un gradient de protons (Simoni et Postma, 1975) ;
- des oxydases, réductases et hydrogénases intervenant dans la chaîne respiratoire (Haddock et Jones, 1977) ;
- des protéines réceptrices, qui agissent tels des détecteurs de facteurs chimiques et physiques, à l'origine de la chimiotaxie, quand la bactérie est en carence d'éléments nutritifs .

La membrane cytoplasmique est également le lieu d'ancrage des flagelles (partie basale du flagelle). Certains éléments y sont synthétisés, tels des pigments ou des éléments constitutifs de la paroi (LPS, enzymes du peptidoglycane) (Rogers *et al.*, 1980 ; Prescott *et al.*, 1995).

II.3. Ralstonia eutropha CH34

Deux propriétés de *Ralstonia eutropha* CH34 sont particulièrement exploitées pour la remédiation de certains métaux toxiques dans les sols et l'eau : la capacité de bio-précipiter des métaux et la synthèse de polymères, due à la diversité des sources de carbone assimilables par cette souche (Springael *et al.*, 1993 ; David *et al.*, 1996).

Cette souche est utilisée comme bio-senseur de pollution des écosystèmes par le nickel (jusqu'à 0,1 µM détecté) ou le cobalt (jusqu'à 9 µM détectés), en clonant les gènes lux CDABE aux gènes cnr de *Ralstonia eutropha* CH34 (Tibarzawa *et al.*, 2001).

L'excrétion des métaux, par la bactérie, induit une alcalinisation du milieu environnant la cellule. Ces métaux se lient alors au dioxyde de carbone issu du métabolisme cellulaire, et forme une zone concentrée de cristaux de carbonates de métaux à la périphérie extracellulaire (Collard *et al.*, 1994). Ce mécanisme a été utilisé pour la dépollution des eaux usées en métaux lourds. Leur élimination est alors basée sur une technique de séparation qui offre un faible rendement quand leur concentration est trop grande (Diels *et al.*, 1995). Ces bactéries ont aussi été fixées sur des bio-membranes au sein de réacteurs, sur lesquelles les eaux usées sont filtrées (Collard *et al.*, 1994). Les cristaux formés sont alors capturés sur un lit de verre (Diels *et al.*, 1995). Les tests réalisés ont permis de dépolluer des effluents industriels et synthétiques en zinc ou en cuivre d'un facteur 20, la concentration finale étant inférieure à 1 ppb. De plus, Diels *et al.*, en 1995, a couplé à cette dépollution inorganique une dépollution de molécules organiques actives, en introduisant la souche *Ralstonia eutropha* AE1308, dont le métabolisme permet la transformation du 3-chlorobenzoate et de l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique en dioxyde de carbone, eau et molécules de chlore.

II.3.1. Origine

Cette souche bactérienne a été découverte dans la région de Liège, dans un bassin de décantation d'une industrie du zinc, par Houba en 1976 (Mergeay *et al.*, 1985). Des prélèvements de sédiments ont montré que ces bassins contenaient jusqu'à 10000 ppm de zinc (Diels et Mergeay, 1990). Des souches résistantes au

zinc, au cobalt et au fer ont également été isolées au Zaïre et dans d'autres régions belges, ainsi qu'en Allemagne (Stoppel et Schlegel., 1995).

Elle a pour particularité la présence de deux hydrogénases:

- l'une soluble, située dans le cytoplasme, réduisant le NADH en NAD et H₂ (Schneider et Schlegel, 1976) ;
- l'autre au sein de la membrane cytoplasmique, intervenant dans la production d'énergie, au cours de la croissance autotrophique (Schink et Schlegel, 1979).

Ces deux hydrogénases ont permis de classer cette bactérie dans le genre *Alcaligenes eutrophus*, appartenant au groupe des β -protéobactéries (Faellen *et al.*, 1993), qui comprend les genres : *Alcaligenes eutrophus*, *Burkholderia solaraceaum* et *Burkholderia picketti* (Kerstens et De Ley, 1984).

Une reclassification, basée sur leur séquence ADNr 16s, la classe comme *Ralstonia eutropha* (Yabuuchi *et al.*, 1995). Récemment, cette souche a été renommé *Ralstonia metallidurans* (Goris *et al.*, 2001).

II.3.2. Caractéristiques macroscopiques et biochimiques

Au microscope optique, après coloration de Gram, les bactéries apparaissent comme :

- GRAM négatif,
- petits bâtonnets d'environ 0,5 μ m de diamètre et 0,9 μ m de long

Une observation sur un milieu nutritif TRIS-Gluconate, pH=7,00, contenant 5 mM de nickel et incubé trois jours à 30°C, met en évidence des colonies arrondies, opaques, légèrement rose-crème (Mergeay *et al.*, 1985).

De plus, ces bactéries sont mobiles (de 1 à 4 flagelles péritriches) et possèdent un métabolisme **chimolithotrophe facultatif** (Sadouk et Mergeay, 1993 ; Nies et Silver, 1989) : elles sont donc capables de ne pousser qu'en présence de CO₂ comme source de carbone et H₂ comme source d'électrons.

Les principales sources de carbone utilisées sont :

- gluconate, pyruvate, acétate, benzoate, glycérol, n-butanol, n-propanol ;

- histidine, tryptophane, proline, glycine, tyrosine, alanine, glutamate, phénylalanine

Par contre, le fructose, et plus généralement la famille des carbonates, ne sont pas assimilables par *Ralstonia eutropha* (Sadouk et Mergeay, 1993).

Le caractère de "chimolithotrophie" est porté par le chromosome chez CH34, alors qu'il est porté par un mégaplasme de 400 kb chez d'autres souches de *Ralstonia eutropha* (Mergeay *et al.*, 1985).

II.3.3. Génétique et systèmes de résistances aux métaux lourds

Ralstonia eutropha CH34 est une bactérie du sol, dont la principale particularité est la présence de systèmes de résistance à au moins neuf métaux : Zn, Co, Cd, Ni, Hg, Pb, Tl, Cu, et chromates. Ces résistances sont portées par deux mégaplasmes (pMOL28 et pMOL30) et des transposons (Tn 4378, Tn 4380).

La résistance aux métaux se traduit par plusieurs mécanismes cellulaires : leur fixation, leur précipitation, leur volatilisation ou encore leur excrétion dans le milieu extracellulaire (Siddiqui et Schlegel, 1987 ; Andrès *et al.*, 2000).

pMOL30 porte l'opéron *czc*, qui compose le système de résistance aux cobalt, zinc et cadmium, inductible à 20 mM, 12 mM et 2,5 mM respectivement (Mergeay *et al.*, 1985).

pMOL28 porte l'opéron *cnr*, codant pour un système comparable à *czc*, qui étend la résistance au nickel et au cobalt. Le système de résistance est inductible jusqu'à 3 mM pour le nickel et 5 mM pour le cobalt (Peitzsch *et al.*, 1998).

Ces deux systèmes sont basés sur une pompe, située dans les enveloppes bactériennes et qui permet l'excrétion des cations bivalents contre un gradient de protons (Nies, 1992a, 1995 et 1999 ; Braun et Killman, 1999).

a. Génétique du système *czc*

Le mégaplasme pMOL30 contient notamment l'opéron *czc*, composé de huit sous-unités : *czc A*, *czc B*, *czc C*, *czc D* (codant pour les protéines constitutives de ce système d'expulsion) et *czc I*, *czc N*, *czc R*, *czc S* (codant pour des protéines régulatrices du système). Cet ensemble de protéines constitue un système de

résistance à trois métaux lourds bivalents: Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} (Nies, 1992a et 1992b ; Van Der Lelie *et al.*, 1997).

La séquence ADN de chacun des gènes composant le système *czc*, a été détaillée par plusieurs études (figure 4). Diels *et al.*, en 1995, ont déterminé le schéma général de pMOL30, et Kunito *et al.* (1996) précisent la taille des protéines :

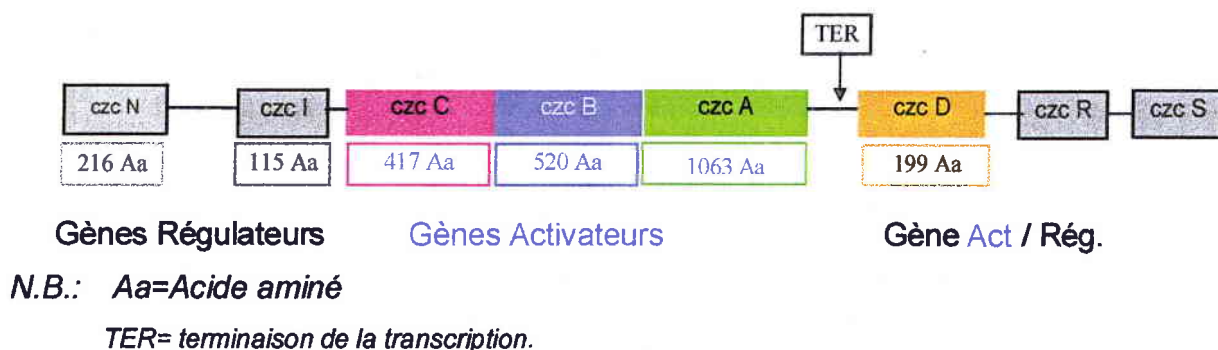


Figure 4 : Schématisation de pMOL30 et taille des protéines (Diels *et al.*, 1995 ; Kunito *et al.*, 1996)

b. Localisation et poids moléculaire des protéines composant le système *czc*

- Au niveau de la membrane externe : **Czc C** (deux sous-unités d'environ 40 kDa, Große *et al.*, 1999)
- Au niveau du peptidoglycane : **Czc A** (120 kDa, Nies et Silver, 1989) & **Czc B** (66 kDa, Nies et Silver, 1989)
- Au niveau de la membrane cytoplasmique : **parties d'ancrage de Czc A, Czc B et Czc D**

Ainsi, au minimum quatre protéines interviendraient dans le système de transport *czc*, mais il est aussi constitué de protéines de régulation : **Czc R** (environ 41 kDa, Nies, 1992b), **Czc S** ainsi que **Czc I** (10 kDa) et **Czc N** (27 à 30 kDa), dont la localisation n'est pas complètement définie à ce jour (Große *et al.*, 1999).

c. Mécanisme d'expulsion des métaux

Czc A : **centre de la pompe cations / protons**, elle serait formée de 2 canaux traversant le périplasme et de douze hélices transmembranaires, localisées dans la

membrane cytoplasmique. Seule, cette protéine permet également le transport des cations, à faible concentration (diffusion par l'un des canaux). Le second canal permettrait le transport des protons qui activent cette pompe (Goldberg *et al.*, 1999).

Czc B : la protéine codée par ce gène appartient à une famille de protéines de fusion membranaire (Silver et Phung, 1996). Czc B est ancrée dans la membrane cytoplasmique de la bactérie et traverse le périplasme, jusqu'à la membrane externe. La séquence de ce gène présente des homologies avec celle du gène codant pour la calphotine, protéine qui permet l'absorption de Ca^{2+} . (Rensing *et al.*, 1997 ; Taghavi *et al.*, 1997).

Cette protéine facilite le passage d'ions à travers la double membrane (sans perte au niveau du périplasme).

Czc C : le gène codant pour cette protéine présente des séquences homologues à des gènes codant pour une famille de protéines de la membrane externe (Outer Membrane Factor) qui interviendraient dans les systèmes de transport (Dong et Mergeay, 1994 ; Silver et Phung, 1996).

Par analogie fonctionnelle, le rôle de Czc C serait de compléter le système d'expulsion de ces métaux, en permettant leur sortie dans le milieu extracellulaire. Liée à Czc B, le rôle de ce complexe protéique serait de dissocier le complexe formé par Czc A et le cation bivalent (Rensing *et al.*, 1997).

Czc D : protéine de la famille des Facilitateurs de Diffusion de Cations, elle présente entre 4 et 6 hélices ancrées dans la membrane cytoplasmique et une partie cytoplasmique (Anton *et al.*, 1999).

Seule, elle offre une résistance faible aux Cd, Zn et Co, comparable à celle obtenue avec Czc A. Cependant, cette protéine est également un répresseur du système *czc* (Anton *et al.*, 1999).

Une séquence de fin de transcription, indépendante du système de régulation *czc*, a été déterminée entre Czc A et Czc D. Ceci laisse supposer que *czc D* n'est pas co-transcrit avec *czc ABC* (Große *et al.*, 1999).

d. Régulation du système czc

Le système est également composé de protéines régulatrices (Taghavi *et al.*, 1997 ; Große *et al.*, 1999) :

- en aval de *czc* CBAD, deux gènes codant respectivement les protéines Czc R et Czc S :

Czc R : régulateur

Czc S : histine sensor

Ainsi, Czc R et Czc S couplés permettraient de réguler Czc N.

- en amont de *czc* CBAD, deux gènes *czc* N et *czc* I :

Czc N : est très proche structurellement du gène *ncc* N, qui est impliqué dans la résistance à Ni^{2+} . La protéine Czc N pourrait être une protéine transmembranaire.

Czc I : Czc I interviendrait comme régulateur du système d'expulsion *czc*.

D'autre part, Czc N et Czc I interviendraient dans la régulation d'un éventuel facteur sigma, non identifié actuellement (Anton *et al.*, 1999).

e. Génétique du système cnr

pMOL28, le second plasmide de *Ralstonia eutropha* CH34, porte un transposon de résistance au mercure de 8,9 Kb : Tn 4378 (Diels *et al.*, 1985). Il est aussi impliqué dans la réponse au Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ti^{2+} et Zn^{2+} (Liesegang *et al.*, 1993 ; Diels *et al.*, 1995).

Le comportement de *Ralstonia eutropha* CH34 vis-à-vis du nickel, comme pour d'autres métaux, est fonction de sa concentration. Ainsi, le nickel, à faible concentration, intervient comme co-facteur dans divers mécanismes enzymatiques (pour les hydrogénases ou les enzymes de déformylation, par exemple). Chez *Ralstonia eutropha* CH34, le transport du nickel serait assuré par un système uniport, mais il emprunte également le système de transport du magnésium ou encore des systèmes ATP-ases (Eitinger et Mandrand-Berthelot, 2000).

Plusieurs mécanismes sont développés afin de conserver un équilibre nécessaire à la survie la bactérie (Eitinger et Mandrand-Berthelot, 2000). *Ralstonia eutropha*

CH34 développe alors un système de résistance au nickel et au cobalt, comparable au système *czc*, porté par le mégaplasme pMOL28 (Figure 5).

Le mégaplasme pMOL28 contient une série de gènes *cnr* A, *cnr* B, *cnr* C, ayant une forte identité (> 28%) avec les gènes de *czc* du plasmide pMOL30 (Sensfuss et Schlegel, 1988 ; Liesegang *et al.*, 1993 ; Dong et Mergeay, 1994). Les résistances portées par ce plasmide sont : Co^{2+} , Ni^{2+} mais également Zn^{2+} par mutation, ainsi que le transposon Tn4380, de 9,1 Kb, impliqué dans la résistance au mercure (Diels *et al.*, 1985).

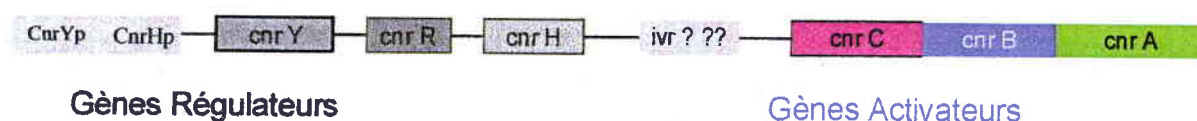


Figure 5 : Schématisation de pMOL 28, Grass *et al.*, 2000.

Les différences entre les systèmes de résistances *czc* et *cnr* résident dans leur régulation. Ainsi, trois protéines interviennent dans la régulation du système *cnr* : *Cnr* Y, *Cnr* X, *Cnr* H, dont les gènes sont en amont de *cnr* C, *cnr* B, *cnr* A (figure 5). De plus, deux séquences promotrices se trouvent en amont des gènes de régulation : *cnr* Hp et *cnr* Yp. Le premier de ces sites induirait la transcription des gènes *cnr* C, B, A, l'expression du second site serait inductible par les métaux depuis *cnr* Hp (Tibarzawa *et al.*, 2000).

f. Régulation du système *cnr*

Cnr Y : cette protéine de 10,7 kDa présente sa partie C-terminale dans le périplasme, mais se situerait au niveau de la membrane cytoplasmique (Tibarzawa *et al.*, 2000).

Cnr X : cette protéine périplasmique de 16,5 kDa présente 37,5 % d'hélices α et 21,4 % de feuillets β (Grass *et al.*, 2000). Sa partie C-terminale se situe dans le périplasme tandis que sa partie N-terminale, très hydrophobe de par la présence de six histidines, serait le site de liaison du nickel, voire du cobalt (Grass *et al.*, 2000).

Cnr H : cette protéine cytoplasmique de 21 kDa, possède une partie C-terminale avec une configuration hélice/tour/hélice et présente 40 % d'hélices α . Elle fait partie de la famille des ECF σ^{70} (Grass *et al.*, 2000).

Inactives, Cnr X, Cnr Y et Cnr H formeraient un complexe. Le nickel, présent dans le périplasme, se lierait à la protéine Cnr X (rôle de « capteur » de métal) qui change alors de configuration. Ceci entraîne une dissociation de Cnr Y (rôle de répresseur anti-sigma) et Cnr H au niveau N-terminale de cette dernière. Cnr H se lierait alors à la polymérase, ce qui arrêterait la transcription de *cnr C*, *B*, *A* depuis *cnr Hp* (Grass *et al.*, 2000).

II.3.4. Souches dérivées de *Ralstonia eutropha* CH34 : *Ralstonia eutropha* 1153 et *Ralstonia eutropha* 104

Deux souches dérivées de *Ralstonia eutropha* CH34 ont été utilisées pour cette étude :

- a. *Ralstonia eutropha* 1153 : cette souche, génétiquement modifiée, surexprime le sidérophore (Gilis *et al.*, 1998) ; elle constitue le témoin positif des deux systèmes (de fer et *czc*).
- b. *Ralstonia eutropha* 104 : cette souche est dépourvue des deux mégaplasmidés (Mergeay *et al.*, 1985 ; Dressler *et al.*, 1991 ; De Rore *et al.*, 1994) ; elle constitue le témoin négatif pour le système *czc*.

II.4. Un système de transport du fer, assuré par un ligand spécifique : le sidérophore

Le fer, qui intervient dans de nombreux mécanismes cellulaires, est un élément essentiel à la survie bactérienne : il intervient notamment au niveau de la phosphorylation oxydative (chaîne respiratoire), ou encore dans la synthèse de déoxyribonucléotide (rôle de catalyseur). Utilisé à l'état d'élément trace chez les bactéries mais également par la plupart des cellules eucaryotes et procaryotes, une quantité minimale de 10^{-9} M est nécessaire à la survie de la cellule (Pelmont, 1993). Le tableau ci-dessous détaille quelques utilisations du fer chez les microorganismes :

Tableau II : Exemple de protéines bactériennes, contenant le fer (Pelmont, 1993 ; Sauvage, 1995)

Type Protéique	Fonction
Ferritine	Protéines de Stockage
Cytochrome	Transport respiratoire
Flavocytochrome	Enzyme d'oxydo-réduction
Flavoprotéines diverses	Enzyme d'oxydo-réduction et de transport
Cytochrome P 450	Mono-oxygénases (hydrolases)
Catalase, Peroxydase	Oxydation, élimination des peroxydes
Superoxyde dismutase	Élimination des radicaux superoxydes
Mono Oxygénase non héminique	Hydroxylation, o-déméthylation
Ferredoxine, Rubredoxine	Transport d'électrons
Hydrogénase, Protéine Fer/soufre	Transport d'électrons, métabolisme de H ₂
Rubéonucléotide réductase	Synthèse de déoxyribonucléotides
Alcool Déshydrogénase à fer	Certaines déshydrogénases
Aconitate hydratase	Cycle de Krebs, conversion citrate-isocitrate

Le fer existe sous deux formes : réduite : Fe II (fer ferreux) ou oxydée : Fe III (fer ferrique).

En milieu aérobie, le fer se trouve essentiellement à l'état oxydé, sous forme d'oxydes et d'hydroxydes ferriques, composés très insolubles, ce qui rend son absorption difficile (Neilands, 1981 ; Crosa, 1989 ; Guerinot, 1994). Ainsi, à pH=7,00, sa solubilité n'est que de 10^{-17} M alors qu'une concentration de 10^{-8} à 10^{-6} M est nécessaire à une croissance bactérienne optimale (Guerinot, 1994). S'il constitue un élément abondant dans la croûte terrestre (il représente 5 % des éléments majeurs), sa biodisponibilité est faible et les micro-organismes ont dû développer des systèmes efficaces de captation et d'internalisation du fer (Neilands, 1981 ; Crosa, 1989 ; Pelmont, 1993).

Au niveau de la cellule bactérienne, il existe trois systèmes d'acquisition de cet élément :

- Chélation : de petites molécules organiques de 500 à 1500 Da sont synthétisées par la cellule et excrétées à la périphérie extracellulaire, dans le milieu, afin de capter le fer : ce sont des sidérophores. Ces ligands présentent une forte affinité pour le fer ferrique et facilitent donc sa solubilisation et son transport (Neilands, 1981 ; Crosa, 1989). La production du sidérophore et de son transporteur est fonction de la disponibilité en fer (Guerinot, 1994).
- Acquisition à partir d'un hôte : certaines bactéries pathogènes captent le fer lié à des protéines de l'hôte infecté (comme par exemple à partir de l'hémoglobine ou de la lactoferrine) (Thulasiraman *et al.*, 1998 ; Stojiljkovic et Srinivasan, 1997 ; Prescott *et al.*, 1995)
- Fer ferreux : certaines souches bactériennes, comme *Escherichia coli* (Kammler *et al.*, 1993), *Streptococcus* spp (Evans *et al.*, 1986), *Pseudomonas aeruginosa* (Vasil et Ochsner, 1999), ou *Listeria monocytogenes* (Coulanges *et al.*, 1997), transportent le fer sous forme réduite, en milieu anaérobie ou à pH acide.

II.4.1. Mécanisme(s) de liaison du fer au sidérophore

Le fer se lie au sidérophore au niveau des groupements chimiques de types : hydroxamates, catécholates ou phénolates, citrates (figure 6).

Certaines bactéries, comme les *pseudomonades*, synthétisent un pigment fluorescent jaune – vert : la pyoverdine, dont l'expression est conditionnée par le manque de fer et qui forme une liaison de forte affinité avec le fer (Meyer, 2000). Les pyoverdines sont composées d'un dérivé chromophore commun (2,3-diamino 6,7-dihydroxyquinoline) qui correspondrait au site de fixation du fer III (Poole *et al.*, 1993), une chaîne acyl reliée à la partie N-terminale du chromophore et une chaîne peptidique variable reliée à la partie C-terminale du chromophore (Meyer, 2000).

Dans le cas de *Ralstonia eutropha* CH34, un des sidérophores identifiés, **Alcaligine E**, d'un poids moléculaire de 1470 Da, fixerait le fer par un groupement de type **phénolate** (Gilis *et al.*, 1996).

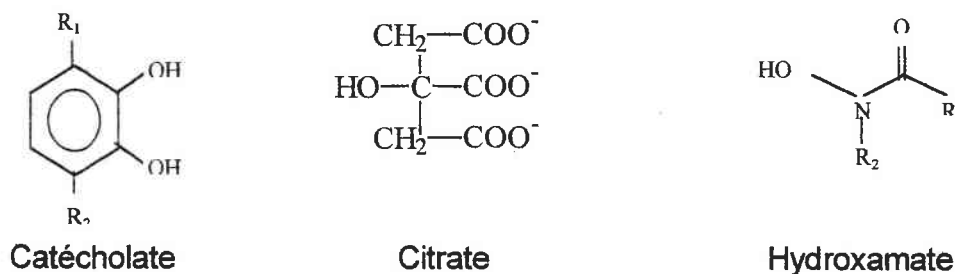


Figure 6 : groupements contenus dans les différents types de sidérophores

Concernant les sidérophores de type phénolate, le seul connu était la **Pyocheline**, sidérophore synthétisé par *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Burkholderia cepacia* (Namiranian *et al.*, 1997 ; Ankenbauer et Quan, 1994).

Cependant, d'autres souches bactériennes pathogènes produisent des sidérophores de type phénolate. Ainsi, nous pouvons citer l'**Enterobactine** et l'**Enterocheline**, produits par plusieurs souches de *Salmonella* (Visca *et al.*, 1992 ;

Lopez *et al.*, 1996), la **Vibriobactine**, synthétisé par *Vibrio cholerae* (Stoebner *et al.*, 1992 ; Sigel et Payne, 1982), la **Yersiniabactine** produit par *Yersinia enterocolitica* (Chambers *et al.*, 1996 ; Haag *et al.*, 1993) et l'**Amonobactine**, synthétisé par la souche *Aeromonas hydrophila* (Massad *et al.*, 1991).

Par contre, des tests de fixation réalisés par Gilis en 1996 ont montré que certaines souches de *Ralstonia eutropha* pouvaient capter et transporter le fer par l'intermédiaire d'autres types de sidérophores d'origine bactérienne ou fongique et dont le groupement de fixation n'est pas un phénolate.

En effet, les **Desferriferrioxamine B** et **E**, l'**Ornibactine**, le **Deferrichrysine** et le **Desferriferrirocine** ont permis l'incorporation du fer chez *Ralstonia eutropha* 1152 (souche qui ne peut synthétiser de sidérophores).

Toutefois, il ne peut être transporté par la **Pyocheline**, phénolate dont la structure se rapproche le plus d'**Alcaligine E**, ni par l'**Enterobactine**, la **Pyoverdine** ou le **Cepabactine**. Cette observation pourrait trouver une explication dans l'existence d'un autre sidérophore, synthétisé par *Ralstonia eutropha*. En effet, un autre sidérophore, de type citrate a été purifié et identifié chez *Ralstonia eutropha* 1153, souche dérivée de *Ralstonia eutropha* CH34, qui surexprime la production du sidérophore (Münzinger *et al.*, 1999) : la **Staphyloferrine B**.

De plus, la plupart des souches bactériennes produisent au moins deux sidérophores de nature différente. Les plus étudiés sont l'**Enterobactine** (phénolate) et l'**Aérobactine** (hydroxamate) produits par *Escherichia coli* (Mignini *et al.*, 1994) ainsi que la **Pyocheline** (phénolate) et la **Pyoverdine** (catécholate ; hydroxamate) synthétisés par *Pseudomonas aeruginosa* (Meyer, 2000 ; Schalk *et al.*, 1999 ; Guerinot, 1994). Enfin, de nombreuses études révèlent non pas une mais plusieurs protéines exprimées, dans la membrane externe en carence de fer, pour les souches bactériennes synthétisant plusieurs sidérophores.

Le fer III présente une grande affinité pour le sidérophore auquel il se lie ; cette liaison serait stœchiométrique et dépend donc de la structure chimique du sidérophore (Münzinger *et al.*, 1999 ; Namiranian *et al.*, 1997). Thulasiramann *et al.*, suggère en 1998, que le mécanisme de fixation du complexe sidérophore - fer à son récepteur n'est pas stœchiométrique mais sigmoïdale.

II.4.2. Mécanisme de transport du complexe sidérophore-fer chez *Ralstonia eutropha* CH34

Les complexes sidérophore-fer ainsi formés se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques dans la membrane externe pour passer dans le périplasma et la membrane cytoplasmique avant d'entrer dans le cytoplasme (Figure 7).

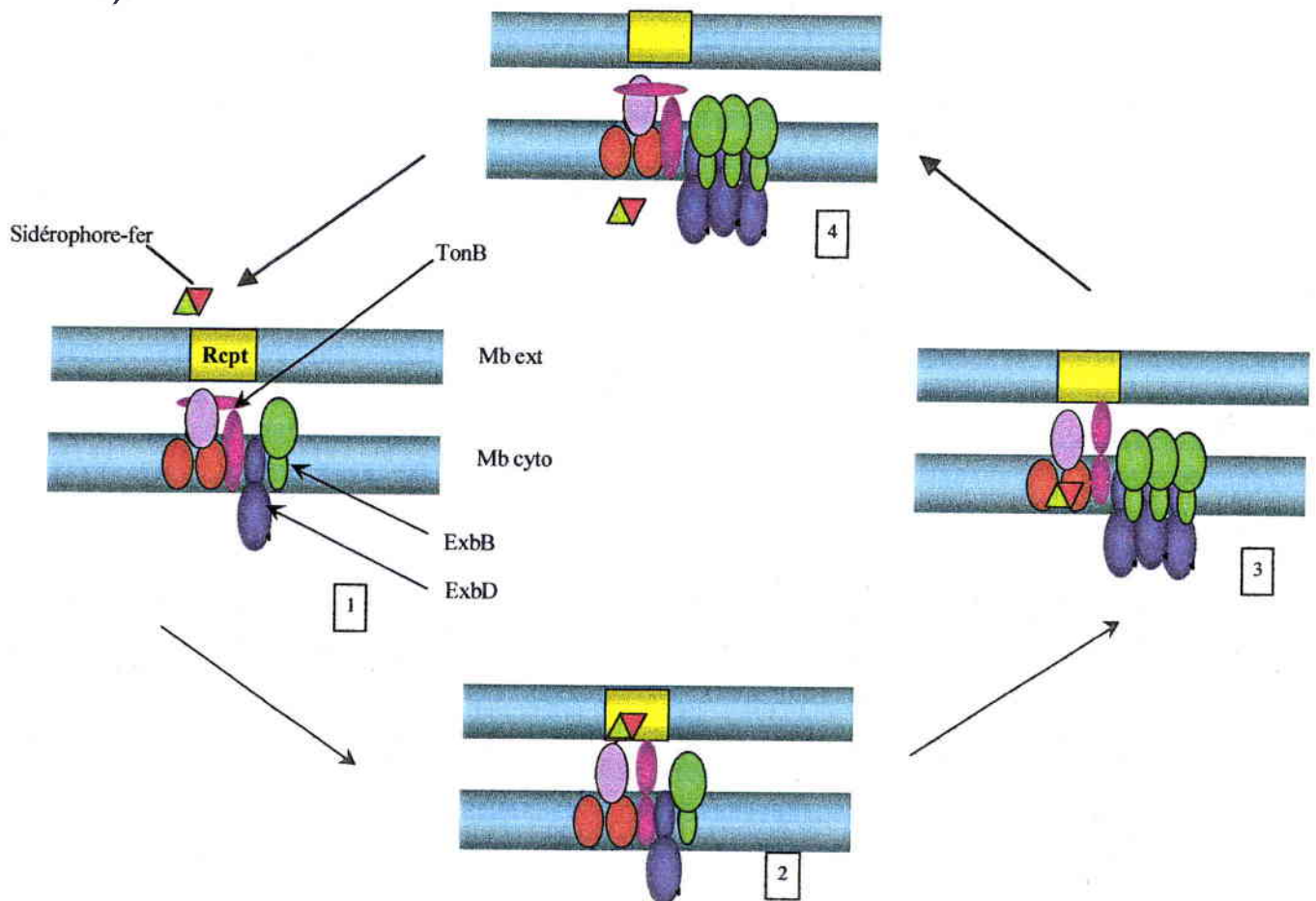


Figure 7 : Schématisation du transport de fer chez *Ralstonia eutropha*, d'après Postle, 1999.

N.B : Ce schéma représente les composantes (en jaune le récepteur sidérophore-fer, TonB, ExbB, ExbD, les protéines du système de type ABC) et les principales étapes du transport de fer détaillées ci-après.

Le système de transport du fer chez toutes les bactéries étudiées fait intervenir quatre composantes protéiques :

- au moins une protéine de la membrane externe, récepteur spécifique du complexe sidérophore-fer ;
- une protéine périplasmique, qui permet le passage du complexe jusqu'à la membrane cytoplasmique (cette protéine a été identifiée comme étant FhuA chez *E.coli*) ;
- deux protéines de la membrane cytoplasmique, qui permettent la libération du fer dans la cellule. Le transport du fer à ce niveau serait lié à une ATP-ase (Stintzi *et al.*, 2000). En effet, une protéine de 84 kDa contenant un motif ATP-ase a été identifiée chez *Escherichia coli* (Braun et Killman, 1999).

Le transport du complexe sidérophore-fer à travers la membrane externe nécessite de l'énergie. Ainsi, à ces trois composantes de transfert s'ajoute une composante de couplage d'énergie. C'est le rôle de la protéine TonB, qui couple le potentiel électrique produit au niveau de la membrane cytoplasmique et le transport du fer du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Postle, 1990 ; Ahmer *et al.*, 1995 ; Higgs *et al.*, 1998) (étape 1).

Pour se faire, cette protéine ancrée dans la membrane cytoplasmique, s'étendrait jusqu'à la membrane externe (étape 2) (Postle, 1999). La fixation de TonB sur le récepteur entraîne une modification de sa configuration, ce qui diminue l'affinité du récepteur pour le complexe sidérophore fer et permet sa libération dans le périplasme. Ce mécanisme a été largement étudié chez *Escherichia coli* :

- la protéine périplasmique, FhuD, serait constituée de deux domaines globulaires, reliés par une chaîne peptidique souple (Koster et Braun, 1990 ; Rohrbach *et al.*, 1995). Cette protéine présente une affinité pour le complexe sidérophore –fer moins grande que le récepteur FhuA, ce qui pourrait permettre le passage d'autres sidérophores de type hydroxamate (Koster et Braun, 1990).
- cette protéine périplasmique s'intègre dans un système de transport de type ABC (ATP Binding Cassette), également composé de deux protéines de la membrane cytoplasmique (Fath et Kolter, 1993) :

- ces deux protéines (FhuB et FhuC chez *Escherichia coli*) ont pour rôle de reconnaître le complexe sidérophore – fer et de le transporter, à travers la membrane cytoplasmique. C'est l'hydrolyse de l'ATP qui permet ce transport (Guerinot, 1994).

ExbB et ExbD interviendraient dans la régulation du système, par action sur TonB, suivant leur configuration (trimérique ou dimérique) (figure 7, étapes 3-4).

TonB joue également un rôle dans la régulation de l'absorption du fer, aidée des protéines ExbB et ExbD, qui permettent son recyclage (Guerinot, 1994). Plusieurs hypothèses ont été proposées quant au fonctionnement de TonB, basée sur une analyse cristallographique de cette protéine (Postle, 1999 ; Chang *et al.*, 2001).

Cependant, certaines incertitudes subsistent concernant ce modèle ; en effet, un des sidérophores produits par *Ralstonia eutropha* CH34, Alcaligine E n'a pas été totalement purifié (Gillis *et al.*, 1996) ; l'existence d'un ou plusieurs sidérophores produits par cette souche n'a pas été complètement établie.

D'autres observations réalisées sur *Ralstonia eutropha* et d'autres bactéries, laissent prévoir l'existence d'un possible lien entre les systèmes de transport des métaux et celui du fer. Par exemple, Gillis *et al.*, en 1998, met en évidence que le cadmium peut aussi se lier au sidérophore pour entrer dans la cellule ; Namiranian *et al.*, en 1997, montrent chez *Pseudomonas aeruginosa* que la pyocheline, est capable de fixer le zinc. Visca *et al.*, ont montré, auparavant, l'affinité significative de ce sidérophore pour des métaux de transitions comme le cuivre, le cobalt, le nickel et le molybdate, ainsi que leur influence sur la régulation de sa synthèse (Visca *et al.*, 1992)

II.4.3. Libération du fer dans le cytoplasme et stockage

Le fer intervient directement dans divers métabolismes cellulaires (cytochromes par exemple). Il doit être séparé de son ligand (le sidérophore) pour être utilisé. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour cette étape (Crosa, 1989) :

Le fer III serait réduit au niveau de la membrane cytoplasmique, ce qui diminue l'affinité du ligand et permet la dissociation du complexe. Une seconde hypothèse suggère que des protéines, telles les flavoprotéines (flavines ou riboflavines) réduites,

transféreraient un électron au fer pour le réduire (Fontecave *et al.*, 1994).

Cependant, le fer peut être à l'origine de réactions chimiques toxiques, pouvant entraîner la mort cellulaire. Il intervient notamment dans la réaction de Fenton, à l'origine de la production d'ions superoxydes (Braun et Killmann, 1999 ; Briat et Lebrun, 1999). Pour empêcher l'action toxique du fer, (bien que les bactéries du sol soient rarement en excès de fer), il est stocké sous forme non libre, probablement par l'intermédiaire de ferritines (Neilands, 1981 ; Briat, 1992). Toutefois, le système le plus efficace pour limiter les effets toxiques du fer est le contrôle de sa concentration cellulaire.

II.4.4. Régulation du système de transport du fer

a. Régulation par la protéine Fur

Le gène *fur* (*ferric uptake regulation*) codant, pour la protéine Fur, a été identifié chez de nombreuses bactéries à GRAM négatif et GRAM positif (Hantke, 2001). Ce gène semble avoir plusieurs rôles selon la souche bactérienne concernée. Par exemple, près de 90 gènes issus de diverses souches d'*Escherichia coli* semblent être régulés par Fur et le fer (Hantke, 2001). Cette protéine, en présence de fer ferreux comme co-facteur, se fixe sur l'ADN par sa partie N-terminale, ce qui stoppe la transcription (Coy et Neilands, 1991 ; Braun et Killmann, 1999). Cette régulation est arrêtée par le manque de fer II au sein de la cellule bactérienne.

Des études récentes tendent à démontrer que cette protéine de régulation nécessite d'autres métaux que le fer pour être activée. Ainsi, elle présente un second site de fixation pour le zinc (Althaus *et al.*, 1999 ; Hantke, 2001).

b. Régulation positive

Des régulations positives se superposent à la régulation par Fur. La mieux étudiée est le système FecR–FecI, parfaitement identifiées chez *Escherichia coli* (Braun et Killmann, 1999) :

Ces deux gènes, sont en amont des gènes de transport du fer. Ce système d'initiation de la transcription nécessite la présence du récepteur (FecA) et du

complexe TonB, ExbB, ExbD (Killmann, 1993). Le complexe sidérophore-fer se lie au récepteur FecA, qui transmet un signal à FecR, par l'intermédiaire de TonB.

FecR, active FecI, protéine cytoplasmique, qui forme un complexe avec une RNA polymérase et l'ensemble se lie au promoteur de FecA, ce qui active sa transcription (Angerer *et al.*, 1995 ; Braun et Killmann, 1999).

Pour identifier les protéines des systèmes de transport du fer et *czc* chez *Ralstonia eutropha* CH34 et mettre en évidence un lien éventuel entre les deux, chacune des enveloppes doit être isolée. Les protéines qui les composent doivent être purifiées ; leur identification se fera par des méthodes biochimiques et immunologiques (avec des anticorps mono- et polyclonaux).

II.5. Techniques de séparation des enveloppes bactériennes

L'isolement des enveloppes bactériennes est rendu difficile de part leurs structures et l'importante variabilité qui existe entre espèces.

Déjà en 1951, Salton et Horne obtiennent des fractions de parois et de membranes cytoplasmiques peu contaminées par le matériel cytoplasmique ; en 1970, Thompson *et al.* obtiennent des muréinoplastes par lavage avec du chlorure de sodium et une solution de sucrose à 0,5 M.

Un pas important dans cette évolution est l'élimination des hexosamines par action combinée de lysozymes et d'EDTA afin d'optimiser la pureté des protoplastes (Costerton *et al.*, 1967). Les techniques ont été optimisées par centrifugation en présence d'ions divalents qui empêchent la lyse cellulaire (Fox *et al.* 1970 ; Rayman et McLeod, 1975 ; Hoyle et Beveridge, 1983).

Mais les techniques les plus complètes de séparation membranaire font appel à des méthodes de centrifugation zonale différentielle ou en gradient de sucrose (Forsberg *et al.*, 1970 ; Hoyle et Beveridge, 1983, Falla *et al.*, 1988).

La pureté des fractions ainsi obtenues est ensuite appréciée à l'aide de marqueurs spécifiques et non spécifiques.

Tout d'abord, Forsberg *et al.*, en 1970, dosent les protéines et hexosamines pour analyser la paroi bactérienne et ses composants. Puis Osborn *et al.* (1972) utilisent les oxydases, hydrolases, synthétases comme marqueurs de la membrane cytoplasmique et le 2-céto 3-désoxyoctanate (KDO) comme marqueur spécifique de la membrane externe.

Dès 1974, Kasahara et Anraku utilisent la succinate déshydrogénase (SDH) comme marqueur spécifique de la membrane cytoplasmique.

II.6. Techniques de purification de protéines membranaires

De nombreuses études ont relaté avec précision les paramètres à considérer avant de développer une méthode de purification de protéines (Thomas et Mac Namee, 1990 ; Hjelmeland et Chrambach, 1984 ; Harris et Angal, 1995 ; Schagger *et al.*, 1995). Le choix d'une stratégie de purification repose sur deux axes majeurs :

- il est primordial de considérer, tout d'abord, la nature et le type de protéine à purifier. S'agit-il d'une protéine soluble ou membranaire ? Possède-t-elle des particularités dans sa composition (parties glucidiques ou lipidiques) ou sa structure (poids moléculaire, pKa) qui pourront faciliter l'obtention de fractions pures ? Enfin et surtout, cette protéine est-elle suffisamment exprimée ?
- le second axe qui déterminera le protocole à développer dépend des objectifs de l'étude. Ainsi, il sera plus complexe d'obtenir des fractions stables dans le temps de protéines membranaires actives que de protéines solubles. Par exemple, une protéine purifiée pour une étude cristallographique, doit être très pure et active, alors que la production d'anticorps nécessite une concentration plus faible de protéines, mais l'état structural doit être intact.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes focalisés sur les protocoles de purification de protéines membranaires. Du fait des deux points que nous venons de souligner, les procédures développées sont très variables d'une étude à l'autre. En outre, l'application de ces techniques d'une souche bactérienne à l'autre, est rendue difficile par la complexité structurale et la grande variabilité de composition des membranes externes bactériennes. Toutes les techniques de purification de protéines membranaires, sont divisées en plusieurs parties nécessaires à l'obtention des fractions protéiques étudiées. Ainsi, nous pouvons distinguer quatre grandes étapes :

- Isolement de la fraction cellulaire contenant la protéine du reste de la cellule ;
- Extraction des protéines des molécules qui lui sont liées ;
- Purification de(s) protéine(s) étudiée(s) ;
- Isolement de l'échantillon protéinique pur des composés utilisés au cours de la purification (détergent, solvant, etc....).

Il faut remarquer ici qu'une étape de concentration est souvent nécessaire pour obtenir des quantités suffisantes à l'analyse ultérieure (Hjelmeland et Chrambach, 1984).

II.6.1. Extraction des protéines membranaires des molécules qui lui sont liées

Après isolement de la membrane externe, la première étape de la purification des protéines, est la mise en solution des protéines.

C'est l'étape dite de **solubilisation** : elle consiste à séparer les protéines des phospholipides et lipopolysaccharides, constitutifs de la membrane externe. Plusieurs techniques ont été développées visant à extraire les protéines, de façon efficace, avec ou sans dénaturations (Neugebauer, 1990 ; Hjelmeland, 1990).

a. Solubilisation des protéines membranaires par action d'un solvant organique

Il existe un éventail de solvants, présentant chacun des propriétés qui lui sont propres : le *butanol* a été utilisé pour purifier des glycoprotéines ou des protéines érythrocytaires. Il induit deux phases, les protéines se concentrant dans la phase aqueuse, alors que des lipides se trouvent dans la phase organique. Dans le cas de lipoprotéines, le *pentanol* sera préféré au *butanol*, car il est moins sélectif. Le *phénol*, à pH acide, permet de séparer les glycoprotéines (en phase aqueuse) du reste de la membrane (Hjelmeland et Chrambach, 1984).

Un mélange de solvants est parfois nécessaire pour l'obtention de protéines sous forme monomérique : un mélange *chloroforme-éthanol* présente un haut pouvoir de solubilisation mais peut entraîner une perte de l'activité biologique. Dans ce cas, *l'acide formique* ou *l'acide acétique* sont préférables, car ils sont moins dénaturants. En effet, ils déstabilisent les liaisons hydrophobes entre les protéines et les résidus membranaires non polaires.

L'inconvénient majeur de ces solvants est qu'ils sont à l'origine de dénaturations protéiques, parfois difficile à estimer ; ils seront choisis si l'activité biologique n'est pas primordiale dans la poursuite de l'étude. Dans le cas contraire, l'utilisation d'un **détergent** sera préférable (Neugebauer, 1990 ; Schagger *et al.*, 1995).

b. Solubilisation des protéines membranaires par action d'un détergent

Les détergents sont de petites molécules amphiphiles, solubles dans l'eau et capables de former des micelles autour des protéines, favorisant leur maintien en solution. Ils pénètrent et s'intègrent dans la membrane jusqu'à la déstabiliser. En effet, ces micelles constituent une structure présentant les mêmes propriétés physico-chimiques qu'une membrane biologique, les gardant stables en solution et limitant l'action des protéases (fiche technique BACHEM, 1996 ; Thomas et Mac Namee, 1990).

L'action des détergents dépend de :

- leur charge : deux classes de détergents sont à distinguer : ioniques et non ioniques (Triton X-100, Nonidet P40, Tween20, etc...). La première catégorie comprend des détergents anioniques (cholate de sodium, dodécyl sulfate, etc...), cationiques (bromures de triméthyl d'ammonium, par exemple) et zwitterioniques (Zwittergent 3-14, CHAPS).
- leur concentration critique de micelles (cmc) : c'est la concentration minimale à ajouter aux membranes pour former des micelles de monomères protéiques. En-dessous de cette valeur critique, des agrégats de protéines se forment et rendent la purification difficile.
- la taille des micelles qu'ils forment : la taille des micelles détergent-protéine formés dépend de la nature du détergent. Ce paramètre peut être un facteur limitant pour l'étape de purification (Findlay *et al.*, 1981).

Les détergents ioniques sont très efficaces et permettent la dissociation des protéines sous forme de monomères (Findlay *et al.*, 1981). Leur cmc est en général supérieure à 1 mM, c'est pourquoi ils sont facilement enlevés du milieu par dialyse, avant l'étape de purification. Cependant, ils sont souvent dénaturants (particulièrement les sels biliaires) et seront utilisés lorsque l'activité biologique de la protéine purifiée n'est pas indispensable. De plus, ils sont incompatibles avec certaines étapes de purification, comme par exemple, la chromatographie d'échanges ioniques ou l'électrophorèse. Leur utilisation peut donc nécessiter une étape visant à les éliminer de la solution protéique avant la purification.

Pour des études structurales ou enzymatiques, l'extraction de protéines membranaires sera réalisée par action de **détergents non ioniques** (Le Maire *et al.*, 1983 ; Laï *et al.*, 1990). Ils n'ont pas d'action sur les liaisons ioniques et électrostatiques, ils sont donc moins dénaturants et sont compatibles avec tous types de colonnes chromatographiques.

En outre, contrairement aux détergents ioniques, ils ne précipitent pas avec le réactif de Bradford ou l'acide bicinchoninique, couramment utilisés pour le dosage de protéines (Thomas et Mac Namee, 1990). Toutefois, leur cmc est généralement inférieure à 1 mM, ce qui les rend plus difficile à éliminer que les détergents ioniques. Enfin, les micelles formées peuvent avoir un poids moléculaire important, ce qui peut interférer avec une chromatographie de filtration sur gel.

c. Optimisation de l'étape de solubilisation

Si l'étape de solubilisation n'est pas satisfaisante, plusieurs types de molécules chimiques ajoutées au tampon d'extraction, contribueront à l'optimisation de la méthode :

- **des inhibiteurs de protéases** : ils limitent la dénaturation des protéines solubilisées (PMSF, aprotinine) ;
- **des agents réducteurs** : certaines protéines sont moins stables en présence d'oxygène comme par exemple, des enzymes d'oxydo-réduction. Ces protéines sont stabilisées par élimination de l'oxygène en solution (dithiothreitol, β -mercaptoéthanol) ;
- **des polyols** : ils stabilisent les protéines, même pendant la congélation et empêche la dissociation des polymères. L'addition de ces composés pendant l'extraction tend à diminuer la quantité de détergent nécessaire à la solubilisation (glycérol par exemple) ;
- **des agents chélateurs** : ils complexent les ions calcium et magnésium qui stabilisent la membrane (comme, par exemple, l'EDTA) ;

- des **ions chaotropiques** : à forte concentration (2 à 4 M), ils détruisent les liaisons hydrophobes et favorisent les transferts d'un milieu apolaire à un milieu aqueux (thiocyanate de guanidine, par exemple) ;
- l'**urée** ou la **guanidine** : à forte concentration (6 à 10 M), les liaisons non covalentes sont cassées.

En résumé, chacun de ces composés chimiques présente des avantages et des inconvénients, le choix d'un solvant organique, d'un détergent ionique ou non ionique est conditionné par l'étape de purification et de l'utilisation des protéines purifiées.

II.6.2. Purification des protéines solubilisées (ou séparation)

Les constituants protéiques sont ensuite **séparés** par une méthode plus résolutive, afin d'obtenir des extraits purs (Kato *et al.*, 1987a). Plusieurs stratégies peuvent être envisagées :

- Séparation des protéines par la taille : chromatographie de **filtration sur gel** ;
- Séparation basée sur la spécificité de la protéine vis-à-vis d'un ligand ou d'un récepteur : chromatographie **d'affinité** ;
- Séparation basée sur la charge ionique des protéines à purifier : chromatographie **ionique** (anionique ou cationique, forte ou faible) ;
- Séparation basée sur l'hydrophobicité des biomolécules Chromatographie : **en phase hydrophobe** ;
- Séparation basée sur la polarité des molécules : **phase inversée**

a. Séparation basée sur la taille des protéines

La chromatographie en taille d'exclusion est basée sur la séparation des protéines selon leur poids moléculaire. On distingue la chromatographie dite de **filtration sur gel** pour la séparation de biomolécules en phase aqueuse et de **perméation sur gel** pour la séparation de polymères organiques dans un système non aqueux. Cette technique est basée sur la différence de perméation des

molécules à séparer à travers une colonne de porosité connue (Kato *et al.*, 1987c ; fiche technique TOSHAAS, 1997).

Cette technique présente une faible capacité de purification pour des échantillons contenant des fragments membranaires ou des micelles (protéines/détergent ou protéines/lipides/détergent). Elle présente également un risque d'inactivation des protéines, inconvénient qui peut être évité, en ajoutant au tampon d'élution une concentration en détergent dix à cent fois moins importante que pour la solubilisation. Elle est souvent utilisée comme étape complémentaire dans une stratégie de purification de protéines.

b. Séparation basée sur la spécificité de la protéine : chromatographie d'affinité et immunoaffinité

Ce type de chromatographie est fondé sur l'affinité de la protéine pour un ligand immobilisé, structuellement analogue au ligand naturel (*exemple* : antigène/anticorps, lectine-glycoprotéine). L'avantage de cette technique est qu'un bon rendement de purification peut être atteint, en une seule étape, à partir d'un extrait protéique brut. L'inconvénient majeur est qu'une nouvelle phase stationnaire doit être utilisée à chaque passage d'échantillon.

L'immunopurification est la méthode la plus sélective et la plus sensible, elle permet même de séparer des antigènes presque similaires (Harris et Angal, 1995).

c. Séparation basée sur la charge de la protéine

• Chromatofocusing

Les matrices utilisées pour cette technique résistent à des pH de 5 à 9 et ne subissent aucune dénaturation avec des solvants organiques neutres, des dénaturants forts (*exemple* : urée 8 M), des détergents non ioniques ou zwitterioniques. Elle couple deux méthodes : l'isofocusing, méthode par laquelle les protéines sont séparées par électrophorèse dans un gradient de pH et chromatographie ionique qui joue sur la charge ionique globale des protéines à séparer.

La colonne de chromatofocusing est équilibrée dans un tampon à pH fixé ; les protéines retenues sont éluées en induisant un gradient de pH. Cette technique s'est avérée efficace pour la séparation de protéines solubles et non agrégées (Giri, 1990 ; Roe, 1990).

- Chromatographie d'échanges ioniques (IEC)

Cette méthode de purification est couramment utilisée pour séparer et concentrer des molécules chargées. Dans le cas de protéines, elles sont fixées sur une matrice solide chargée puis décrochées par variation de la force ionique du tampon d'élution.

Il existe plusieurs types de matrices : anioniques ou cationiques, faibles ou fortes :

- Les colonnes de chromatographie d'échanges anioniques faibles sont constituées d'une matrice greffée de groupements aminoéthyl (ou AE) ou diéthylaminoéthyl (ou DEAE) ;

- Les colonnes d'échanges anioniques forts présentent des groupements triéthylaminométhyl (TAM) ou triéthylaminoéthyl (TEAE).

Toutes les deux fixent les protéines chargées négativement, lesquelles sont éluées en augmentant la force ionique du tampon d'élution.

- De même, les colonnes d'échanges cationiques faibles sont constituées de groupements carboxyliques ;

- Les colonnes d'échanges cationiques forts de groupements sulfoniques.

Toutes les deux fixent les protéines chargées positivement ; elles peuvent être décrochées, en faisant varier le pH, qui modifie la composition ionique du tampon.

Ce type de chromatographie est souvent utilisé pour la séparation de protéines intégrales, pour lesquelles de bons résultats sont obtenus (Roe, 1990 ; Kato *et al.*, 1982, 1983, 1984 et 1987b ; Rosenbusch ; 1990). Les protéines doivent cependant se trouver sous forme soluble pour être fixées. C'est pourquoi l'utilisation de détergents (non ioniques) est nécessaire tout au long de l'étape (Rossomando, 1990).

- Séparation basée sur l'hydrophobicité

La chromatographie en phase inversée (RPC) est basée sur la répartition d'un soluté entre une phase mobile polaire et une phase organique apolaire. La particularité de cette technique est qu'elle fait appel à deux phases liquides. Elle présente une très bonne résolution pour la séparation de protéines et de peptides.

Toutefois, le principal inconvénient, dans le cadre de la purification de protéines, est que la combinaison d'une phase stationnaire hautement hydrophobe avec des solvants polaires comme éluents est à l'origine d'une dénaturation des biopolymères. Ceci est dû à la détérioration de la structure tertiaire de la protéine, causée par les interactions des groupes alkylés qui composent la matrice. Un autre inconvénient est l'usage courant de solvant toxique (acétonitrile) (Harris et Angal, 1995).

Le principe de la chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC) est l'adsorption de biomolécules sur une surface faiblement hydrophobe dans un milieu contenant une forte concentration saline ; l'élution se fait avec un gradient décroissant de sel.

C'est un outil de séparation puissant pour la majeure partie des divers types de protéines, car cette méthode combine des conditions de séparations non dénaturantes et la précision d'une méthode chromatographique.

Cependant l'optimisation des conditions opérationnelles est longue et difficile. L'efficacité de cette technique est diminuée par la présence de contaminants hydrophobes dans les diverses solutions. De plus, des conditions fortes d'élutions peuvent être nécessaires (ajout d'un solvant), car le gradient d'élution peut favoriser des interactions électrostatiques entre les groupes en solution et la matrice. Ceci entraîne une diminution du pouvoir adsorbant de la colonne (Kennedy, 1990).

Enfin, outre la composition du tampon, le gradient d'élution, la température ou le pH, la matrice des colonnes ont une importance non négligeable sur les performances chromatographiques. En effet, des études tendent à montrer que dans les mêmes conditions opératoires, des colonnes identiques mais issues de

fournisseurs différents ne présentent pas toujours les mêmes performances (Levisson et al., 1997 ; Lesellier et Tchapala, 2001).

II.6.3. Concentration des protéines purifiées

La purification de protéines membranaires nécessite souvent une étape de concentration, particulièrement lorsque ces protéines sont issues de microorganismes ou que l'étude vise à déterminer leur structure. En effet, la cristallographie de protéines nécessite de 5 à 10 mg/ml de fractions pures. De telles quantités ne peuvent être obtenues que si les protéines sont surexprimées (naturellement ou par amplification), ou si elles ont été concentrées. Cette étape peut intervenir à plusieurs niveaux du protocole : avant ou après purification, plusieurs techniques sont envisageables : précipitation, lyophilisation, évaporation, filtration ou dialyse.

a. La précipitation

Les protéines sont précipitées par induction de perturbations, qui diminuent leur solubilité dans l'eau (Scopes, 1987). Les composés chimiques couramment utilisés pour cette technique sont les solvants (éthanol, méthanol, acétone), les sels (sulfate d'ammonium, chlorure de sodium) ou les polymères (PolyÉthylèneGlycol). Ils modifient les liaisons qui stabilisent les protéines dans l'eau et en créent d'autres, afin de stabiliser les protéines (England et Seifter, 1990). Cette méthode présente les inconvénients suivants :

les conditions de milieu (pH, température, charge ionique du tampon) doivent être rigoureusement suivies. Certains composés peuvent être incompatibles avec l'étape de purification.

b. La lyophilisation

Les protéines sont concentrées par évaporation du liquide composant le tampon, sous vide et à basse température ; elles sont ensuite remises en suspension dans un volume inférieur au volume initial. Un agent cryoprotecteur doit cependant être ajouté

avant lyophilisation, pour limiter la dénaturation des protéines purifiées (due à la pression et la déshydratation). Malgré ces précautions, les protéines sont souvent dénaturées lors de la re-solubilisation dans un volume plus faible. En effet, d'une part, la concentration des sels en solution augmente et modifie la force ionique et d'autre part, les complexes détergent-protéine peuvent perdre leur activité catalytique (Deutscher, 1990). Cette technique est généralement utilisée lors d'extractions par des solvants organiques.

c. La filtration

Couramment utilisée, cette technique est basée sur la filtration de petites molécules et de l'eau sur une membrane par induction d'une force centrifuge ou d'une pression. Le type de membrane est choisi en fonction de la taille des molécules à concentrer (le diamètre de coupure est à la limite de son poids moléculaire) et de la nature de la membrane (qui doit limiter les interactions avec les protéines). Cette méthode peut également être utilisée pour dessaler le milieu tampon ou éliminer l'excès de détergent.

L'inconvénient majeur de cette technique est que des agrégats de protéines se fixent de façon irréversible sur la membrane. De plus, les détergents non ioniques, qui forment des micelles de haut poids moléculaire, ne sont pas filtrés et sont donc concentrés (Schägger *et al.*, 1995).

d. La dialyse

La solution protéique est placée dans un sac à dialyse, puis placée sur un gel qui absorbe le milieu aqueux (comme par exemple du PolyEthylèneGlycol) jusqu'à obtention du volume désiré. Le sac peut ensuite être dialysé contre un tampon afin de diminuer la concentration de détergent en solution. Cette technique, sans doute la plus utilisée, n'est pas dénaturante et ne retient que peu les protéines sur les parois de la membrane de dialyse (Deutscher, 1990 ; Findlay *et al.*, 1981).

II.7. Techniques d'analyses des protéines des enveloppes bactériennes

Plusieurs techniques d'analyse des protéines des enveloppes bactériennes peuvent être envisagées. Parmi ces méthodes les plus utilisées sont les méthodes biochimiques et immunologiques. Leur utilisation dépend de la nature, de la localisation et du rôle des protéines à étudier.

II.7.1 Méthodes biochimiques

Les méthodes chimiques d'analyse des protéines sont indispensables afin d'identifier et de quantifier le contenu protéinique de l'échantillon. Parmi les méthodes les plus utilisées, nous pouvons citer la méthode de dosage des protéines en spectrophotométrie UV (Harris et Angal, 1995), en colorimétrie (par réaction à un colorant spécifique : Méthodes de Bradford, Lowry, acide bicinchoninique).

Toutefois, ces méthodes sont des méthodes de dosages globales, qui ne permettent pas de différencier les protéines de l'échantillon.

La technique de séparation et d'identification de protéines, solubles ou membranaires, la plus largement utilisée est, sans doute, l'électrophorèse.

Les méthodes d'électrophorèse présentent un large éventail d'utilisations : séparation de protéines et d'acides nucléiques, dans des conditions dénaturantes ou non dénaturantes ; identifications spécifiques par des marquages et/ou des colorations.

a. Electrophorèses dénaturante / non dénaturante

L'électrophorèse est basée sur la migration de protéines, selon leur charge globale et leur poids moléculaire, à travers un gel. Cette séparation est induite par un champ électrique résultant de l'électrolyse d'un tampon (Garfin, 1995).

Les protéines peuvent être séparées dans des conditions non dénaturantes (on parle alors d'électrophorèses natives) ou en conditions dénaturantes.

Le principal avantage de travailler en conditions non dénaturantes est d'obtenir un profil protéique précis de la structure étudiée. Cependant, dans le cas de protéines

membranaires, l'environnement lipidique rend impossible une analyse en conditions non dénaturantes, sans une étape préalable de purification. Elles sont généralement étudiées dans des conditions dénaturantes (Ames, 1974).

Les détergents ioniques ou non ioniques sont utilisés pour induire cette dénaturation, en déstabilisant les liaisons protéines-lipides et protéines-protéines. Le sodium dodécylsulfate, détergent anionique, est particulièrement intéressant car il a une action acidifiante sur l'ensemble des protéines, qui migreront vers l'anode (Allen *et al.*, 1984).

Le gel est un polymère, qui constitue un maillage, plus ou moins dense, suivant la taille des protéines à séparer. Il existe deux types de gels : les gels d'agarose, utilisés pour la séparation de protéines supérieures à 500 kDa, ou de polyacrylamide, pour de plus petites molécules.

Dans le cas de systèmes de gel d'électrophorèse **continu**, les protéines sont directement déposées sur le gel de séparation. En ce qui concerne le système **discontinu**, les protéines sont déposées sur un gel de concentration, dont le rôle est d'uniformiser la migration des protéines sur le gel de séparation. Ce second système a permis d'optimiser significativement la résolution de la séparation.

Ornstein en 1964 et Davis, la même année, sont les premiers à avoir mis en place un tel système, en condition non dénaturante. Laemmli modifie ce système en 1970 et l'adapte aux conditions dénaturantes, induites par la présence de SDS dans le gel, les échantillons et le tampon de migration (Garfin, 1995).

Il existe également des techniques d'électrophorèse basées sur la séparation des protéines selon leur pHi, appelées : Focusing Isoélectrique. Le principe est le même mais le gel est composé d'un gradient de pH (Allen *et al.*, 1984).

b. Types de colorations

- Colorations non spécifiques

Plusieurs techniques de quantification de protéines par colorimétrie ont été adaptées pour l'identification des protéines ainsi séparées.

La coloration **au bleu de Coomassie** est basée sur la fixation de ce colorant sur les fonctions aminées des protéines. Cette technique est développée pour des concentrations *minima* de 0,1 à 1 µg de protéine/bande.

La coloration **à l'argent** est cent fois plus sensible que celle au bleu de Coomassie. Après fixation des protéines sur le gel, elles sont oxydées en présence de dichromate de potassium, l'argent se fixe alors aux protéines qui précipitent sous forme métallique (Merril, 1990).

Enfin, la coloration **au cuivre** est rapide et ne nécessite pas d'étape de fixation (Lee *et al.*, 1987). Les protéines sont incubées en présence de chlorure de cuivre, puis le gel est rincé à l'eau. Cette coloration n'est pas permanente et disparaît en séchant les gels, ce qui rend leur analyse délicate (Garfin, 1995).

- Colorations spécifiques

Outre ces colorations qui révèlent l'ensemble des protéines séparées, des colorations spécifiques ont été développées, basées sur la présence de groupements chimiques particuliers.

- coloration des glycoprotéines :

Trois méthodes ont été développées pour la mise en évidence de la fonction glucidique d'une protéine :

→ **Thymol-acide sulfurique** : cette technique est basée sur la formation d'un dérivé furfural entre les groupements hexosyl, hexuronosyl et pentosyl des glycoprotéines et l'acide sulfurique. Ce dérivé, en présence de thymol forme un

chromogène, stable quelques heures. La limite de détection est de 50 ng de glycoprotéines (Gander, 1984).

→ **Méthode de Schiff** : les fonctions alcool des glycoprotéines sont oxydées en dialdéhydes par action de l'acide périodique, puis colorées par la fuschine, le bleu alcian ou l'hydrazine dansyl. Cette technique révèle jusqu'à 2 à 3 µg de glycoprotéines.

→ **Lectine marquée – Isocyanate de fluoresceine** : cette méthode est basée sur la fixation de la partie fluoresceine marquée de la concavaline A sur les fonctions glucidiques des protéines. La limite de détection est de 100 ng de glycoprotéines (Gander, 1984).

- coloration des phosphoprotéines :

→ **Vert de méthyl** : cette réaction est basée sur le piégeage du phosphate de calcium dans le gel, dont la synthèse est induite par l'hydrolyse alcaline des liaisons phosphoesters, en présence de chlorure de calcium. Cette technique permet d'identifier des quantités de phosphate de 1 nmol (Cutting et Roth, 1973).

→ **La méthode « strains-all »** : le bromure de {1-éthyl-2-(3-(1-éthyl-naphthol[1,2-d]thiazolin-2-méthylpropenyl)naphthol[1,2-d] thiazolium} se fixe sur un éventail de biopolymères avec lesquels il forme un complexe allant du bleu au rouge. Ainsi, les phosphoprotéines, les glycoprotéines, l'ADN et l'ARN forment un complexe bleu, et les protéines non conjuguées, un complexe rouge (Cutting et Roth, 1973). La sensibilité de cette technique est près de trois fois supérieure à la coloration au vert de méthyl (0,3 nmol de phosphate).

→ **Chélation par métal trivalent** : l'aluminium sous forme trivalente réduit les charges négatives des protéines, et permet de lier ces phosphoprotéines acides au

bleu de Coomassie, la coloration est instable en absence de cet ion. Cette méthode est trois fois plus sensible que le méthode Strains-all (Cutting et Roth, 1973).

- coloration des fonctions lipidiques :

→ le **noir soudan** : les lipoprotéines séparées par électrophorèse sont difficiles à identifier car les colorants pénètrent très mal dans le gel. Le noir soudan forme un complexe bleu-noir avec le groupement lipidique de ce type de protéines (Pratt *et al.*, 1969).

II.7.2. Les méthodes immunologiques

Les protéines membranaires peuvent aussi être identifiées au moyen de molécules spécifiques : les anticorps monoclonaux et polyclonaux. Ces techniques sont efficaces pour l'identification de protéines difficiles à obtenir en quantité suffisante ou ancrées dans une structure complexe (c'est le cas de certaines protéines des enveloppes bactériennes).

Les anticorps sont des glycoprotéines, également appelés immunoglobulines, synthétisées en réponse à une molécule étrangère à l'organisme (Strayer, 1993). Ces protéines sont produites et sécrétées par des lymphocytes B, qui activés par l'antigène, deviennent des plasmocytes. Ces cellules sont des cellules spécifiques de la réponse immunitaire. Les anticorps ainsi produits forment une liaison spécifique avec l'antigène qui les a induit. Ces antigènes sont alors neutralisés et détruits par phagocytose et/ou activation du complément (Kuby, 1992). Les immunoglobulines sont classées en cinq groupes : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM, dont la structure et le rôle diffèrent.

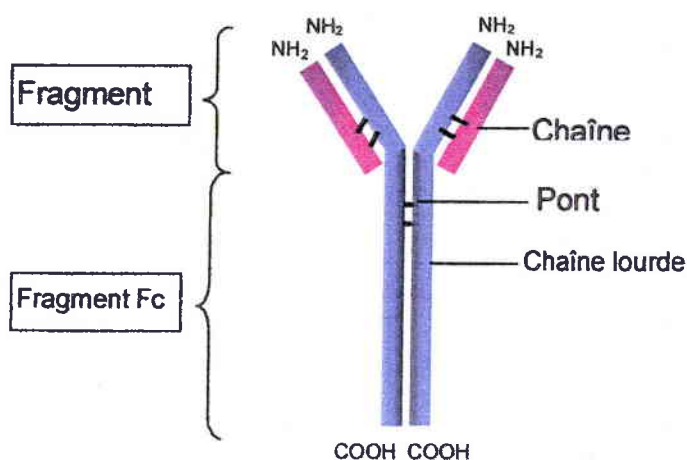


Figure 8 : structure primaire d'un anticorps

La structure de base d'un anticorps est composée de deux chaînes lourdes (de 450 à 570 acides aminés, suivant la classe) et de deux chaînes légères (de 210 à 300 acides aminés) (figure 8). Les parties N-terminales du fragment Fab (antigen binding) constituent des sites de fixation de l'antigène. Le fragment Fc (cristallisable) détermine le type de l'anticorps ; il présente un site fonctionnel au niveau de sa partie C-terminale, qui intervient, par exemple, dans l'activation du complément ou la fixation sur d'autres cellules (Bach et Lesavre, 1993).

Les IgG, dont il existe quatre sous-classes, représentent 70 à 90 % des anticorps circulant et ont un poids moléculaire moyen de 150 kDa. Ils ont pour principal rôle de répondre à une infection bactérienne (ASSIM, 1990), ils doivent donc être très diversifiés pour répondre aux différentes agressions. Les lymphocytes B peuvent produire jusqu'à 10^{10} IgG, dont seul le site de fixation diffère (French *et al.*, 1989).

a. Optimisation de la réponse immunitaire

Afin d'éviter les réponses non spécifiques lors de la production d'anticorps, il est nécessaire de considérer tous les paramètres influençant la réponse immunitaire :

- L'organisme hôte : L'espèce, l'âge, le sexe, l'état nutritionnel de l'hôte peuvent influencer la réponse immunitaire (Griscelli *et al.*, 1985).
- L'antigène : La structure chimique et la composition de l'antigène présentent une réelle importance dans le type de réponse qu'il va induire. Ainsi, certaines molécules, comme les protéines et les lipopolysaccharides, ont un pouvoir très immunogène. La taille et la concentration de la molécule injectée pour la synthèse et la production d'anticorps a également été démontrée (Cevenini *et al.*, 1991) ; dans le cas de protéines, seuls quelques microgrammes d'antigène sont suffisants (Raymond et Sue, 1993 ; Cevenini *et al.*, 1991).
- Le mode d'injection : de nombreux auteurs se sont intéressés à l'importance du mode d'injection mais également au nombre et à l'intervalle de temps entre chaque rappel. Hong, en 1989, met en évidence une augmentation significative de la production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux après une première injection au niveau de la rate ou des ganglions lymphatiques plutôt qu'en sous cutanée. En intra

splénique, une seule injection peut suffire à la production d'anticorps monoclonaux (Spitz, 1986). Toutefois, les injections d'antigènes dans les ganglions lymphatiques, par exemple, nécessitent une opération chirurgicale complexe de l'animal (Hong, 1989). Les anticorps sont efficaces après la deuxième injection (réponse secondaire), mais ils sont en général collectés après la troisième injection, car la réponse est optimisée.

b. Production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux

Deux types d'anticorps peuvent être produits : des **anticorps polyclonaux** ou **monoclonaux**. Les premiers sont obtenus directement à partir du sérum d'animaux immunisés (généralement des lapins, des rats ou des souris) (Garvey *et al.*, 1977). Ils résultent, comme leur nom l'indique de **l'activation de plusieurs lymphocytes B**, donnant lieu à un mélange d'immunoglobulines dont la spécificité vis-à-vis de l'antigène diffère.

L'intérêt majeur de cette technique est l'obtention rapide et peu complexe d'une quantité importante d'anticorps suivant l'animal choisi. Ce qui explique la large utilisation du lapin pour ce type d'étude (Lomax *et al.*, 1998 ; Tyler *et al.*, 1999). En effet, après sélection des anticorps voulus, jusqu'à 20 mL de sérum peuvent être obtenus, au niveau de la veine de l'oreille par lapin et par semaine (Walker, 1996).

Les souris et les rats, plus petits, ne permettent d'obtenir que de 2 ml à 10 mL de sérum (pour le rat), et l'animal doit être sacrifié. Pour pallier cette limite, une méthode basée sur l'induction d'une tumeur productrice d'anticorps spécifiques a été développée. Elle est couramment appelée méthode en **ascite**. L'antigène est injecté en intra péritonéal, avant le premier rappel une tumeur est induite par injection de pistane. Le liquide ascite, contenant les anticorps est récupéré et testé par ELISA. Les anticorps sont alors sélectionnés. Certains auteurs ont réussi à obtenir plus de 100 mL de ce liquide sur une période de 90 jours à partir de souris (Cevenini *et al.*, 1991). L'inconvénient de cette méthode est l'état physique et les conditions de maintien de l'animal.

Les **anticorps monoclonaux** nécessitent la mise en œuvre d'une technique plus longue et complexe. Elle a été détaillée par de nombreuses équipes (Köhler et Milstein, 1975a et 1975b ; Galfrè *et al.*, 1977). Après immunisation, une dernière injection est réalisée en intraveineuse, trois jours avant sacrifice, afin de potentialiser la réponse (Mishell et Shiigi, 1980 ; Catty, 1989). La rate est prélevée et les splénocytes isolés, ils sont alors fusionnés avec des cellules de myélomes, en présence d'un agent de fusion : le PolyEthylèneGlycol (ou PEG). Cette étape est nécessaire car la durée de vie d'un lymphocyte n'excède pas trois jours.

Une première sélection, visant à ne laisser se développer que les cellules obtenues au cours de la fusion d'un lymphocyte B (producteur d'anticorps) et d'une cellule myélocytaire (cellule immortelle) par ajout dans le milieu de culture d'un agent de sélection : le HAT (Hypoxantine, Aminoptérine, Thymidine). Les hybridomes résultant du « croisement » d'un lymphocyte B et d'une cellule immortelle, ne produiront qu'un seul type d'anticorps, donc un anticorps monoclonal (Peters et Van Noorden, 1983).

L'hybridome répondant le plus spécifiquement à l'antigène qui l'a induit est sélectionné (souvent par test ELISA qui permet de mettre en évidence d'éventuelles réactions croisées) et purifié (Bjorck et Kronvall, 1994 ; Elliasson *et al.*, 1988 ; Fahnestock, 1987).

c. Anticorps monoclonaux / anticorps polyclonaux ?

Comme nous venons de l'exposer, chaque type d'anticorps présente des propriétés qui lui sont propres, le choix de production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux est un compromis entre les contraintes imposées par le matériel et les objectifs de l'étude. Ainsi, la production d'anticorps monoclonaux peut offrir une grande spécificité vis-à-vis de l'antigène qui l'a induit. L'immortalité des hybridomes permet d'obtenir une source intarissable d'anticorps, pouvant être conservés par congélation puis remis en culture. Leur production est cependant longue et complexe. De plus, une parfaite connaissance des techniques de culture cellulaire et de dissection est nécessaire.

Les anticorps polyclonaux, moins spécifiques, sont obtenus plus rapidement et n'impliquent pas systématiquement le sacrifice de l'animal. Enfin, ils ne nécessitent pas de matériel lourd de culture cellulaire ; seules trois injections intrapéritonéales sont nécessaires ; le sang est récupéré et centrifugé afin d'obtenir le sérum, contenant les anticorps.

II. 8. Techniques d'évaluation de l'activité des protéines membranaires

L'activité et l'intégrité des protéines membranaires vis-à-vis d'autres molécules, plus particulièrement les métaux peuvent être évaluées par différentes méthodes *in vitro* (dialyse, filtration, colonne d'affinité) et traduites par des techniques mathématiques pour en saisir le mode de fonctionnement *in vivo* (tableau III). Plusieurs expressions et méthodes, très diversifiées sont généralement utilisées pour traduire ces réactions qui vont du simple coefficient d'accumulation à un modèle complexe, qui permet de déterminer l'intégrité du récepteur, l'affinité et le nombre de sites de fixations (Scatchard, 1949) :

Tableau III: Expressions d'évaluation de l'accumulation des métaux sur une membrane biologique, Falla, 1990

Techniques	Expression	Observations
Coefficient d'accumulation	CA=Quantité de métal biosorbé / masse (ou nombre) de cellules	Ce coefficient ne tient compte ni du facteur temps, ni de la concentration initiale de métal testé
Facteur de concentration	FC=(Métal fixé / matière sèche) / (Métal libre / Volume liquide)	Cette expression tient compte de la concentration mais n'intègre pas le facteur temps
Cinétique d'accumulation	Expression du type : Cin A= métal accumulé / matière sèche / temps	Cette cinétique considère que la quantité et la qualité du matériel biologique ne varient pas au cours de l'analyse. Par conséquent, il doit donc être court si l'étude porte sur des cellules entières.
Isotherme de Freundlich	$[\text{Métal absorbé}] = K \times [\text{métal en solution}]^{1/n}$ <i>où K est une constante et 1/n la pente</i>	Il est souvent utilisé pour décrire l'équilibre entre un métal adsorbé par les bactéries et le métal restant en solution. Il suppose que tous les sites de fixation ne sont pas équivalents.
Isotherme de Langmuir	$1/[\text{Métal absorbé}] = (1/(K \times b \times [\text{Métal en solution}])) + (1/b)$ <i>où K est la constante d'équilibre d'absorption et b la capacité ultime d'absorption</i>	Cet isotherme est préféré à celui de Freundlich pour des concentrations élevées. Ces deux isothermes ne tiennent pas compte de la coopération entre sites de fixation, ni du déplacement des métaux
Modèle de Ruzic	$[\text{Métal libre}]/([\text{ligand}] + [\text{Métal fixé}]) = 1/(K \times ([\text{ligand}] + [\text{Métal fixé}]))$ <i>où K représente la constante de stabilité du complexe métal/ligand</i>	Ce modèle permet d'obtenir : - la constante de stabilité Métal / ligand - le nombre de sites de fixation et leur type
Modèle de Scatchard	$[\text{Métal fixé}] / [\text{métal libre}] = -K_a \times [\text{Métal fixé}] + K_a \times n \times [L]$ <i>où K_a est la pente et n le nombre de sites de fixation</i>	Ce modèle donne : - La quantité de métal fixé par litre - Les différents types des sites de fixation - Relations existant entre les sites de fixation

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Conditions de culture bactérienne

III.1.1. Matériel biologique

Les souches utilisées dans cette étude sont des souches de *Ralstonia eutropha* CH34 (ATCC 43123), *Ralstonia eutropha* 1153, souche dérivée qui surexprime le sidérophore (Gilis *et al.*, 1996) et *Ralstonia eutropha* 104, dépourvue des plasmides de résistances (Gilis *et al.*, 1996), gracieusement fournies par le Dr Bauda et le Pr Mergeay.

III.1.2. Milieu et conditions de culture

Les cellules bactériennes sont cultivées dans un milieu spécifique TRIS-gluconate, supplémenté ou carencé en fer et en métaux, pendant trois jours à 30°C sous agitation, dans un volume de 5 litres, à partir d'un inoculum de 20 mL (Mergeay *et al.*, 1985).

→ Composition du milieu de culture

TRIS (pH=7)	6,06g
NaCl	4,68g
KCl	1,49g
NH ₄ Cl	1,07g
Na ₂ SO ₄	0,43g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,20g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,23g
Gluconate	2,00g
SL7(solution d'éléments trace)	1ml
qsp eau ultra pure	1l

Le pH du milieu de culture est ensuite ajusté à 7-7.2, puis il est autoclavé 20 mn, à 120°C.

Il est ajouté au milieu de base et suivant les conditions de culture :

Fe(NH ₄)-citrate	0,0048g
------------------------------	---------

La solution SL7, dont la composition est détaillée ci-dessous, est un ensemble d'éléments traces nécessaires à la croissance bactérienne.

→ Composition de la solution SL7

HCl (2.5%)	1,3 ml
ZnCl ₂	0,07g
MnCl ₂	0,10g
H ₃ BO ₃	0,063g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,19g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,017g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,024g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,036g

III.1.3. Tests de pureté des souches

Avant de lancer des cultures en masse, des pré-cultures bactériennes sur milieu d'isolement sont réalisées pour contrôler la pureté des souches. Les caractères macroscopiques des colonies (taille, couleur et aspect) sont vérifiées, puis l'une d'elles est isolée et soumise aux tests suivants :

- une coloration de Gram permet de vérifier le caractère Gram (-) de la bactérie. Elle est suivie d'une observation au microscope afin de confirmer qu'il s'agit de bâtonnets unicellulaires.
- une galerie API 20 NE est ensemencée pour vérifier les caractéristiques biochimiques des souches. Elle est réalisée à partir d'une colonie cultivée sur milieu spécifique, enrichi de 1 mM de nickel et 1 mM de zinc.
- parallèlement des géloses nutritives sont ensemencées :
 - **milieu spécifique, glucosé** : pas de développement de *Ralstonia eutropha* CH34, 1153 et 104
 - **milieu spécifique, gluconaté** : développement de *Ralstonia eutropha* CH34, 1153 et 104

- milieu spécifique, gluconaté contenant 1 mM de nickel et 1 mM de zinc :
pas de développement de *Ralstonia eutropha* 104

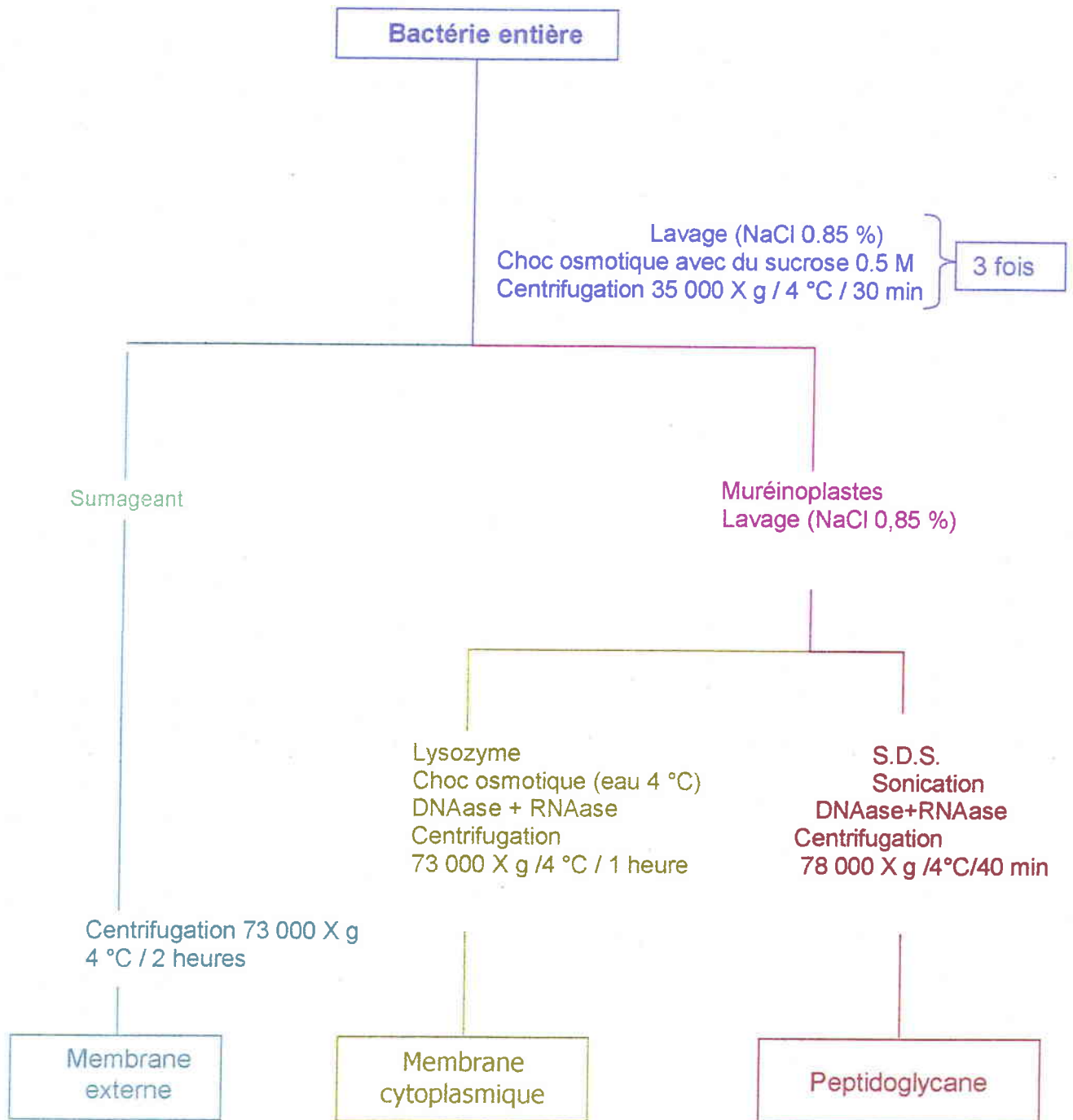
III.1.4. Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) pour le cobalt, le zinc et le cadmium

Pour mettre en évidence le système d'exclusion de ces métaux, *Ralstonia eutropha* sp a été cultivée en leur présence. C'est pourquoi il est nécessaire de déterminer la concentration de chaque métal induisant l'expression du système, sans inhiber significativement la croissance bactérienne.

Ainsi, *Ralstonia eutropha* CH34 a été cultivée dans 250 mL de milieu spécifique TRIS-Gluconate, supplémenté de cobalt, de zinc, ou de cadmium, pendant 72 heures, à 30°C et sous agitation. La densité optique de chaque échantillon bactérien est alors lue à 600 nm. La CMI est alors déterminée en traçant le courbe de densité optique à 600 nm, en fonction de la concentration de ces métaux. Les bactéries étudiées ont aussi été cultivées en présence ou en absence de fer, afin d'induire la surexpression des protéines des membranes.

III.2. Obtention des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34

Les protocoles mis en place pour l'obtention de chaque fraction (Falla, 1990) sont présentés en figure 9 :



Remise en suspension des microculots dans du tampon PBS
Conservation des fractions contenant les différentes enveloppes à - 20 °C

Figure 9 : Protocoles de purification des enveloppes de *Ralstonia eutropha* (Falla et al., 1988)

III.2.1. Lavages des cellules

Après trois jours de croissance cellulaire, la suspension bactérienne est centrifugée pendant 35 min à 5000 X g. Le culot est lavé deux fois et remis en suspension dans du tampon TRIS 20 mM, pH=7,2. Les cellules ainsi obtenues sont conservées à 4°C jusqu'à isolement des enveloppes.

III.2.2. Isolement de la membrane externe

Principe : la membrane externe de *Ralstonia eutropha* sp. est expulsée de la bactérie par un choc osmotique, induit par du sucrose à 0,5 M. Elle est alors séparée du reste de la cellule et des débris cellulaires par centrifugation.

Mode Opératoire : Après concentration des cellules lavées à 5000 X g, 35 min, le culot est remis en suspension dans une solution de sucrose (0,5 M). La suspension est incubée pendant 30 min, à 25°C, sous agitation puis centrifugée 20 min à 35000 X g, l'ensemble est répété trois fois :

- les culots contiennent les muréinoplastes (cellule bactérienne dépourvue de membrane externe).
- les surnageants contiennent les membranes externes.

L'ensemble des surnageants est centrifugé à 75000 X g, pendant deux heures, à 4°C, puis le microculot contenant les membranes externes est remis en suspension dans du tampon TRIS 20 mM et conservés à -20°C.

Les muréinoplastes sont remis en suspension dans du tampon TRIS 20 mM, pH=7,2 et stockés à -20°C. Ils seront traités par la suite pour séparer la membrane cytoplasmique et le peptidoglycane.

III.2.3. Isolement de la membrane cytoplasmique

Principe : la membrane cytoplasmique est expulsée par choc osmotique avec de l'eau ultrapure à 4°C, après digestion du peptidoglycane par action du lysozyme. Les acides nucléiques sont éliminés par action du RNAase et du DNAase. Les membranes sont séparées des débris cellulaires par centrifugation (Falla, 1990).

Mode Opérateur : les muréinoplastes obtenus lors de l'isolement de la membrane externe sont décongelés et maintenus à 30°C, pendant quelques min. 7,5 mL de la suspension sont alors prélevés et complétés à 60 mL avec du PBS contenant 50 mM de sulfate de magnésium. L'ensemble est incubé 30 min à 25°C, sous agitation. 75 µL de lyzosome sont alors ajoutés à la suspension, qui est incubée 1 heure, à 30°C, sous agitation. L'ensemble est alors centrifugé à 11000 X g, 20 min, à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 30 mL de PBS, pH=8,00, puis à nouveau centrifugé à 11000 X g, 20 min, à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 60 mL d'eau ultrapure à 4°C, 30 min, sous forte agitation, puis soniqué, toutes les 20 sec, pendant 5 min.

La formation des sphéropastes est suivie par observation au microscope à contraste de phase, durant cette étape.

7 µL de RNAase et 70 µL de DNAase sont ajoutés à la solution. L'ensemble est incubé à 25°C pendant 15 min puis centrifugé à 4000 X g, 10 min, à 4°C. Le surnageant est isolé et centrifugé à 73000 X g, 1 heure, à 4°C. Le culot contenant la membrane cytoplasmique est alors remis en suspension dans 6 mL de PBS, aliquoté et conservé à -20°C, pour utilisation ultérieure.

III.2.4. Isolement du peptidoglycane

Principe : à partir des muréinoplastes, la membrane cytoplasmique est déstabilisée par action d'un détergent : le Sodium Dodécyl Sulfate (ou SDS). Les acides nucléiques sont alors détruits par action du RNAase et du DNAase. Enfin, le peptidoglycane est séparé des débris cellulaires par centrifugation.

Mode Opérateur : Les muréinoplastes sont décongelés à 30°C, pendant quelques min. 7,5 mL de suspension sont alors prélevés et complétés à 25 mL avec du PBS, pH=8,00 et 1 mL de SDS 10 % y sont additionnés. L'ensemble est incubé 1 heure, à 4°C, sous forte agitation, puis centrifugé à 24000 X g, 30 min, à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 25 mL de sérum physiologique, dans un bain de glace, pendant 5 min et soniqué toutes les 20 sec.

50 µL de RNAase et 5 µL de DNAase, sont additionnés à la suspension. L'ensemble est alors incubé à 25°C, pendant 15 min, sous forte agitation puis centrifugé à 4000 X g, 10 min à 4°C.

Le surnageant est prélevé et centrifugé à 78000 X g, 40 min, à 4°C. Le culot est alors remis en suspension dans 6 mL de PBS, aliquoté et conservé à -20°C.

III.2.5. Dosage des marqueurs membranaires

Afin de déterminer le degré de pureté et de contamination de chacune des enveloppes, des marqueurs spécifiques ont été dosés. Ainsi, le KDO est un marqueur spécifique de la membrane externe. Cette méthode a été mise au point par Aminoff (1961). Le dosage de la succinate déshydrogénase (ou SDH) a été exposé par Nachals *et al.*, 1960, puis modifié par Kasahara et Anraku, 1974. C'est un marqueur spécifique de la membrane cytoplasmique. Les hexasamines, marqueur du peptidoglycane, ont été dosées par la méthode d'Elson-Morgan, modifiée par Montreuil et Spik (1963), après minéralisation des échantillons.

a. Dosage du 2-céto-3-désoxyoctanate (KDO)

Principe : La réaction est basée sur la formation d'un complexe entre l'acide thiobarbiturique et le KDO, en milieu acide. Ce complexe de couleur rosée est ensuite extrait par ajout de butanol et il est détecté par lecture à 549 nm. Une gamme étalon a été réalisée, à partir d'une solution mère de KDO à 100 µM.

Mode Opératoire : Les échantillons nécessitent un pré-traitement : ils sont minéralisés avec de l'acide chlorhydrique 12 N (v : v / 50 : 50) pendant 1 heure à 100°C. Après refroidissement, 100 µL de minéralisat sont prélevés et ajoutés à 50 µL d'acide périodique 25 mM, pH=1,2 et placés à 37°C, pendant 30 min. A l'issue de cette incubation, 40 µL d'une solution d'arsénite de sodium diluée dans 2,5 % d'acide chlorhydrique 0,5 N sont additionnés et la solution ainsi obtenue est incubée 1 à 2 min à 37°C.

500 µL d'acide thiobarbiturique 0,1 M, pH=9,0 sont alors ajoutés à la solution. Le complexe rosé se développe en plaçant la solution dans l'eau bouillante, pendant 7 min 30 sec. Le mélange est alors refroidi à température ambiante et 1 mL d'acide butanoïque y est ajouté. Après agitation, la phase organique est prélevée et la coloration est lue à 549 nm.

b) Dosage de la succinate déshydrogénase

Principe : L'enzyme activée réduit le 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP) et la phénazine méthosulfate (PMS), ce qui se traduit par une dégradation de la coloration de la solution, lue à 600 nm. La D.O. variant très rapidement, sa valeur est relevée toutes les 12 sec jusqu'à stabilisation.

Mode Opérateur : 500 µl de Tris-HCl 300 mM sont mélangés à un même volume de succinate de sodium 24 mM et de cyanure de potassium 24 mM, 5 min à 25°C, dans une cuve pour spectroscopie.

500 µL d'échantillon contenant l'enzyme sont alors prélevés et ajoutés au mélange précédent, l'ensemble incubé 1 min, à 25°C.

500 µL de DCPIP 0,24 mM et de PMS 1,2 mM sont ensuite rajoutés et la D.O. est lue à 600 nm, après 4 min de repos, toutes les 12 s jusqu'à stabilisation. Chaque essai est réalisé en triplicat.

c) Dosage des hexosamines par la méthode de Montreuil et Spik (1963)

Principe : la détermination quantitative des hexosamines est basée sur le dosage à 520 nm d'une molécule colorée, produite par réaction entre un dérivé pyrolique et le p-diméthylaminobenzaldéhyde obtenu par contact de la fraction à analyser avec l'acétone en milieu alcalin.

Mode Opérateur : Les échantillons ont été minéralisés en ajoutant 1 mL d'acide chlorhydrique HCl (12 N) à 1 mL d'échantillon, à 100 °C, pendant trois heures. La réaction est stoppée après refroidissement et centrifugation à 2500 X g pendant 15 min par neutralisation d'1 mL de surnageant avec 2 mL de NaOH (6 N). La gamme étalon a été réalisée à partir de D-glucosamine.

Dans des tubes en verre, préalablement traités à l'acide chlorhydrique 1 % et lavés à l'eau déminéralisée et distillée, ont été successivement ajoutés 2 mL d'échantillon à doser, 1 mL d'une solution d'acétylacétone (acétylacétone 14 % / carbonate de sodium anhydre 1,25 N / vol/vol) et 1 mL d'eau distillée. Les tubes sont bouchés, agités pendant 15 sec, puis placés pendant 10 min dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement dans un bain de glace, 5 mL d'éthanol 96 % ont été ajoutés. Les tubes sont placés sous agitation pendant 15 sec puis chauffés

pesé. Le poids sec de l'échantillon est ainsi déterminé par différence des deux pesées.

III.3. Etude et comparaison des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, 1153 et 104 par électrophorèse SDS-PAGE

Les protéines des enveloppes bactériennes sont dénaturées par du SDS (sodium dodécyl sulfate), qui les charge négativement, elles sont alors séparées selon leur poids moléculaire dans un champs électrique.

III.3.1. Composition des gels

Deux concentrations de gel de séparation ont été testées afin d'obtenir un profil électrophorétique complet des divers échantillons entre 10 et 200 kDa.

En effet, une concentration d'acrylamide-bisacrylamide (29 :1 ; v :v) du gel de séparation à 12 % permet la séparation de protéines dont le poids moléculaire est compris entre 10 et 100 kDa. Un gel à 7,5 % permet la séparation des protéines de 40 à 205 kDa. Le gel de concentration contient 4 % de polyacrylamide.

Afin de permettre une polymérisation homogène, le gel de séparation est recouvert d'isopropanol, qui crée l'anaérobiose. Après polymérisation, le gel de séparation est lavé puis le gel de concentration est coulé au-dessus du premier. Les peignes, formant les puits de dépôt des échantillons, sont alors placés.

III.3.2. Préparation des tampons et des échantillons

Les échantillons sont dilués dans du tampon échantillon, car la concentration en protéines ne doit pas être supérieure à 20 µg/µl afin de ne pas surcharger le gel en protéines.

Le dépôt de 20 µg de protéines se fait après chauffage de l'échantillon au bain-marie 1 mn 30 s, à 105°C. Le tampon d'échantillon joue un rôle important car il contient du SDS, qui dénature les protéines mais aussi du glycérol qui alourdit l'échantillon et du 2-β-mercaptoéthanol contre l'oxydation des protéines.

III.3.3. Coloration au Bleu de Coomassie

Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie, après fixation dans un mélange éthanol/eau/acide acétique (4 :4 :1 ; v :v :v) ; les gels sont

lavés trois fois dans de l'eau ultrapure, puis colorés une nuit dans une solution de bleu de Coomassie à 0,15%. Les gels sont alors lavés trois fois dans un bain d'eau ultrapure puis décolorés dans la solution de fixation.

III.3.4. Coloration au noir soudan

Les lipoprotéines sont révélées selon la méthode exposée par Pratt *et al.*, en 1969. Les gels sont placés une nuit dans une solution de noir soudan (à 0,5 %) contenant 20 % d'acétone et 15 % d'acide acétique. Ils sont alors décolorés quelques minutes dans une solution d'acétone-acide acétique aux mêmes concentrations.

III.3.5. Méthode de conservation des gels

Les gels sont conservés entre deux feuilles de cellophane et déshydratés à l'air 45 min (système "Gel Air Drying" de Bio-Rad).

III.4. Mise au point d'une technique de purification des protéines de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34

Pour obtenir des protéines membranaires pures, actives et étant suffisamment stables dans le temps pour être analysées, il est nécessaire de développer une technique appropriée. La première méthode mise au point, après analyse bibliographique, repose sur plusieurs étapes, qui peuvent se résumer à une extraction des protéines de la membrane, suivie de la purification des protéines extraites, avant ou après concentration des protéines.

Le suivi de la purification a été réalisé par électrophorèse en SDS-PAGE.

III.4.1. Protocole de purification des protéines membranaires de *Ralstonia eutropha* CH34

→ Concentration de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34

Les protéines de la membrane externe de la souche étudiée n'étant pas en concentration suffisante pour être purifiées, la membrane externe a été lyophilisée avant extraction.

Principe : la suspension de membrane externe est déshydratée, à -54°C, sous vide, en présence de glycérol comme cryoprotecteur.

Mode Opératoire : 3 mL de suspension membranaire sont décongelés quelques minutes à 30°C, 20 % de glycérol y sont ajoutés puis l'ensemble est lyophilisé durant une nuit. Les membranes ainsi obtenues sont remises en suspension dans 300 µL d'eau ultrapure, avant extraction.

→ Etape d'extraction des protéines membranaires :

Principe : les protéines sont extraites de la membrane externe, par action d'un détergent non dénaturant à la concentration utilisée : le n-octylpolyoxyéthylène (Rosenbusch, 1990).

Mode Opératoire : 300 µL de suspension de membrane externe sont décongelées quelques min à 30°C. 3 % de n-octylpolyoxyéthylène sont alors ajoutés à la solution. L'ensemble est incubé 1 heure à 37°C, sous forte agitation,

puis centrifugé à 100 000 X g, 30 min, à 4°C, afin d'éliminer les débris membranaires et les protéines non solubilisées. Le culot est remis en suspension dans 300 µL de tampon TRIS pH=8,00 et les surnageants sont récupérés, puis étudiés par électrophorèse SDS-PAGE à 12 % de polyacrylamide.

Le surnageant contenant les protéines extraites de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 est concentré, avant purification par filtration sur gel.

→ **Concentration des protéines membranaires extraites**

Principe : les protéines extraites sont concentrées par précipitation par action du polyéthylène glycol (PEG) ou du sulfate d'ammonium. Après centrifugation, les protéines, concentrées dans le surnageant, sont purifiées par chromatographie.

Mode Opératoire : 30 % puis 60 % de sulfate d'ammonium ou 10 puis 25 % de PEG sont ajoutés successivement à la suspension protéique. L'ensemble est incubé à 4°C pendant deux heures et centrifugé à 20000 X g, pendant 10 min (Schink et Schlegel, 1979). Les protéines constituant les culots et surnageants ainsi obtenus sont purifiées par chromatographie de filtration sur gel.

→ **Purification des protéines membranaires de *Ralstonia eutropha* CH34**

Principe : les protéines extraites et concentrées sont séparées les unes des autres par chromatographie de filtration sur gel sous haute pression.

Présentation du matériel et mode opératoire :

➤ Protocole de séparation des protéines membranaires par chromatographie de filtration sur gel :

Les protéines extraites sont injectées manuellement (injecteur Rhéodyne) sur des boucles d'injection calibrées à 200 µL, sur une colonne de filtration sur gel G3000swxl (TOSHAAS). Les protéines sont séparées dans un tampon phosphate, pH=7,00, en fonction de leur poids moléculaire.

La purification des protéines est suivie à 254 et 280 nm.

D'autre part, entre deux passages d'échantillons, la colonne est rééquilibrée avec le tampon d'élution. La pression interne du système est surveillée et détermine la fréquence des lavages additionnels du système.

➤ Présentation du matériel de Chromatographie Liquide Haute Performance :

L'outil chromatographique utilisé est composé des sous-unités suivantes :

- Unité centrale/contrôleur : *600S Controller (Waters)* ;
- Détecteur : *Photodiode Array Detector 996 (Waters)* ;
- Cellule du détecteur : *en peek*, de volume 10 μL ;
- Pompe : *626 Pump (Waters)* ;
- Collecteur : *Model 2128 fraction Collector (Bio-Rad)* ;
- Matériaux biocompatibles : tubulure en *peek* ;
- Logiciel de Pilotage, Acquisition et Traitement des données : *Millenium*.

L'HPLC et les solutions sont maintenus à environ 10°C dans le cadre de la purification protéique.

III.4.2. Suivi de la purification par électrophorèse SDS-PAGE

Le suivi de purification a été réalisé en séparant les protéines en solution, selon leur poids moléculaire, après dénaturation par action du SDS sur un gel de polyacrylamide. Elles ont été révélées par coloration à l'argent ou au bleu de Coomassie, selon la concentration en solution.

III.5. Identification et rôle de la protéine de 45 kDa, mise en évidence au niveau de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE des enveloppes des trois souches bactériennes testées ont mis en évidence une protéine membranaire entre 41 et 47 kDa, dont l'expression est constitutive en absence de fer, chez *Ralstonia eutropha* 104. Cette souche ne possédant pas les mégaplasmides de résistances aux métaux lourds, nous nous sommes attachés à comprendre le rôle de cette protéine plus exprimée en absence qu'en présence de fer.

Après comparaison des profils électrophorétiques des membranes obtenues à partir de cultures en présence et en absence de fer ferrique, nous avons réalisé un suivi cinétique d'absorption du fer et des métaux lourds sur les membranes externes.

III.5.1. Rôle de la protéine de 45 kDa : méthode de dialyse

Principe : une suspension d'1 mg de membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104 est placée, en présence de sidérophores et de fer dans un sac à dialyse. L'ensemble est déposé dans 50 mL d'eau suprapure. Après 48 heures à 4°C, sous agitation, la quantité de métal fixée correspond à la différence entre le métal introduit et le métal libre. La membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 a été utilisée comme témoin négatif.

Cette même expérience a été conduite sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104 en utilisant le cadmium, le zinc et le cobalt, afin de mieux comprendre la relation entre ces deux transports.

L'ajout de sidérophores est nécessaire à la réalisation de cette expérience, car ils sont indispensables au transport du fer, mais leur implication est soupçonnée dans le transport des métaux.

Mode Opérateur :

a. Obtention de la membrane externe

Après avoir obtenu la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 et 104, cultivées en présence ou non de fer (Falla *et al.*, 1988), 1mg de cette fraction est placée dans un sac à dialyse.

b. Obtention des sidérophores

Des études, utilisant des sidérophores, ont été menées avec des surnageants de culture (Gilis *et al.*, 1998).

Ainsi, *Ralstonia eutropha* 1153 (souche qui surproduit alcaligine E) a été ensemencée dans deux litres de milieu spécifique, carencé en fer. Après centrifugation à 5000 X g, 35 min, le surnageant contenant les sidérophores est récupéré et filtré sur un filtre 0,22 µm. Il est aliquoté, lyophilisé et conservé à – 20°C. Il est remis en suspension dans un volume d'eau suprapure cinquante fois inférieur au volume initial. 1mL de cette solution est ajouté au sac à dialyse contenant la fraction de membrane externe.

c. Métaux testés

Les concentrations testées ont été de 1 à 15 ppm pour le fer et de 1 à 3 ppm pour le cobalt, le zinc et le cadmium. Pour obtenir ces concentrations, des solutions mères à 1 mg de métal/mL ont été réalisées, dans de l'eau suprapure. Le volume final de dilution a été de 1 mL pour chaque métal et chaque concentration, placé dans le sac à dialyse.

d. Mise en place du suivi de dialyse

La figure 10 schématise le montage réalisé pour l'étude de l'accumulation des métaux par la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104.

Chaque sac à dialyse a été remplis par :

- 1 mg de membrane externe
- 1 mL de surnageant de culture, contenant des sidérophores
- 1 mL de métal entre 1 et 15 ppm pour le fer III, 1 à 3 ppm pour les métaux lourds

Ils sont fermés, placés dans un bécher contenant 50 mL d'eau suprapure et agités pendant 48 heures, à 4°C.

La concentration en métaux lourds libres est alors déterminée par spectrométrie d'absorption atomique, à l'extérieur du sac à dialyse.

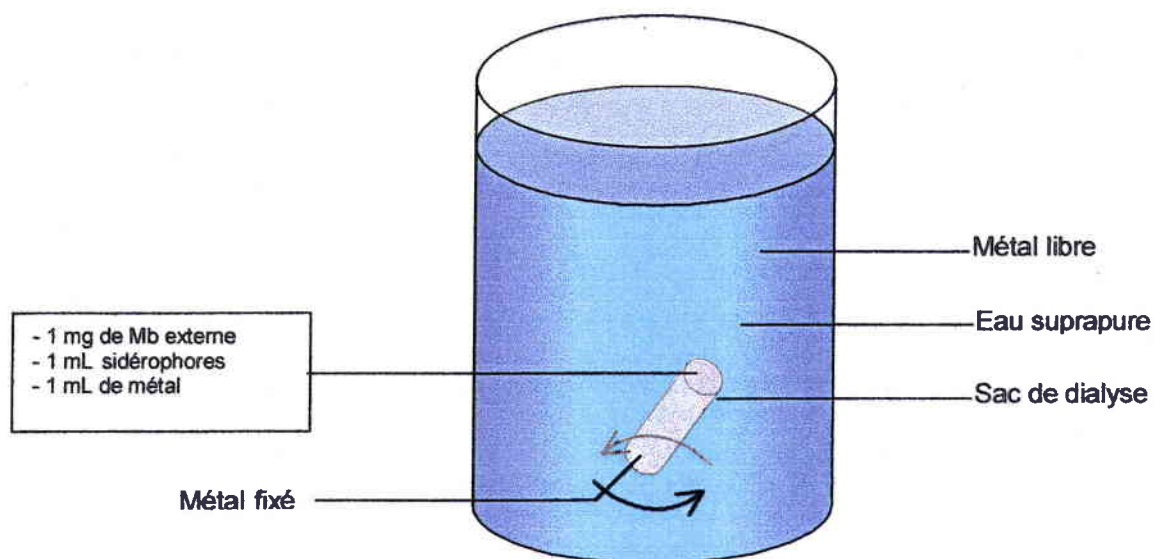


Figure 3 : schématisation du montage réalisé pour l'accumulation des métaux lourds par la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104 et CH34.

e. Dosage par spectroscopie d'absorption atomique

Le spectromètre utilisé est un Spectra AA (Varian).

Le fer a été dosé à 248,3 nm, le cobalt à 240,7 nm, le zinc à 213,9 nm et le cadmium à 248,8 nm. Des droites étalons ont été réalisées à partir de citrate d'ammonium ferrique pour le fer et de chlorures pour les trois autres métaux.

III.6. Identification des protéines composant le système *czc* chez *Ralstonia eutropha* par méthode immunologique

La dernière partie de cette étude a eu pour objectif d'identifier le système de résistance aux cobalt, zinc, cadmium. Les protéines de ce système n'étant pas suffisamment exprimées dans les enveloppes bactériennes pour être purifiées et analysées, nous avons produit des anticorps, initiés par des séquences aminées de chacune des protéines du système.

Principe : Les protéines composant le système *czc*, de résistances aux cadmium, zinc et cobalt, seront identifiées dans chacune des enveloppes de la paroi de *Ralstonia eutropha*, par production d'anticorps polyclonaux, dirigés contre chacune de ces quatre protéines et produits à partir de séquences d'acides aminés sélectionnées et révélés par Western Blotting.

III.6.1. Sélection des séquences d'acides aminés

Les acides aminés ont été sélectionnés après analyse de la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN de 6881 pb, contenant le déterminant *czc* (Nies et Silver, 1989).

Les acides aminés hydrophiles et hydrophobes ont été identifiés, les gènes *czc A*, *B*, *C*, *D* déterminés sur ce fragment. Des séquences de douze acides aminés ont été sélectionnées, selon leur pourcentage de bases hydrophiles, afin de potentialiser la réponse immunitaire.

Les séquences synthétisées (Anéosystem, Illkirch, France) ont été injectées à des lots de trois souris.

III.6.2. Matériel biologique

Des lots de trois souris BALB/c, de neuf semaines au début du traitement, ont été utilisés pour chaque protéine à identifier.

III.6.3. Préparation et injections des immunogènes

La première injection a été réalisée en intrapéritonéal, avec une émulsion de 200 µL d'un mélange : antigène et adjuvant complet de Freund (1 : 2 ; v : v).

Deux rappels ont été réalisés, ensuite, à deux semaines d'intervalle, en intrapéritonéal, avec un mélange : antigène : adjuvant incomplet de Freund (1 :2 ; v :v). Un dernier rappel de 25 µg d'antigène (mélangé à de l'adjuvant incomplet de Freund) a été réalisé en intraveineuse, trois jours avant sacrifice.

III.6.4. Obtention des sérums

Le sang est récupéré, puis placé quatre heures à 4°C, il est centrifugé 10 min à 1500 X g. Les sérums sont alors prélevés et regroupés par lot, supplémentés avec un volume équivalent de glycérol et conservés à -20°C

III.6.5. Analyse des sérums par Western Blot

Afin d'identifier et de localiser les protéines reconnues par les anticorps, l'ensemble des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, *Ralstonia eutropha* 1153 et *Ralstonia eutropha* 104 ont été testées.

Principe : sous l'effet d'un champ électrique, les protéines des enveloppes, séparées par électrophorèse, sont transférées à partir du gel sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) réceptrice, d'une porosité 0,22 µm. Les anticorps polyclonaux sont alors mis en présence de la membrane et se fixent à la partie antigénique de la (des) protéine(s) qui l'ont induit. Un second anticorps marqué à la phosphatase alcaline est alors fixé à l'anticorps « primaire ». Ce complexe est révélé par un mélange de p-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) et de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine (BCPIP) (Blake *et al.*, 1984).

Mode Opératoire : Avant le transfert des protéines, la membrane est activée dans du méthanol, pendant 1 min, puis équilibrée dans de l'eau ultrapure. La membrane reste immergée jusqu'au transfert car séchée, les protéines ne se transfèrent pas uniformément dessus.

Le gel et la membrane sont mis en contact, le transfert des protéines est induit dans un tampon Tobwin (Tobwin *et al.*, 1979) contenant 0,1 % SDS, sous 100 V, pendant 1 h 30 min, à 4°C.

La membrane est ensuite lavée trois fois dans du Tampon TRIS (TRIS Buffer Saline), 5 min, et les sites non spécifiques sont bloqués dans une solution de TBS

- tween 1%, une nuit, sous agitation. Après lavage, la membrane est placée en présence de l'anticorps primaire (contenu dans le sérum), une heure à 37°C. Après lavage, la membrane est incubée dans une solution de TBS, contenant l'anticorps secondaire (anti-IgG, couplé à la phosphatase alcaline).

Elle est rincée trois fois dans un mélange TBS-tween 0,5 %, puis deux fois dans du TBS, afin d'éliminer de la membrane les traces de tween. La liaison antigène – anticorps est révélée dans un mélange NBT- BCPIP.

Plusieurs concentrations d'anticorps primaires ont été testées afin de déterminer la dilution la plus appropriée :

- 1/1000^{ème}
- 1/2000^{ème}
- 1/5000^{ème}
- et 1/10000^{ème}

C'est cette dernière dilution qui a été retenue pour l'ensemble de ces tests.

III.7. Perspectives : Mise en évidence du passage du fer ferreux par le système de résistance czc

Nous avons émis l'hypothèse que la pompe qui expulse les cations bivalents : cadmium, zinc et cobalt pourrait être induite non par un gradient de protons mais par un gradient de fer ferreux.

Afin de confirmer ou non cette hypothèse, nous avons vérifié que le milieu de culture contient une quantité significative de fer II. En effet, le gluconate de sodium, utilisé comme source de carbone est un réducteur et la stérilisation du milieu par chauffage à 120°C, pendant 20 min, pourrait favoriser la réduction du fer ferrique en fer ferreux.

Principe : le fer total et le fer ferreux ont été dosés, selon la norme AFNOR NF T 90.017 de 1982, dans le milieu de culture à trois niveaux :

- Avant ajout de fer, afin de déterminer si le milieu en contient
- Avant autoclave
- Après autoclave

La concentration en fer ferrique est obtenue par différence entre le fer total et le fer ferreux.

Mode Opérateur : pour le dosage du fer total, l'échantillon est acidifié à pH=1,00 par ajout d'acide sulfurique. En ce qui concerne le fer ferreux, l'échantillon est acidifié suivant le même protocole, 50 mL sont alors prélevés et chauffés à 100°C, pendant 40 min, en présence de peroxydisulfate de potassium. Après refroidissement, le volume d'échantillon est ajusté à 50 mL avec de l'eau ultrapure.

5 mL de chaque échantillon sont prélevés, 200 µL d'acétate d'ammonium et 100 µL de chlorhydrate d'hydroxamine y sont additionnés. L'ensemble est incubé pendant 15 min, à l'obscurité, puis la densité optique est lue à 510 nm.

Une courbe étalon a été réalisée, entre 0 et 2 mg/L de fer, sous forme de fer citrate d'ammonium.

IV. RESULTATS ET ANALYSE

IV.1. Vérification de la pureté des souches

IV.1.1. Objectif

Avant d'étudier les protéines des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, 104 et 1153, la pureté des souches a été vérifiée.

Un ensemble de tests a été réalisé au début de cette étude pour confirmer l'intégrité des souches utilisées. Ainsi, les souches ont été cultivées sur milieux sélectifs, en pression métallique. Une galerie Api 20 NE et une coloration de Gram, ont été réalisées.

Tableau IV : résultats des différents tests réalisés pour l'identification de *Ralstonia eutropha*

Tests réalisés	<i>Ralstonia eutropha</i> CH34 – 1153 et 104
Aspect des colonies sur milieu sélectif	Colonies rondes, crème-rosée, plus foncée en présence de fer
Coloration de Gram	Bâtonnets droits, GRAM-
Milieu sélectif enrichi en Ni et Zn à 2 mM	Développement de colonies
Milieu sélectif enrichi en fructose	Pas de développement
Réduction de nitrates en nitrites	+
Formation d'indole à partir du tryptophane	-
Fermentation du glucose	-
Hydrolyse de l'arginine	-
Hydrolyse de l'urée par l'uréase	-
Hydrolyse de l'esculine	-
Hydrolyse de la gélatine	-
Hydrolyse du p-nitro-phényl- β D-galactopyranoside	-
Assimilation du glucose	-
Assimilation de l'arabinose	-
Assimilation du mannose	-
Assimilation du mannitol	-
Assimilation du N-acétyl-glucosamine	-
Assimilation du maltose	-
Assimilation du gluconate	+
Assimilation du caprate	+
Assimilation de l'adipate	+
Assimilation du malate	+
Assimilation du citrate	-
Assimilation du phényl-acétate	-

IV.1.2. Résultats et discussion

Le tableau IV résume les résultats obtenus pour chacune des souches.

Ces résultats sont en accord avec la bibliographie (Mergeay *et al.*, 1985 ; Sadouk et Mergeay, 1993), les souches testées présentent toutes les caractéristiques de *Ralstonia eutropha*. Aucune contamination n'a été mise en évidence dans chacune des cultures développées.

IV.2. Suivi de la croissance bactérienne – choix du milieu de culture

IV.2.1. Objectif

La composition du milieu de culture est d'une importance primordiale, car il influence la composition protéique des enveloppes (Neilands, 1982 ; Fein, 2000 ; Andrès *et al.*, 2000). En effet, le système de transport du fer est exprimé seulement si la bactérie croît dans un milieu carencé en fer (Hartmann et Braun, 1981 ; Mergeay *et al.*, 1985 ; Diels *et al.*, 1995). De même, le système de résistance *czc* ne sera pas ou faiblement exprimé en absence des métaux lourds qui l'induisent.

IV.2.2. Protocole

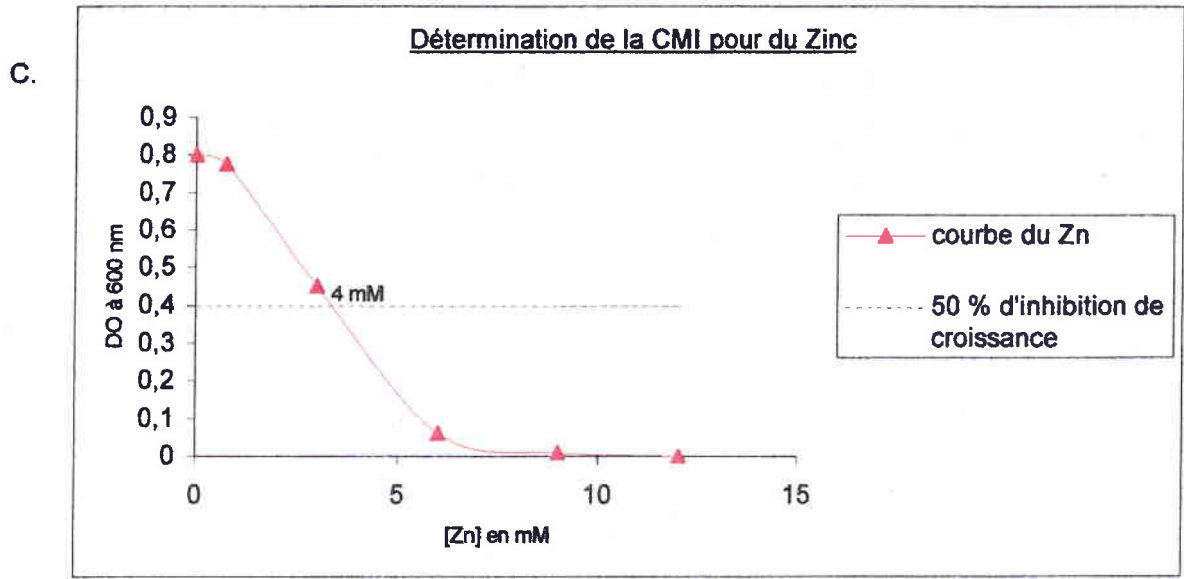
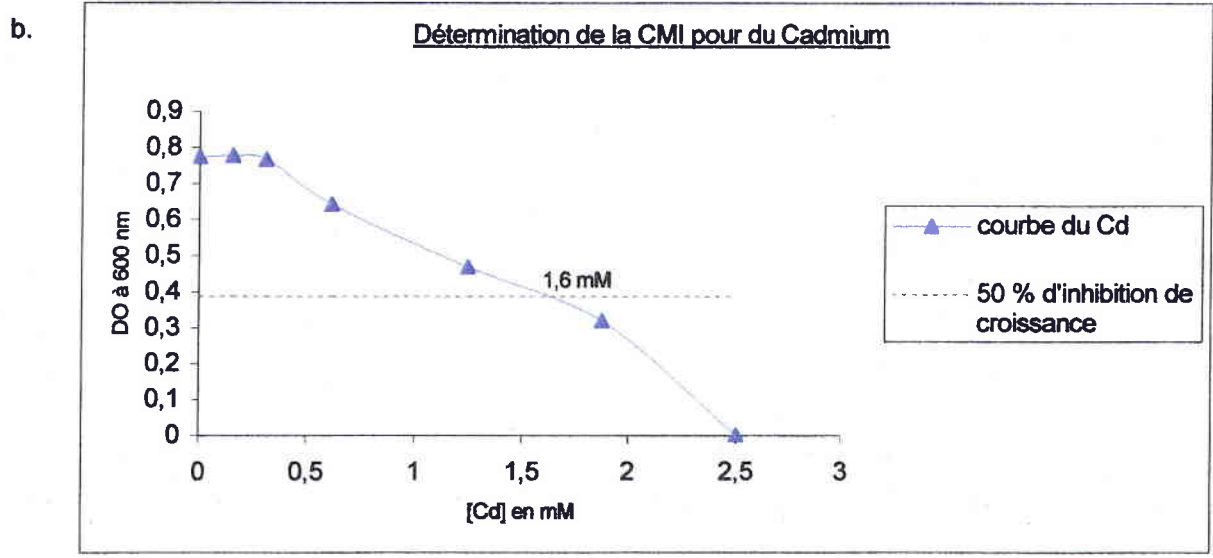
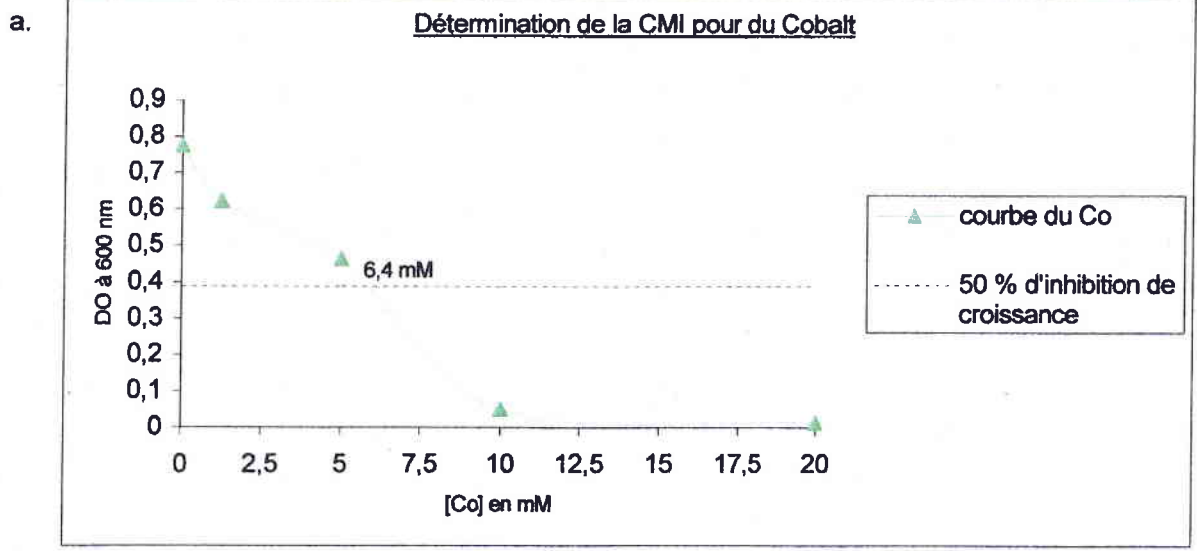
Des études préalables, réalisées au laboratoire, ont mis en évidence plusieurs points importants, qui nous ont permis d'optimiser les conditions de cultures :

- l'ajout d'un mélange d'oligo-éléments « SL7 » optimise la croissance bactérienne d'environ 20 %, sans influencer la production de sidérophores (suivi pas le test CAS) de façon significative
- dans tous les cas, la biomasse est maximale après 72 heures de culture, à 30°C, sous agitation.

Ralstonia eutropha CH34 a été cultivée en présence de différentes concentrations de cobalt, de zinc ou de cadmium, afin de déterminer la concentration minimale d'inhibition (ou CMI), dans les mêmes conditions de culture (figures 11 a, b, c).

IV.2.3. Résultats et discussion

Les concentrations minimales d'inhibition ont ainsi été déterminées pour chaque métalloïde, elles sont respectivement de 6,4 mM ; 1,6 mM et 4 mM pour le cobalt,



Figures 11 : détermination des concentrations minimales d'inhibition du cobalt (11a), cadmium (11b) et du zinc (11c)

le cadmium et le zinc. Au vu de ces résultats, les cultures en « pressions métalliques » ont été réalisées en présence de 5 mM de cobalt ou 1 mM de cadmium, ou 3 mM de zinc, afin de ne pas réprimer la croissance bactérienne. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes (Siddiqui et Schlegel, 1987 ; Mergeay, 1990).

Dans la suite de cette étude toutes les souches de *Ralstonia eutropha* ont, donc, été cultivées dans un milieu TRIS-Gluconate, carencé ou supplémenté en fer ou en métaux, pendant 72 heures, à 30°C et sous agitation. Le volume d'inoculation a été 1/100 du volume de culture final. Ces paramètres ont été fixés afin d'améliorer la répétabilité des résultats obtenus.

IV.3. Fractionnement des enveloppes cellulaires de *Ralstonia eutropha* CH34, suivi de pureté

IV.3.1. Objectif

Les structures des enveloppes des bactéries à GRAM (-) sont bien connues, ainsi que les techniques d'isolement de ces structures. Le but de cette partie est de pouvoir analyser leurs caractéristiques générales, leur arrangement, les relations entre elles et aussi d'étudier les mécanismes d'accumulation et de transport.

Dans cette étude, nous avons utilisé le protocole de Falla *et al.*, 1988, légèrement adapté à nos souches bactériennes. Par cette méthode nous souhaitons obtenir les trois fractions (membrane externe, peptidoglycane et membrane cytoplasmique) pures, avec un bon rendement. Pour évaluer la pureté et la perte du matériel biologique, des marqueurs spécifiques ont été dosés.

IV.3.2. Protocole expérimental

Les enveloppes bactériennes ont été purifiées, comme le schématise la figure 1, paragraphe II (matériels et méthodes). Brièvement, la membrane externe a été obtenue par induction d'un choc osmotique (sucrose 0,5 M). Le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique ont été obtenus à partir des muréinoplastes. Le premier, a été isolé en déstabilisant la membrane cytoplasmique avec un détergent. La membrane cytoplasmique a été obtenue après destruction du peptidoglycane par action de lysozyme, suivi d'un choc osmotique.

Des marqueurs spécifiques (KDO, activité SDH) et non spécifiques (hexosamines, protéines) ont été dosés.

IV.3.3. Résultats et discussion

Le tableau V résume les résultats obtenus pour chacun de ces marqueurs, à partir des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34 :

Tableau V : dosage des marqueurs spécifiques et non spécifiques, ramenés au poids sec

Fraction isolée	Membrane externe	Peptidoglycane	Membrane cytoplasmique
KDO ($\mu\text{mol/mg}$ poids sec)	$91,4 \pm 4,6$ soit 98,4 %	$0,55 \pm 0,07$ Soit 0,6 %	$0,89 \pm 0,02$ soit 1 %
SDH (UI/mg poids sec)	$0,49 \pm 10^{-3}$ soit 0,73 %	0	$62,65 \pm 0,12$ soit 99,22 %
Héxosamines ($\mu\text{g/mg}$ poids sec)	$0,16 \pm 0,002$ soit 11,5 %	$1,13 \pm 0,003$ soit 82 %	$0,09 \pm 0,009$ soit 6,5 %
Protéines (mg/mg de poids sec)	$4,95 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,07 \times 10^{-2}$

N.B. : chaque dosage a été réalisé en triplicat pour chaque échantillon

Les résultats obtenus avec le KDO montrent qu'il est principalement présent dans les fractions contenant la membrane externe et que les concentrations trouvées dans les deux autres fractions sont négligeables (inférieures ou égales à 1%). En effet, il est cent fois plus concentré dans les membranes externes que dans les autres enveloppes. Ces résultats sont en accord avec ceux exposés par Booth et Curtis (1977), qui ont travaillé sur l'obtention des enveloppes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, mais également par Falla (1990) chez *Pseudomonas fluorescens*.

En effet, ces auteurs ont obtenu des résultats comparables, avec une faible contamination des muréinoplastes par la membrane externe. D'ailleurs, Nikaido et Vaara, en 1985, ont également relaté la difficulté d'obtenir un rendement de 100%, chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Le tableau V démontre que la membrane externe a été obtenue avec un bon rendement (98,4 %). Cette observation confirme que le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique n'ont pas été contaminés par la membrane externe, au cours de l'isolement (moins de 1 % de KDO dosé dans ces enveloppes). Par ailleurs, Hoyle et Beveridge (1983), avaient obtenu des fractions de peptidoglycane dépourvues de contaminations par la membrane externe.

Concernant l'activité SDH, marqueur spécifique de la membrane cytoplasmique (Kasahara et Anraku, 1974), dosée dans chaque enveloppe, seule cette fraction présente une activité significative (99,22 % de l'activité totale). Ces

résultats sont en accord avec ceux obtenus par Falla en 1990, ils tendent à montrer que la membrane cytoplasmique a été isolée avec un très bon rendement, tout en conservant ses propriétés.

Par contre, Booth et Curtis (1977) et Hancock et Nikaïdo (1978) ont trouvé une contamination d'environ 15 % dans la membrane externe.

Les hexasamines, se situent essentiellement dans le peptidoglycane, cependant elles entrent également dans la composition de la membrane externe. En effet, cette enveloppe contient un dérivé de glucosamine (Prescott *et al.*, 1995). Cette dernière observation peut expliquer le pourcentage de 11,5 % d'hésoxamines, qui ont été dosées dans cette fraction. Toutefois, cette concentration est environ 7 fois supérieure dans le peptidoglycane.

Les résultats obtenus en terme de protéines montrent que la membrane externe contient près de 4 fois plus de protéines par mg de poids sec que la membrane cytoplasmique, ce qui est en accord avec la bibliographie des bactéries à GRAM négatif (Yamato *et al.*, 1975 ; Thorne *et al.*, 1973 ; Osborn *et al.*, 1972). D'autres auteurs, comme Booth et Curtis en 1977, et plus récemment Falla, en 1990, qui ont étudié respectivement *P.aeruginosa* et *P.fluorescens*, ont trouvé des concentrations similaires de protéines dans ces deux enveloppes. Ces différences trouvent une explication dans la variabilité de composition des enveloppes d'une espèce bactérienne à l'autre. Aussi parce que *Ralstonia eutropha* CH34 et souches dérivées sont cultivées en pression métallique ou en absence de fer, ce qui pourrait induire une surexpression des protéines dans cette membrane.

Ces résultats tendent à démontrer que chaque enveloppe de *Ralstonia eutropha* CH34 a été obtenue avec un bon rendement (supérieur à 90 % en moyenne) et sans contamination significative des autres enveloppes. Leur composition protéique a donc été déterminée par électrophorèse SDS-PAGE.

IV.4. Analyse par électrophorèse de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 pour la mise en évidence de(s) protéine(s) de transport du fer

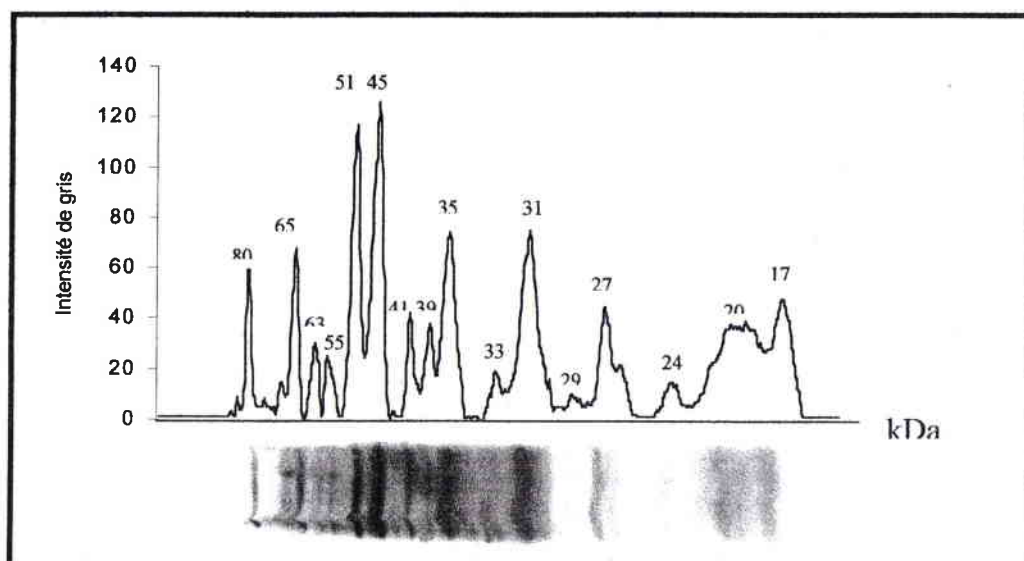
IV.4.1. Objectif

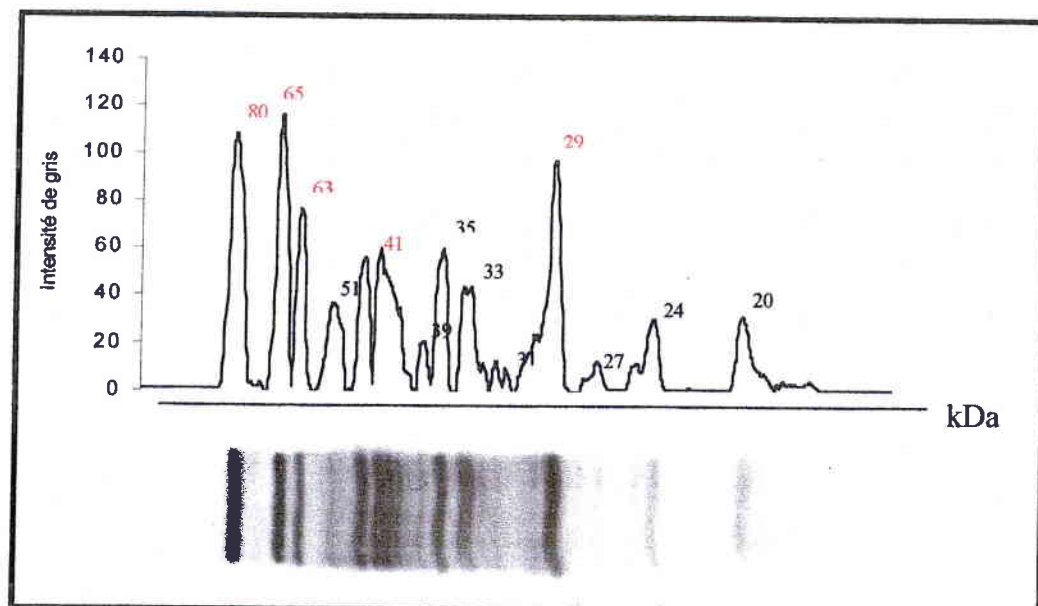
Afin de mieux comprendre l'influence du fer sur la composition protéinique des enveloppes bactériennes, des bactéries cultivées en absence et en présence de fer ont été utilisées comme matériel biologique pour l'obtention de leur membrane externe. Les profils protéiniques de ces fractions ont été comparés par électrophorèse SDS-PAGE.

IV.4.2. Protocole

Ces profils électrophorétiques ont été obtenus à partir d'un gel de polyacrylamide à 12 %, en présence de SDS qui dénature les protéines. Ce gel permet de visualiser des protéines dont le poids moléculaire est compris entre 14,5 et 120 kDa. Les fractions membranaires ont été diluées dans du tampon Laemmli, pour avoir une concentration de protéines de 20 µg par puit. Ce tampon, qui contient du SDS et du β-mercaptoéthanol, permet de dénaturer les protéines membranaires, en chauffant l'échantillon 1min 30, à 100°C. Après migration les protéines sont colorées au bleu de Coomassie. Les figures 12 A et B présentent les profils obtenus ainsi qu'un spectre de densité. Les bandes protéiques sont transformées en intensité de gris, par un logiciel : Optilab (National Instrument TM).

A



B

Figures 12 A et B : profils électrophorétiques et spectres de densité de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34, cultivée avec (12A) et sans (12B) fer

IV.4.3. Résultats et discussion

Nous pouvons remarquer en comparant ces deux spectres d'intensité, qu'au moins cinq protéines sont sur-exprimées, quand les bactéries sont cultivées en absence de fer. Ces protéines sont respectivement de 29, 41, 63, 65 et 80 kDa. La dernière de ces protéines pourrait correspondre au récepteur du complexe sidérophore-fer. En effet, Gilis *et al.* (1996), a identifié le récepteur du complexe alcaligine E-fer à 83,5 kDa. La bibliographie concernant *Ralstonia eutropha* CH34 n'a cependant pas mis en évidence des protéines pouvant correspondre aux quatre autres protéines.

Toutefois, plusieurs protéines de la membrane externe ont été identifiées chez d'autres souches bactériennes, dans les mêmes conditions opératoires (carence en fer). En effet, cinq protéines comprises entre 51 et 95 kDa, sont surproduites chez *Bordetella pertussis* (Connell *et al.*, 1998). D'autre part, Guerinot rappelle en 1994, que certaines souches synthétisant ou fixant plusieurs sidérophores différents (comme *Pseudomonas aeruginosa* qui produit des récepteurs de ferripyocheline, ferripyoverdine et ferrienterobactine), produisent entre trois et six protéines dans la membrane externe. En se basant sur cette dernière observation, nous pouvons supposer que *Ralstonia eutropha* CH34 pourrait produire non pas un mais plusieurs sidérophores ou qu'elle

synthétise des récepteurs lui permettant de capter des sidérophores d'autres souches bactériennes.

Cette hypothèse peut, par ailleurs, être étayée par les travaux de Münzinger *et al.* (1999), qui a purifié et déterminé, par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, la structure d'un sidérophore majeur, produit par *Ralstonia eutropha* 1153 : la staphyloferrine B. Ce sidérophore est de type citrate, contrairement à Alcaligine E, sidérophore mis en évidence par Gilis *et al.* (1996 et 1998), dont le groupement de liaison au fer III est un phénolate.

Pour confirmer la surexpression de plusieurs protéines dans la membrane externe des bactéries cultivées en absence de fer, des anticorps monoclonaux ont été produits en utilisant cette membrane comme immunogène (Melchior *et al.*, 2001). Plusieurs hybrides plus ou moins spécifiques ont été obtenus (11 hybrides), deux ont été retenus (ELISA), pour leur **spécificité exclusive** pour la souche CH34.

Tableau VI : Réaction immunologique des anticorps monoclonaux produits par les deux hybridomes retenus (AE5/7 et AE5/9) avec différentes souches dérivées de *Ralstonia eutropha* CH34 par ELISA.

souches			hybridomes	
Nom	Référence	Plasmides	AE5/7	AE5/9
<i>Ralstonia eutropha</i> CH34 cultivée en absence de fer	Mergeay <i>et al.</i> (1978)	pMOL 28 (180 kb) pMOL 30 (238 kb)	+++	+++
<i>Ralstonia eutropha</i> CH34 cultivée en présence de fer	Mergeay <i>et al.</i> (1978)	pMOL 28 (180 kb) pMOL 30 (238 kb)	+	+
<i>Ralstonia</i> sp. strain AE 104	Mergeay <i>et al.</i> (1985)	No plasmids	-	-
<i>Ralstonia</i> sp. strain AE 126	Mergeay <i>et al.</i> (1985)	pMOL 28 (180 kb)	-	-
<i>Ralstonia</i> sp. strain AE 128	Mergeay <i>et al.</i> (1985)	pMOL 30 (238 kb)	-	-
<i>Ralstonia</i> sp. strain JMP 134		pJP4	-	-
<i>Ralstonia</i> sp. strain CH34	Transconjugant AE194 X AE245	pMOL 28 (180 kb) pMOL 30 (238 kb)	+	+
<i>Ralstonia</i> sp. strain AE 81	Lejeune <i>et al.</i> (1983)	pMOL 28 (180 kb) pMOL 30 (238 kb)	+	+
<i>Ralstonia</i> sp. strain AE 43	From Pr. Mergeay (1998)	pMOL 28 □43 pMOL 30 (238 kb)	-	-

+++ : forte détection; + : faible détection; - : pas de détection

Cet anticorps reconnaît une protéine de 41 kDa, plasmides-dépendante et surexprimée en absence de fer. A partir de cette observation, il se dégage l'hypothèse suivante :

→ Il existe au moins une protéine, dans les enveloppes cellulaires, impliquée dans les systèmes de transport de fer et de résistances aux métaux.

Aussi, cette protéine de 41 kDa, sera utilisée comme marqueur antigénique spécifique de la souche *Ralstonia eutropha* CH34.

Cette première étape a mis en évidence au moins cinq protéines membranaires, synthétisées par *Ralstonia eutropha* CH34, cultivée en absence de fer, dont une est un marqueur antigénique de la souche. Il est important d'identifier la (ou les) protéine(s) réceptrice(s) du complexe sidérophore-fer, parmi ces protéines. C'est pourquoi, nous avons comparé les profils électrophorétiques des membranes externes de deux souches dérivées de *Ralstonia eutropha* CH34 :

- *Ralstonia eutropha* 104, souche qui ne contient pas les mégaplasmines, n'exprime donc pas les systèmes de résistance *czc* et *cnr*
- *Ralstonia eutropha* 1153, mutant qui présente exactement les mêmes caractéristiques que la souche mère, mais qui surexprime la production du sidérophore (Gilis *et al.*, 1998).

De plus, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique de ces souches ont été purifiés et étudiés par électrophorèse afin de compléter le schéma protéinique de ce transport.

Enfin, la comparaison des enveloppes de *Ralstonia eutropha* 104 et 1153, cultivées en pression métallique, contribuera à mettre en évidence les protéines constituant le système *czc*.

IV.5. Comparaison des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, 104 et 1153, pour l'identification des protéines impliquées dans les transport de fer et de résistance *czc*

IV.5.1. Analyse des protéines des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, 104 et 1153 par électrophorèse SDS-PAGE

a. Objectifs

Cette partie de l'étude a eu pour objectif d'établir définitivement le profil protéinique des enveloppes bactériennes de *Ralstonia eutropha* CH34, 1153, 104. Deux types de protéines peuvent être révélées :

les premières interviennent dans le transport du fer ferrique, les secondes permettent à la bactérie d'expulser le cobalt, le zinc et le cadmium, ce qui rend les souches possédant ce type de protéines résistantes aux métaux (Diels *et al.*, 1995 ; Mergeay, 1990).

b. Protocole

Chacune des souches a été cultivée dans les conditions de culture suivantes :

- *Ralstonia eutropha* CH34 a été cultivée dans un milieu spécifique et en présence de fer. Elle constitue un témoin négatif dans l'identification de ces protéines ;
- *Ralstonia eutropha* 104 a été cultivée en absence de fer, afin de surexprimer le transport du fer. Cette souche étant dépourvue des mégaplasmides de résistances, elle constitue le témoin positif ;
- *Ralstonia eutropha* 1153 a été cultivée en absence de fer et en pression métallique, afin d'optimiser l'expression des systèmes *czc* et de transport du fer ferrique

Deux électrophorèses ont été réalisées pour analyser la composition protéinique de ces enveloppes : le gel de séparation de la première à 12% de polyacrylamide (permet l'analyse des protéines de 14, 5 à 120 kDa), le seconde à 7,5 % (permet l'analyse des protéine de 39,5 à 205 kDa). De plus, dans les deux cas un gel de concentration à 4 % a été utilisé.

Ces deux concentrations en polyacrylamide ont été choisies pour les raisons suivantes :

- les protéines de transport de fer identifiées à ce jour se situent entre 17 kDa (monomère) et 185 kDa (hexamère), selon les unités considérées (Higgs *et al.*, 1998).
- Celles composant le système *czc*, sont sous forme dimériques (sauf *czc D*) : de 39 et 40 kDa pour chaque sous-unité de *Czc C* (Große *et al.*, 1999), jusqu'à 120 kDa pour *Czc A* (Nies et Silver, 1989).

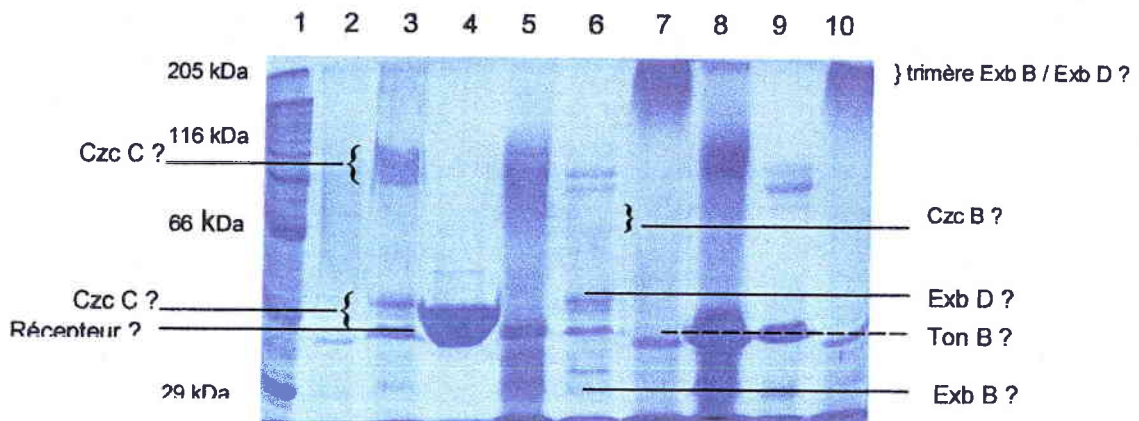


Figure 13 : électrophorèse à 7,5 % des enveloppes bactériennes

- 1 : standards de poids moléculaire : 29 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 91 kDa, 116 kDa, 205 kDa.
- 2 : membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34
- 3 : membrane externe de *Ralstonia eutropha* 1153
- 4 : membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104
- 5 : peptidoglycane de *Ralstonia eutropha* CH34
- 6 : peptidoglycane de *Ralstonia eutropha* 1153
- 7 : peptidoglycane de *Ralstonia eutropha* 104
- 8 : membrane cytoplasmique de *Ralstonia eutropha* CH34
- 9 : membrane cytoplasmique de *Ralstonia eutropha* 1153
- 10 : membrane cytoplasmique de *Ralstonia eutropha* 104

c. Résultats et discussion

• Analyse des membranes externes

La figure 13 montre, tout d'abord, le profil protéinique des membranes externes. Dans le cas de *Ralstonia eutropha* 1153, nous observons clairement deux protéines de 41 et 45 kDa respectivement, non détectées dans la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 cultivée en présence de fer. Ces protéines pourraient correspondre aux formes monomériques des deux sous-unités de *Czc*

C, que la bibliographie identifie à environ 39 et 41 kDa respectivement (Rensing *et al.*, 1997).

Cependant, *Ralstonia eutropha* 104 surexprime une protéine (ou un ensemble de protéines) de même poids moléculaire (dépôt 4) ; il est difficile de déterminer précisément son poids moléculaire (entre 41 et 47 kDa). Il peut s'agir d'un multimère car l'électrophorèse a été réalisée dans des conditions dénaturantes, ce qui pourrait expliquer la largeur de la bande protéique. Son poids moléculaire serait alors supérieur à 82 et 94 kDa, ce qui serait en accord avec le poids moléculaire du récepteur de sidérophore-fer de *Ralstonia eutropha*, mais également d'autres souches bactériennes comme *Escherichia coli* ou *Pseudomonas fluorescens*, identifiés dans la bibliographie (Guerinot, 1994 ; Schalk *et al.*, 1999 ; Higgs *et al.*, 1998). Les profils électrophorétiques de la membrane de *Ralstonia eutropha* 104, issue de culture en présence et en absence de fer ont été réalisés afin de vérifier l'influence du fer sur l'expression de cette protéine (figure 14a) :

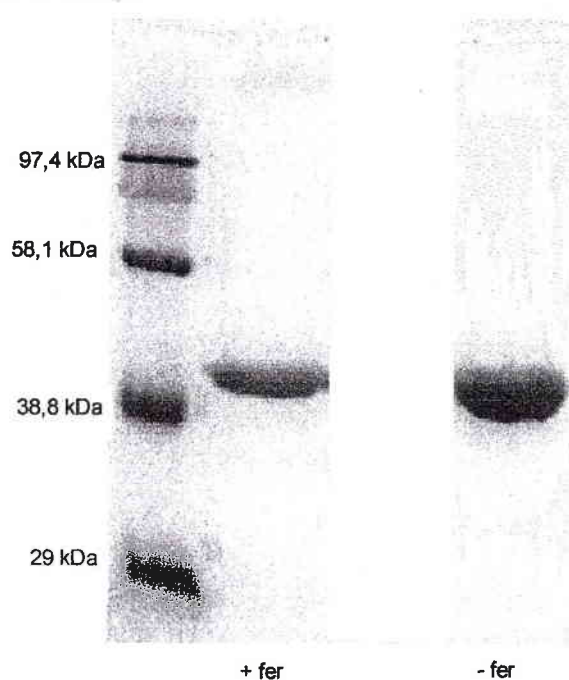


Figure 14a : électrophorèse de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, issue de cultures avec et sans fer

Cette électrophorèse révèle que la protéine de 41-47 kDa est surproduit en absence de fer, ce qui confirme que le fer régule négativement son expression.

La concentration de cette protéine par rapport à l'ensemble des autres protéines membranaires, ainsi que l'allure de la bande protéinique, révélée par

une coloration au bleu de Coomassie, pourrait indiquer la présence d'une protéine majoritaire : une porine ou une protéine de Braun (analyse bibliographique sur la composition de la membrane externe). Plusieurs tests ont été réalisés pour vérifier ou écarter cette hypothèse.

- Nature de la protéine de 45 kDa au niveau de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104

Afin de vérifier si cette protéine est une protéine majoritaire, deux électrophorèses supplémentaires ont été réalisées :

- La première a eu pour objectif de déterminer si cette protéine est une porine trimérique (figure 14b) : le premier profil a été obtenu à partir d'un échantillon, dilué dans du tampon Laemmli et chauffé 1 min 30, à 100°C, le second n'a pas été chauffé. Les porines, sous forme de trimère dans le membrane externe, restent sous cette forme quand l'échantillon n'est pas chauffé, mais passent sous forme monomérique dès 70°C (Lakey et Pattus, 1989 ; Trieschmann *et al.*, 1996, Achouak *et al.*, 2001).

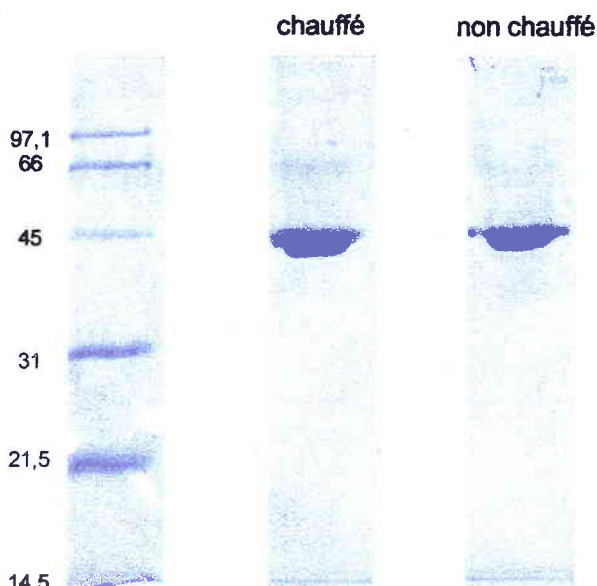


Figure 14b : électrophorèse de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104 chauffée et non chauffée

L'analyse de cette électrophorèse confirme, d'une part la surproduction d'une protéine membranaire d'environ 45 kDa, chez *Ralstonia eutropha* 104. D'autre

part, la chaleur n'a aucune influence sur la structure de cette protéine, son poids moléculaire restant le même avant ou après chauffage.

Cette dernière observation tend à confirmer que si cette protéine est une porine, elle ne peut être que monomérique.

- la seconde électrophorèse a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires, puis le gel a été coloré au noir soudan (figure 15). Ce colorant permet de révéler spécifiquement les groupements lipidiques des lipoprotéines (Pratt *et al.*, 1969). Hors les protéines de Braun, protéines majeures qui relient la membrane externe au peptidoglycane, contiennent un groupement lipidique (Pelmont, 1993 ; Prescott *et al.*, 1995).

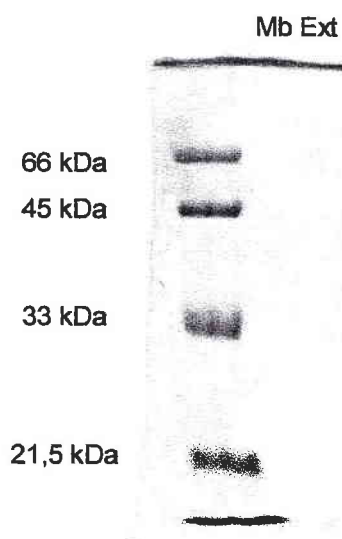


Figure 15 : électrophorèse de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, colorée au noir soudan

Le premier puit présente les standards de poids moléculaire, dans le second une suspension de membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, à la même concentration que le gel précédent, a été déposée. Comme la figure 15 le montre, aucune protéine n'a été révélée par coloration au noir soudan. Cette absence de coloration prouve que la protéine membranaire d'environ 45 kDa, mis en évidence chez *Ralstonia eutropha* 104, ne présente pas de groupement lipidique. Nous pouvons en conclure que ce n'est pas une protéine de Braun.

Ces résultats nous ont permis de remarquer plusieurs points importants dans la compréhension du rôle de cette protéine :

- deux bandes protéiques d'environ 41 et 45 kDa apparaissent au niveau de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 1153, cultivée en absence de fer et en pression métallique, mais à des concentrations moins importantes.
- une protéine d'environ 45 kDa est surproduite chez *Ralstonia eutropha* 104, en absence de fer
- elle n'est ni une porine trimérique, ni une protéine de Braun, protéines majeures de la membrane externe des bactéries à GRAM négatif
- enfin *Ralstonia eutropha* 104 ne possédant pas les mégaplasmines de résistances pMOL28 et pMOL30, cette protéine ne peut être liée aux mécanismes de résistances aux métaux lourds.

Toutes ces observations nous ont amené à supposer que cette protéine peut être liée au transport du fer, la souche ayant été cultivée en absence de fer. Elle pourrait correspondre à une forme monomérique d'un récepteur sidérophore-fer, bien que ces récepteurs soient couramment identifiés entre 70 et 85 kDa. Le récepteur d'alcaligine E a été identifié à 83,5 kDa chez *Ralstonia eutropha* CH34 (Gillis *et al.*, 1996). Cependant, un récepteur du complexe fer-transferrine, de 42 kDa, a été identifié chez *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Modun *et al.*, 1998 ; Modun et Williams, 1999). Or, le sidérophore majeur produit par *Ralstonia eutropha* CH34, la staphyloferrine B est aussi produite par différentes souches de *Staphylococcus* (Münzinger *et al.*, 1999).

Cette protéine pourrait aussi correspondre à une protéine membranaire, dont l'expression est régulée par le système Fur-fer II. En effet, de nombreuses études ont révélé que la protéine Fur (en présence de fer ferreux comme co-facteur) régule directement ou indirectement de nombreux gènes, dont certains ne sont pas liés au transport de fer (Ochsner et Vasil, 1996 ; Escolar *et al.*, 1998). Par exemple, près de 90 gènes régulés par Fur ont été identifiés chez *Escherichia coli* (Hantke, 1999), codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme, la réponse au stress oxydatif, ou comme facteurs de virulence.

Nous avons mis au point une méthode de purification de protéine membranaire afin d'isoler cette protéine (paragraphe IV.6.).

Nous avons, de plus, réalisé un suivi d'absorption du fer par cette membrane, traduit par un modèle mathématique de type isotherme.

- Analyse des fractions de peptidoglycanes et membranes cytoplasmiques

Au niveau du peptidoglycane et des membranes cytoplasmiques des trois bactéries, nous pouvons observer (figure 13) :

- les profils obtenus à partir des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, révèlent, après coloration au bleu de Coomassie, des bandes protéiniques de poids moléculaires compris entre 80 et 105 kDa. Plusieurs études ont clairement détaillé l'existence d'un complexe trimérique, dimérique ou monomérique du couple Exb B – Exb D, selon l'étape du mécanisme où elles interviennent (Higgs *et al.*, 1998 ; Moeck et Coulton, 1998) et selon l'obtention de l'échantillon protéique.

- De plus, un ensemble de protéines d'environ 185 kDa sont révélées dans la membrane cytoplasmique et le peptidoglycane de *Ralstonia eutropha* 104. Elles pourraient correspondre au complexe trimérique Exb B - Exb D, ancré dans la membrane cytoplasmique, s'étendant jusqu'au peptidoglycane et qui intervient dans le déplacement de Ton B jusqu'à la membrane externe (Higgs *et al.*, 1998).

Plusieurs bandes protéiques peuvent correspondre à ces formes monomériques de Exb B et Exb D :

- des bandes de 17, 33 et 48 kDa apparaissent au niveau des fractions de peptidoglycane, qui correspond aux poids moléculaires donnés par la bibliographie pour Exb D, selon la configuration de cette protéine comme monomère, dimère ou trimère (Higgs *et al.*, 1998) ;
 - une protéine de 29 kDa est présente dans le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique. Après analyse bibliographique, elle pourrait correspondre à la protéine Exb B.
- Les profils protéiques ainsi obtenus révèlent l'apparition d'une bande 39 kDa au niveau du peptidoglycane, bande également visualisée au niveau des membranes cytoplasmiques de *Ralstonia eutropha* CH34 et 1153. Ces bandes pourraient correspondre à la protéine Ton B, identifiée chez *Escherichia coli* à 36 kDa (Higgs *et al.*, 1998).

- Enfin, deux protéines de 110 et 120 kDa, au niveau de la membrane cytoplasmique, sont exprimées par *Ralstonia eutropha* 1153, mais elles sont absentes du profil protéinique de *Ralstonia eutropha* 104 et CH34. Cette souche ayant été cultivée en absence de fer et en pression métallique, nous pouvons supposer que cette protéine intervient dans le mécanisme de résistance aux « métaux lourds » *czc*.

Ainsi, si nous nous basons sur le système *czc*, détaillé dans l'analyse bibliographique, ces protéines peuvent correspondre à la protéine Czc A, ancrée dans le membrane cytoplasmique, elle s'étendrait dans le peptidoglycane et serait à la base du système de la « pompe » *czc* (Nies et Silver, 1989 ; Diels *et al.*, 1995 ; Taghavi *et al.*, 1997). D'autre part, le profil obtenu avec la membrane cytoplasmique révèle une troisième bande, proche de 80 kDa, qui pourrait correspondre, à une partie tronquée de la protéine (dépourvue de sa partie périplasmique).

L'analyse par électrophorèse des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, 104 et 1153 a permis de mettre en évidence plusieurs protéines qui pourraient intervenir dans le transport du fer et le système de résistances aux métaux lourds, *czc*. Cependant cette identification reste approximative et empirique. Afin de démontrer le système *czc*, nous avons produit des anticorps polyclonaux spécifiques de chaque protéine qui le compose, à partir d'un fragment d'acides aminés de leur séquence ADN.

Notre étude s'est donc orientée autour de deux axes :

- l'étude de la protéine de 45 kDa au niveau de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104
- la confirmation du modèle *czc*

IV.6. Purification de protéines de la membrane externe de *Ralstonia eutropha*, impliquées dans le transport de fer

IV.6.1. Objectif

Afin d'étudier les protéines membranaires, impliquées dans le transport de fer, et plus particulièrement le récepteur sidérophore-fer, une méthode de purification a été mise au point. Cette partie détaille l'évolution de la technique jusqu'à obtention du protocole final. En effet, les premiers tests, réalisés sur *Ralstonia eutropha* CH34 ont démontré la nécessité de travailler avec des protéines membranaires surexprimées, naturellement ou non. En raison de la structure membranaire et des propriétés des protéines qu'elle contient, la purification et la stabilisation en milieux liquide est un exercice compliqué qui nécessite des concentrations protéiques importantes (Popot, 1999).

IV.6.2. Protocole : Optimisation de la méthode

Après analyse bibliographique, la purification de protéines membranaires à partir de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* a été décomposée en trois étapes, qui ont dû être optimisées :

- a. l'extraction des protéines membranaires d'autres constituants membranaires
- b. la purification de la protéine à étudier de l'ensemble des protéines extraites
- c. une étape de concentration est souvent nécessaire, particulièrement dans le cas de protéines membranaires, d'origine bactérienne. Cette dernière étape peut être une étape intermédiaire entre les deux précédentes ou intervenir après l'étape de purification.

Deux modes d'extraction sont couramment mis en œuvre pour cette première partie. Notre choix s'est porté sur un détergent non ionique, ayant un coefficient de formation de micelles faible et n'absorbant pas en UV : le n-octylpolyoxyéthylène (Rosenbusch, 1990).

Cependant, des solvants ont également été testés, choisis selon leur polarité : le 1,2-dichloroéthane, l'acétate d'éthyle et un mélange phénol :chloroforme :acide isoamylique. Les résultats, non présentés ici, ont mis en évidence une forte dénaturation des protéines membranaires ainsi extraites (déterminé par chromatographie de filtration sur gel).

Dans la première série d'expériences, la suspension de membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 a été extraite en présence de 4 % de n-octylpolyoxyéthylène, une heure, sous forte agitation, à 37°C (Rosenbusch, 1990). L'ensemble est alors centrifugé à 100 000 X g, pendant 30 minutes, à 4°C, le surnageant contient les protéines solubilisées, entourées de micelles de détergent (Rosenbusch, 1990 ; Achouak *et al.*, 1998). Elles ont alors été purifiées par chromatographie d'échanges anioniques forts, puis elles sont étudiées par électrophorèse (Figure 16).

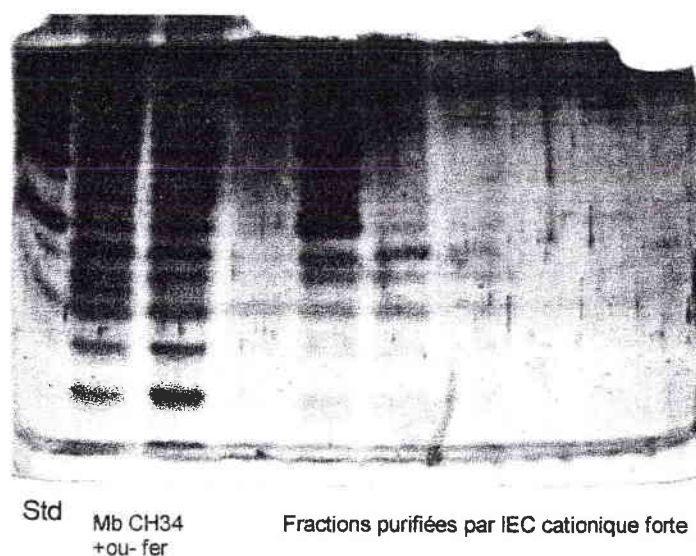


Figure 16 : électrophorèse en SDS-Page de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 et des protéines après purification

Les protéines ainsi séparées ont été colorées à l'argent, coloration cent fois plus sensible que le bleu de Coomassie (Merril, 1990). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette faible quantité protéique :

1. une concentration initiale de protéines insuffisante ;

2. les protéines membranaires n'ont pas été correctement extraites et sont précipitées au cours de l'étape de centrifugation ;
3. une quantité importante de protéines sont perdues au cours de l'étape de purification, le gradient ne permettrait pas de décrocher correctement les protéines de la colonne chromatographique.

Pour pallier ce problème nous avons testé deux méthodes de concentration, avant et après extraction :

- avant extraction, les membranes ont été lyophilisées en présence de glycérol et remises en suspension dans un volume dix fois inférieur au volume initial ;
- les protéines ont été concentrées après extraction par précipitation. Deux composés ont été testés : le sulfate d'ammonium et le polyéthylèneglycol.

Le tableau VII présente l'évolution des protocoles et le mode opératoire finalement mis en œuvre :

ETAPES	PROTOCOLE 1	PROTOCOLE 2	PROTOCOLE 3	PROTOCOLE 4	PROTOCOLE 5
Obtention des membranes externes	Isolement de la membrane externe par Choc osmotique, puis centrifugation (Falla, 1990)				
Extraction des protéines de la membrane externe	* 2-4 % de nPOE est ajouté aux Mb externes, 1h, à 37°C * puis centrif. à 100 000 X g, 30 min, 4°C : protéines extraites dans le surnageant	* mb externes dans 4% nPOE + 1mM PMSF, une nuit, 4°C. * puis centrif. à 100 000 Xg, 30 min, 4°C, les prot extraites dans le surnageant	* 5 extractions successives par nPOE 4%, 1 mM PMSF, 1h, à 37°C. (pour déterminer si plusieurs extractions sont nécessaires à l'extraction de toutes les protéines membranaires)	* une extraction par nPOE 4%, 1 mM PMSF, 1 h, à 37°C.	* 1 extraction par nPOE 4%, en présence d'antiprotéases, 2 h, à 37°C.
Concentration des protéines	<u>Avant extraction</u> : ->lyophilisation avec 20% glycérol (final) <u>Après extraction</u> : ->les protéines ont été concentrées par précipitation au PEG et au sulfate d'ammonium	* même protocole que le protocole 1	* filtration sur un filtre micron à 14000 X g, 20 min après les étapes d'extraction et de purification	* filtration sur un filtre micron à 14000 X g, 20 min après les étapes d'extraction et de purification	* Concentration après dialyse par un gel d'absorption à travers la membrane de dialyse * les protéines membranaires sont dialysées pour diminuer la [détergent] et éviter les problèmes d'agrégation.
Purification des protéines extraites	Les protéines extraites sont purifiées par chromatographie de filtration sur gel ou cationique fort	Ajout de détergent dans le tampon d'élution pour éviter l'agrégation des protéines	Purification par chromatographie IEC anionique faible, gradient entre 0-1 M NaCl	Purification par chromatographie IEC anionique faible, gradient entre 0-0,5 M NaCl	Purification par chromatographie IEC anionique faible, gradient entre 0-0,5 M NaCl
Electrophorèse	Suivi de chaque étape par électrophorèse SDS-PAGE (Laemmli, 1970)				
RESULTATS	->Les prot séparées en filtration sur gel semblent agrégées ou dénaturées -> [prot] insuffisante après purification pour obtenir des résultats en électrophorèse	->L'électrophorèse a mis en évidence l'inefficacité de traitement au PEG et du Sulfate d'ammonium ->chromatogramme identique : GF->IEC	->une seule extraction suffisante -> toutes les protéines sont purifiées entre 0-0,4 M NaCl	-> Concentration de protéines ->Séparation partielle des prot membranaires ->Problèmes permanents d'agrégation en Gel Filtration	-> cf. figures représentant les chromatogrammes obtenues par IEC sur les protéines extraites de la membrane externe de <i>Ralstonia eutropha</i> 104.

Tableau VII : Evolution de la purification des protéines membranaires de *Ralstonia eutropha* CH34

a. Analyse du protocole 1

20 % de glycérol (comme cryoprotecteur) sont alors ajoutés à la suspension de membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 et l'ensemble est lyophilisé pendant une nuit. Elles sont remises en suspension dans un volume d'eau ultrapure, dix fois inférieur au volume initial. Les protéines sont alors extraites du reste de la membrane par action de n-octylpolyoxyéthylène, pendant une heure, à 37°C, sous agitation (Gravito et Rosenbusch, 1986 ; fiche technique BACHEM, 1996). L'ensemble est centrifugé et le culot est remis en suspension dans le même tampon puis les protéines sont concentrées avec du sulfate d'ammonium (à 30 % et 60 %) ou du polyéthylène glycol (à 10 % et 25 %). Chaque fraction a été testée en chromatographie de filtration sur gel.

Les figures 17 a, b, c et d présentent les chromatogrammes obtenus à 254 et 280 nm. Ces chromatogrammes mettent en évidence plusieurs points importants :

Premièrement : les protéines extraites par le sulfate d'ammonium à 30% sont de faible poids moléculaire (inférieur à 7 kDa), elles peuvent correspondre à des fragments de protéines, dues à une dénaturation. A moins que les protéines de faible poids moléculaire n'aient été concentrées.

Deuxièmement : le chromatogramme des protéines du culot, séparées par chromatographie de filtration sur gel, se divise en deux parties. La première entre $t=2$ min et $t=8$ min, se compose de trois pics protéiques, mal résolus et dont le poids est supérieur à 2 000 kDa. Compte tenu de ces observations, ces protéines semblent correspondre à des agrégats protéines-détergent. La seconde partie du chromatogramme, entre $t=15$ et 18 min, est comparable aux résultats obtenus avec le surnageant, les protéines séparées correspondent à des poids moléculaires inférieurs à 12 kDa.

Troisièmement : la seconde extraction au sulfate d'ammonium à 60 % donne des résultats comparables à ceux obtenus par la première extraction : les protéines qui nous intéressent ne sont pas extraites.

Quatrièmement : les résultats obtenus avec le polyéthylène glycol sont comparables à ceux obtenus avec les fractions testées, après action du sulfate

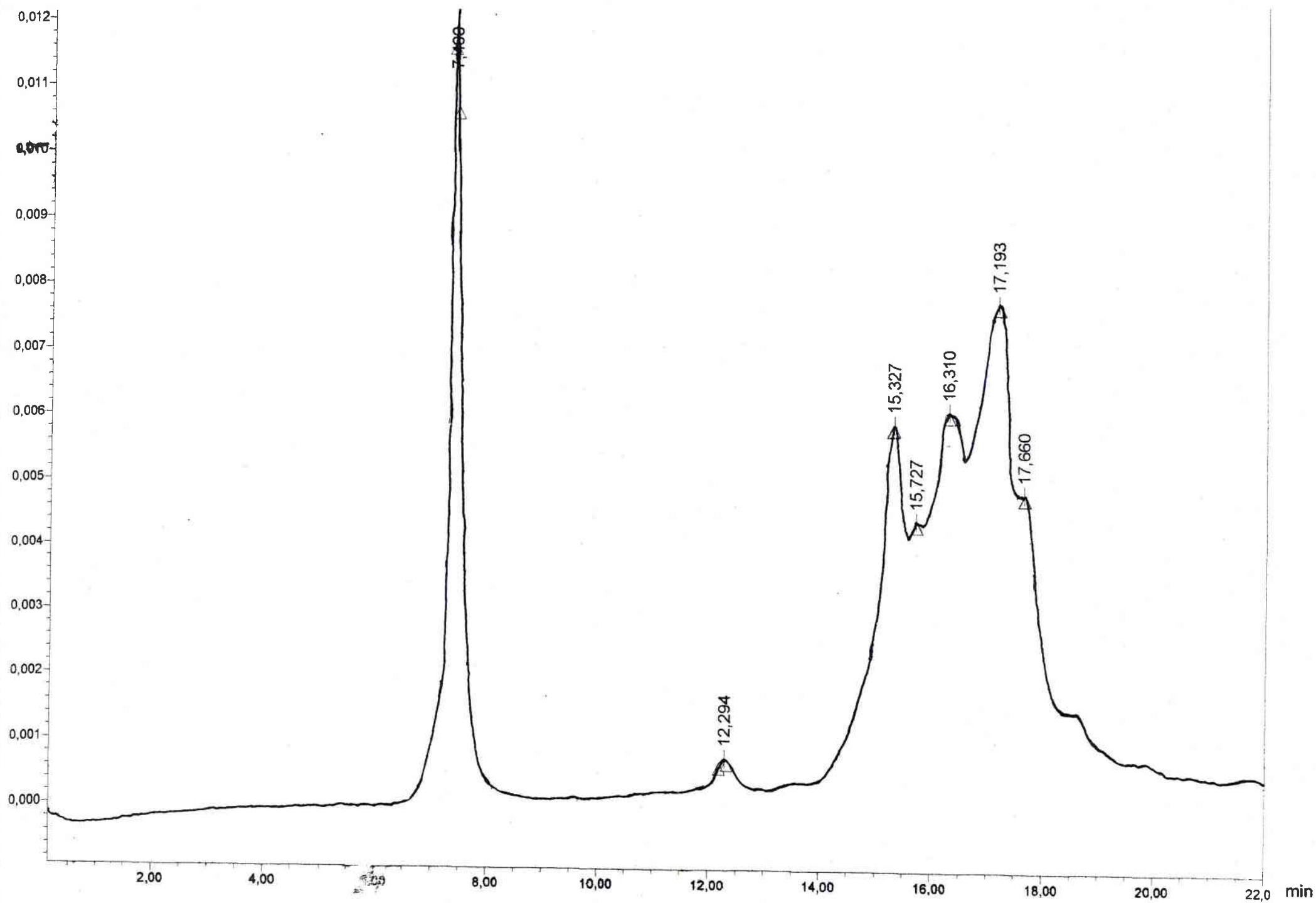


Figure 17 a : chromatogramme de purification des protéines après concentration au DFC 10 %

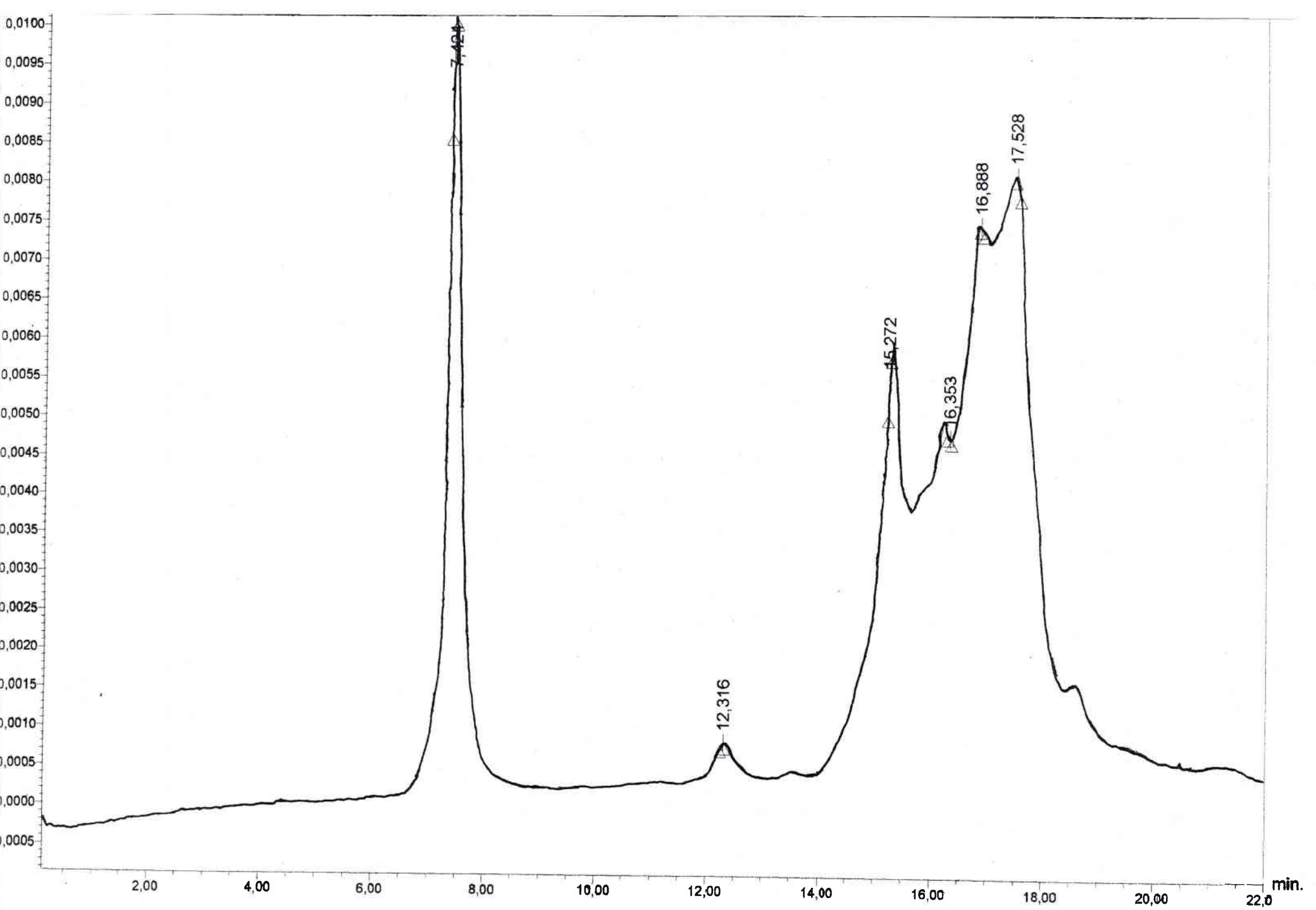


Figure 17 b : chromatogramme de purification des protéines, après concentration au PEG 25 %

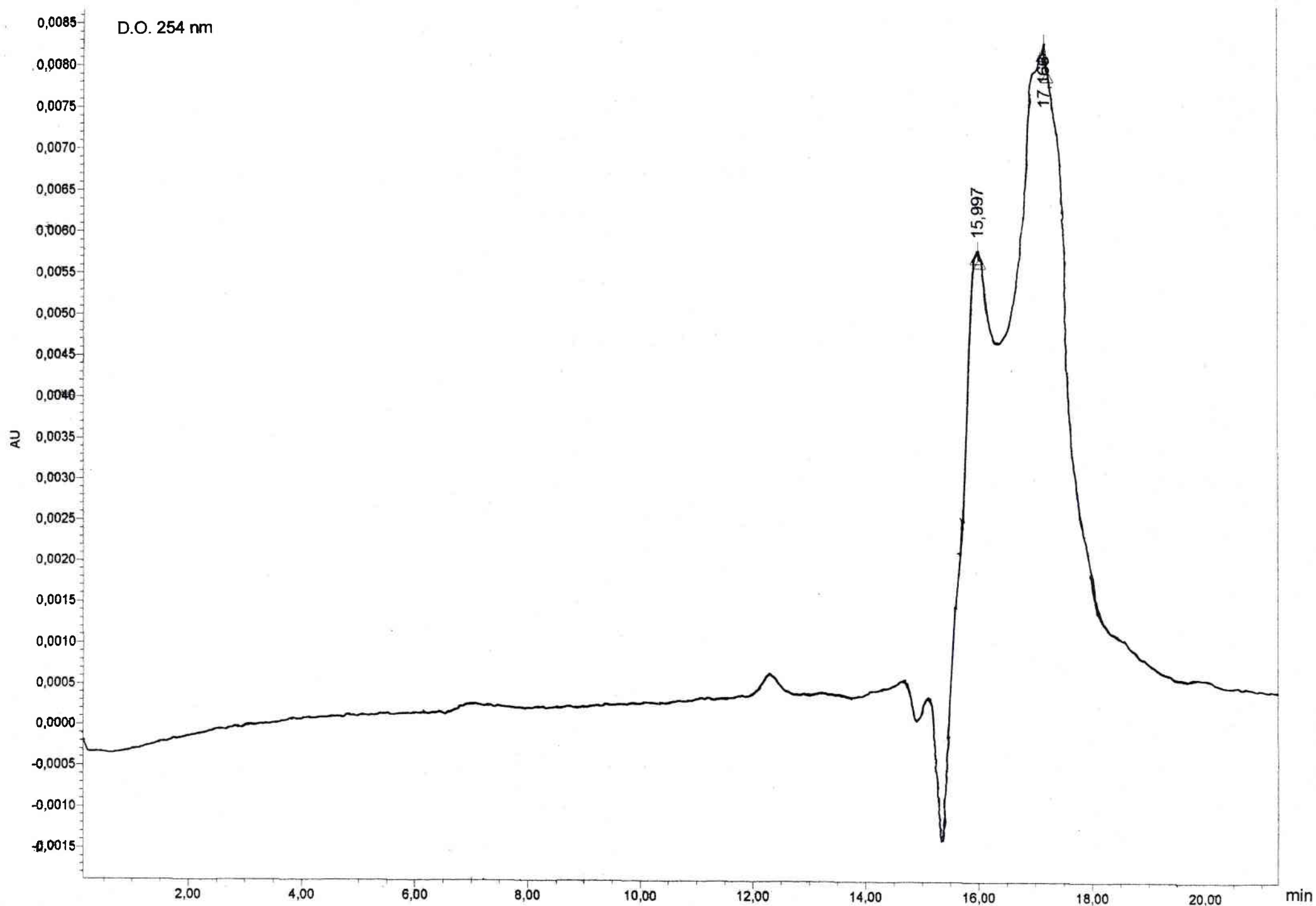


Figure 17 c : chromatogramme de purification des protéines, après concentration au sulfate d'ammonium 20 %

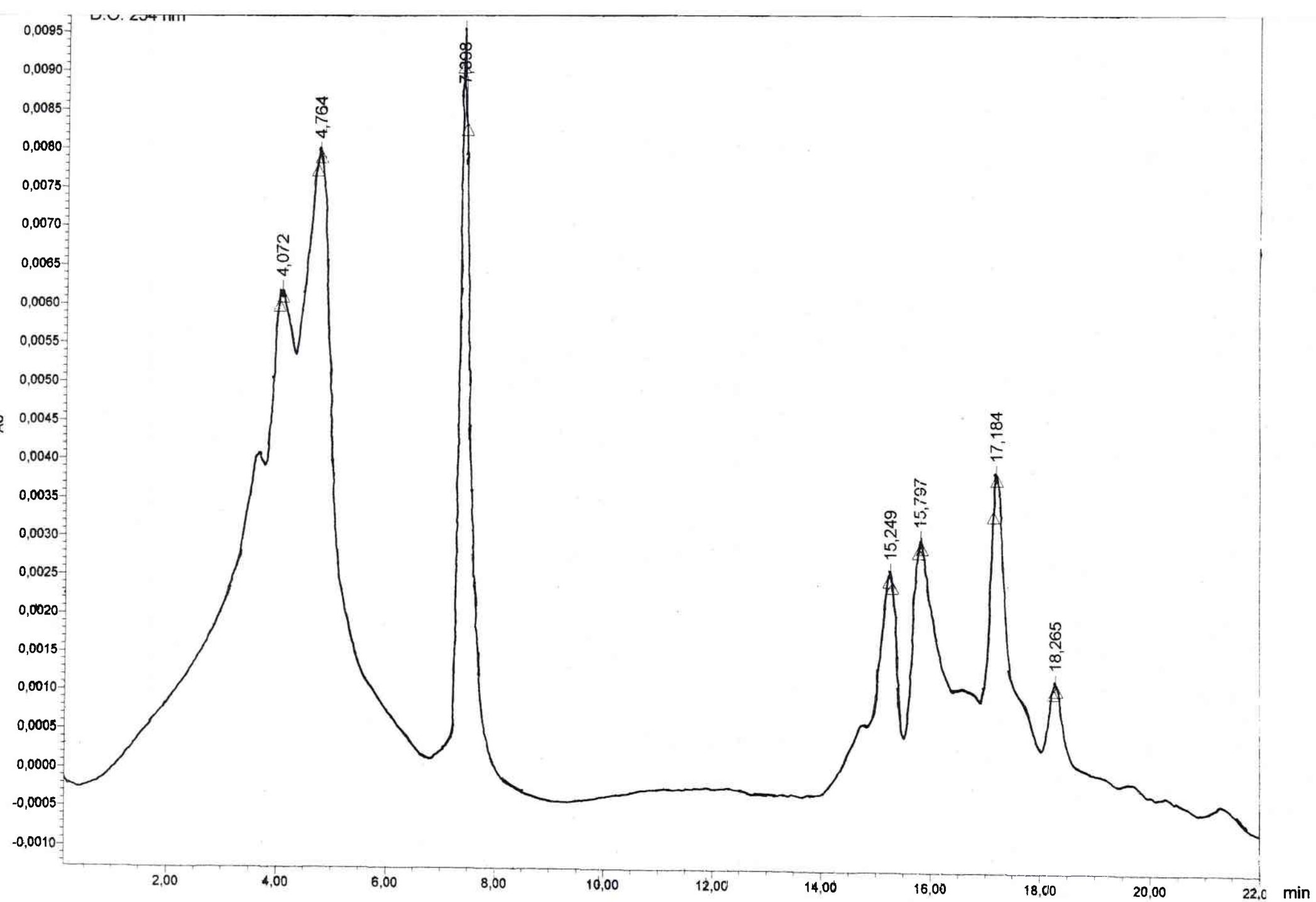


Figure 17 d : chromatogramme de purification des protéines, après concentration au sulfate d'ammonium 60 %

d'ammonium, des agrégations de protéines apparaissent de façon significative. D'autre part, des dénaturations peuvent être observées dans chaque échantillon. Cependant une protéine de 63,5 kDa est extraite dans les surnageants, obtenus après action du PEG, mais la densité optique de ce pic protéique n'est pas important et correspond à une faible concentration.

Ces résultats mettent en évidence que plusieurs étapes du protocole doivent être optimisées. Tout d'abord, nous avons observé une dénaturation des protéines, qui peut intervenir pendant l'étape de lyophilisation ou être consécutive à l'utilisation du détergent pour l'extraction. Afin de limiter cette dégradation, et de déterminer laquelle de ces étapes en est la cause, du phénylméthylsulfate à 1 mM (ou PMSF), qui a un rôle d'antiprotéases, sera ajouté au tampon d'extraction (Deutscher, 1990 ; Jascow, 1990).

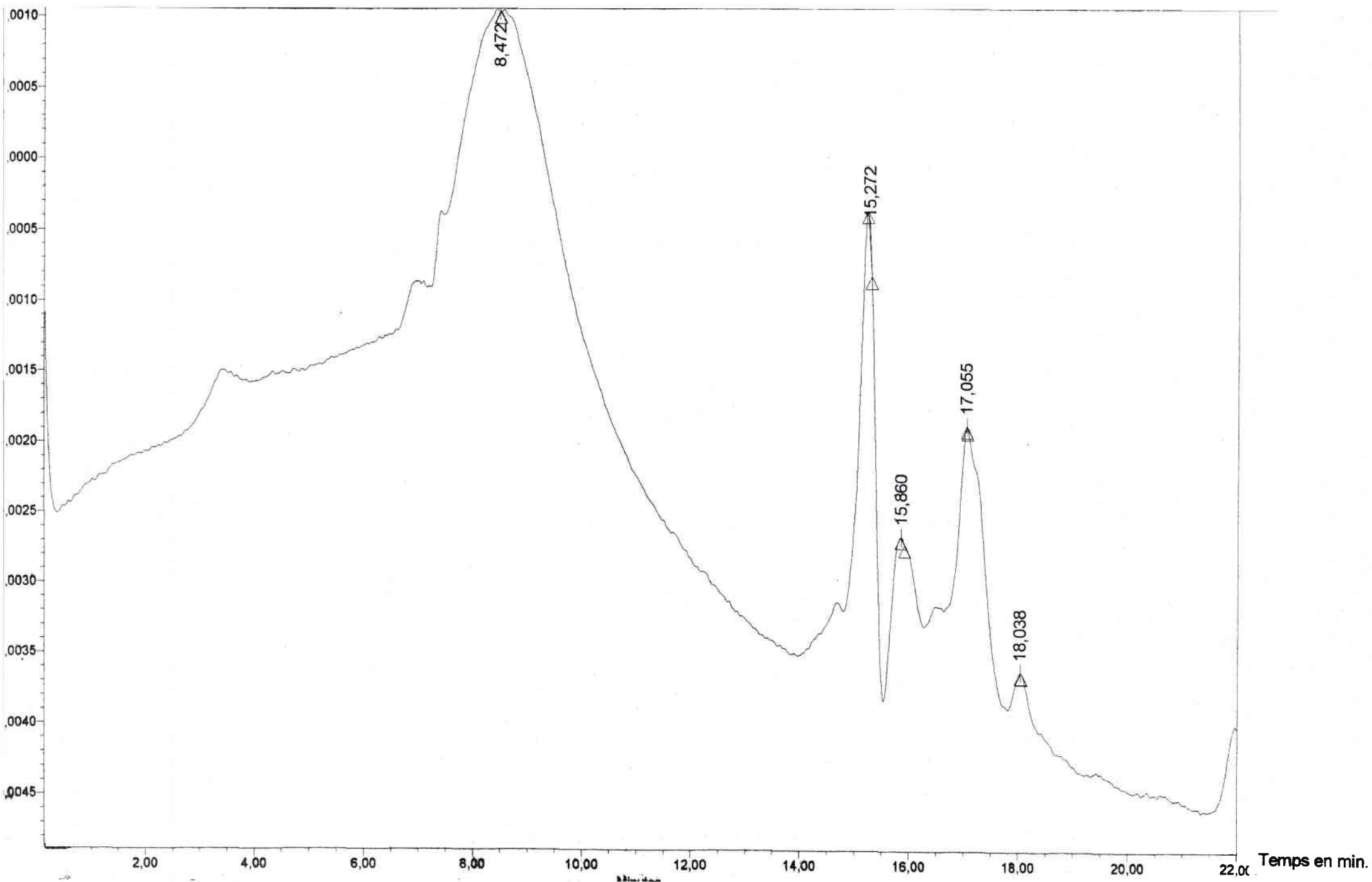
De plus, l'ensemble ne sera pas incubé une heure à 37°C, mais une nuit, à 4°C, ce qui devrait également limiter la dénaturation.

Pour pallier le problème d'agrégation, intervenant au cours de l'étape de purification, du détergent à 0,5 % (concentration minimale de formation de micelles) a été ajouté au tampon d'élution qui n'en contenait pas.

b. Analyse du protocole 2

Ce deuxième protocole a été mis en place avec les modifications exposées précédemment. Les protéines extraites ont été purifiées, par chromatographie de filtration sur gel. Le chromatogramme obtenu tend à montrer que les modifications apportées au protocole n'ont pas permis d'obtenir les résultats escomptés. En effet, nous pouvons observer, comme pour le premier mode opératoire testé, la formation d'agrégats protéiques, qui sont élués de la colonne de filtration sur gel entre t=2 et 8 min. Après 15 min, des protéines de faibles poids moléculaires sont éluées de la colonne. Les densités optiques des pics tendent à montrer que les protéines sont faiblement concentrées.

Une électrophorèse en SDS-PAGE, à 12 % a été réalisée avant purification, pour confirmer ces observations (figure 18).



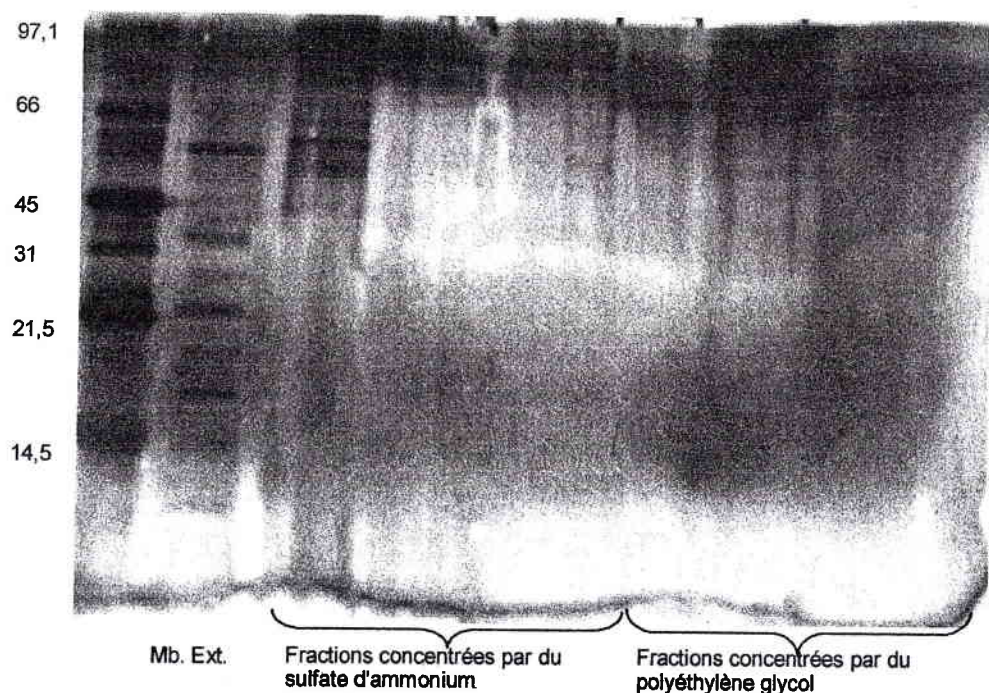


Figure 19 : Electrophorèse des protéines de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34, après extraction par du n-octylpolyoxyéthylène (protocole 2)

Premièrement, le gel a été coloré à l'argent, la quantité de protéines obtenues avant purification étant insuffisante. Ce qui est en accord avec les densités optiques des chromatogrammes obtenus en filtration sur gel.

Deuxièmement, les profils électrophorétiques mettent en évidence que les protéines sont réparties dans deux fractions, qu'elles aient été concentrées par le sulfate d'ammonium ou par le PEG.

Troisièmement, les profils électrophorétiques des protéines extraites sont comparables au profil de la membrane externe. Ainsi, les pics observés entre 2 et 8 minutes correspondent à des agrégats de protéines, malgré la présence de détergent dans le tampon d'élution. Or, le chromatographie en filtration sur gel est couramment utilisée en fin de purification, comme étape de « polissage », après une première étape de séparation basée sur les propriétés chimiques des protéines (charge, hydrophobicité, pHi, par exemple).

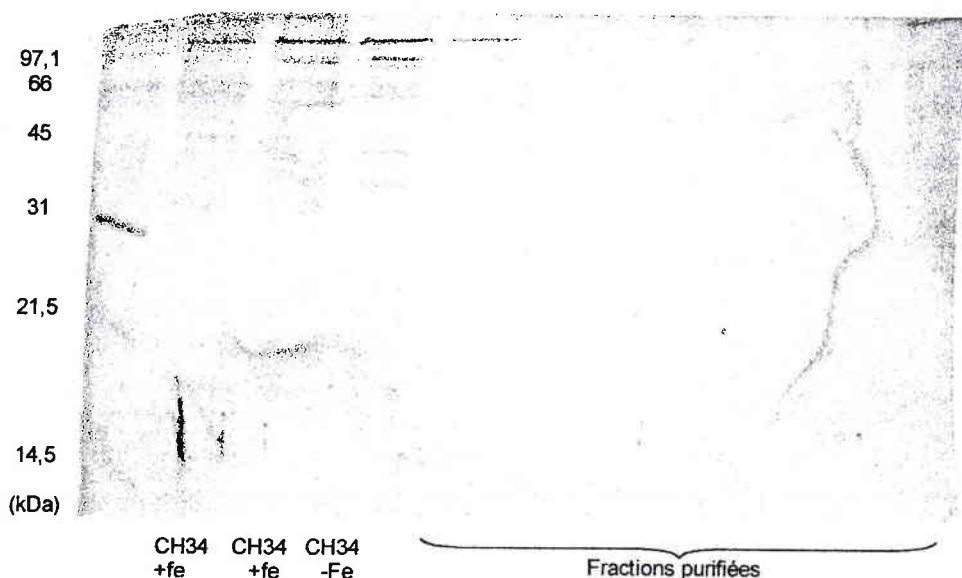
Au vu de ces résultats, plusieurs modifications ont été apportées à plusieurs niveaux du mode opératoire. Les deux étapes de concentration n'étant pas satisfaisantes (la lyophilisation et la précipitation), elles ont été remplacées par une méthode de filtration sur membrane, induite par une force centrifuge. Comme l'étude bibliographique l'a exposée, cette technique est utilisée pour pallier les problèmes de dénaturation.

De plus, une seule extraction pouvant être insuffisante à l'obtention de l'ensemble des protéines membranaires (ce qui pourrait expliquer la faible quantité de protéines obtenues après extraction), cinq extractions successives seront réalisées.

Enfin, l'étape de purification par chromatographie de filtration sur gel sera remplacée par une étape de chromatographie d'échanges anioniques faibles, plus séparative.

c. Analyse du protocole 3

Après chaque extraction, le culot est remis en suspension dans le même volume de tampon. Il est alors concentré, ainsi que le surnageant, par centrifugation des tubes de filtration (seuil 3000 Da), à 14000 X g, pendant une heure, à 4°C. La composition de chaque échantillon est alors déterminée par électrophorèse SDS-PAGE à 12% de polyacrylamide. Seules les fractions contenant des concentrations significatives de protéines seront regroupées et purifiées en chromatographie d'échanges anioniques faibles. La figure 20 présente l'électrophorèse obtenue, après coloration au bleu de Coomassie :



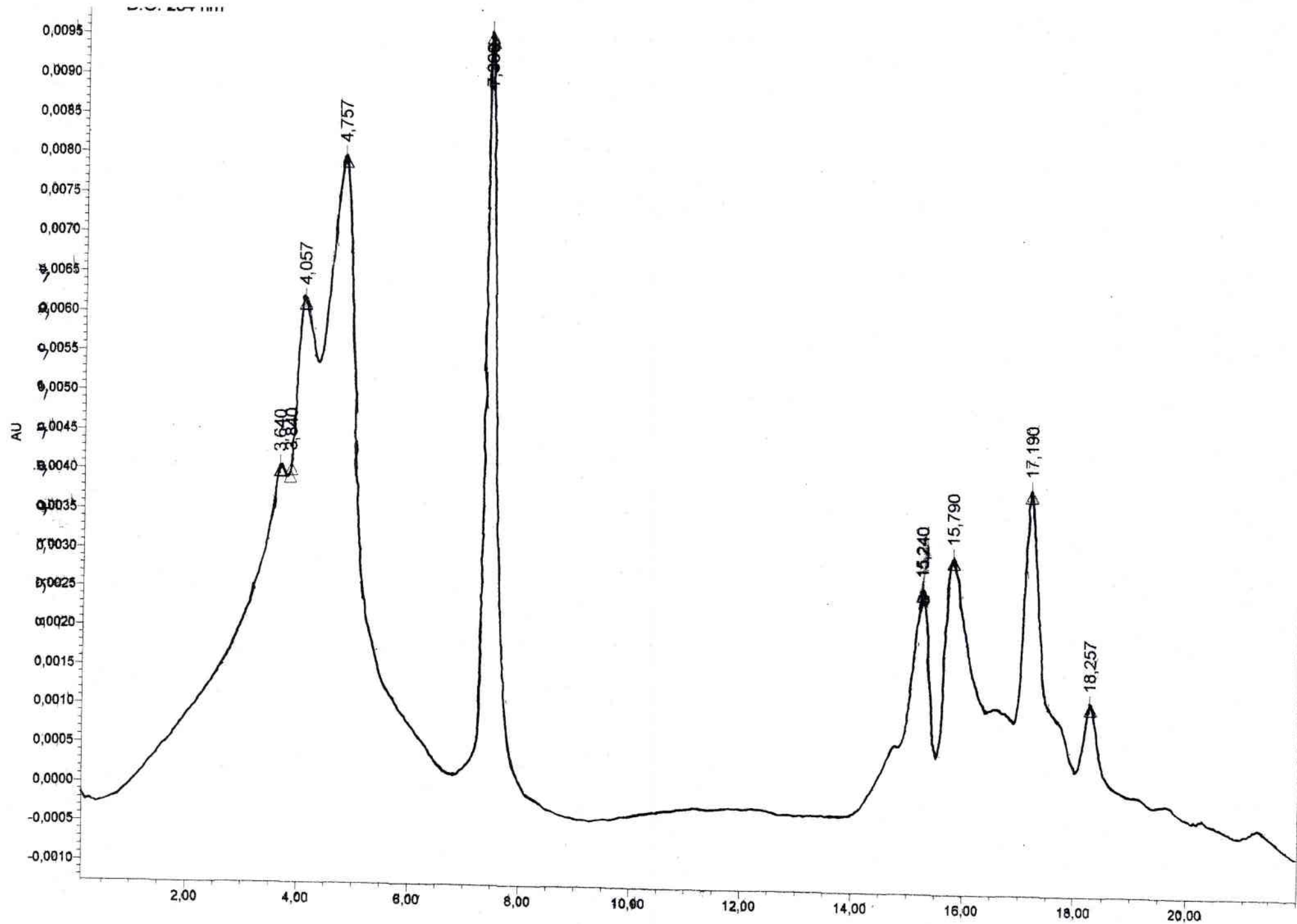


Figure 21 : chromatogramme de purification

Premièrement, les protéines extraites sont concentrées principalement dans le surnageant issu de la première extraction par le n-octylpolyoxyéthylène. Les surnageants issus des quatre extractions suivantes contiennent pas ou peu de protéines membranaires. En effet, aucune protéine n'est identifiable sur ces profils.

Deuxièmement, les protéines extraites ont été purifiées sur une colonne d'échanges anioniques faibles. Les protéines sont séparées par un gradient continu de chlorure de sodium entre 0 et 1 M en 35 min. La figure 21 présente le chromatogramme obtenu à 254 et 280 nm. Plusieurs pics protéiques sont séparés entre 0 et 0,4 M de chlorure de sodium. La densité optique des protéines ainsi purifiées est comprise entre 0,012 et 0,044 à 254 nm, ce qui, en comparaison des résultats obtenus, par chromatographie de filtration sur gel (protocole 2), correspond à des concentrations, en terme de protéine, environ dix fois supérieures.

Troisièmement, la séparation des protéines membranaires extraites par cette technique chromatographique a permis d'améliorer leur purification. Cependant, les pics sont très rapprochés, cette séparation pourrait être optimisée, en modifiant le gradient salin. Ainsi, les protéines étant séparées entre 0 et 0,4 M de chlorure de sodium, le gradient sera donc raccourci entre 0 et 0,5 M. De plus, un gradient en palier plutôt que linéaire a permis d'optimiser la séparation de protéines, dans de nombreuses études (Kato *et al.*, 1987b).

Quatrièmement, le chromatogramme a été « fragmenté » par fraction d'une minute (soit 1 mL). Après concentration sur membrane, les protéines ainsi purifiées, ont été étudiées par électrophorèse SDS-PAGE à 12 %, afin de déterminer leur poids moléculaire et la répartition des protéines séparées (figure 20).

L'analyse de cette électrophorèse, met évidence que chaque pic correspond à un ensemble de protéines, éluées entre 2 et 5 minutes. Les deux premiers pics correspondent quasiment à l'ensemble des protéines de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34. Une étape supplémentaire de purification est donc nécessaire pour obtenir des fractions pures, une seconde étape de filtration sur gel sera donc développée.

Plusieurs extractions successives des protéines membranaires ont été réalisées et analysées par électrophorèse, en conditions dénaturantes, pour apprécier l'étape d'extraction. Cette partie de l'étude montre que la majorité des protéines sont extraites au cours de la première extraction. Après purification par chromatographie d'échanges ioniques, une seconde étape de séparation s'avère nécessaire.

Pour optimiser l'étape de séparation, le gradient d'élution sera optimisé et une étape de chromatographie de filtration sur gel successive à la chromatographie d'échanges ioniques sera développée.

d. Analyse du protocole 4

Les étapes d'extraction et de concentration sont restées identiques à celles mises en place dans le protocole 3. Brièvement, les protéines sont extraites par le n-polyoxyéthylèneglycol à 4 %, et en présence d'antiprotéases. Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines extraites de la membrane, est concentré par induction d'une force centrifuge, sur une membrane d'un seuil de 3 kDa. L'étape de purification a été modifiée à plusieurs niveaux :

- le gradient d'élution, utilisé au cours de la chromatographie d'échanges ioniques a été réalisé entre 0 et 0,5 M de chlorure de sodium, en 35 minutes.
- De plus, un gradient en paliers de 0, 1 M de sel a été préféré au gradient linéaire. La fraction contenant la majeure partie des protéines membranaires ont été étudiées par électrophorèse (figures 22 a et 22 b) puis a été purifiée par chromatographie de filtration sur gel (figure 23 a et b).

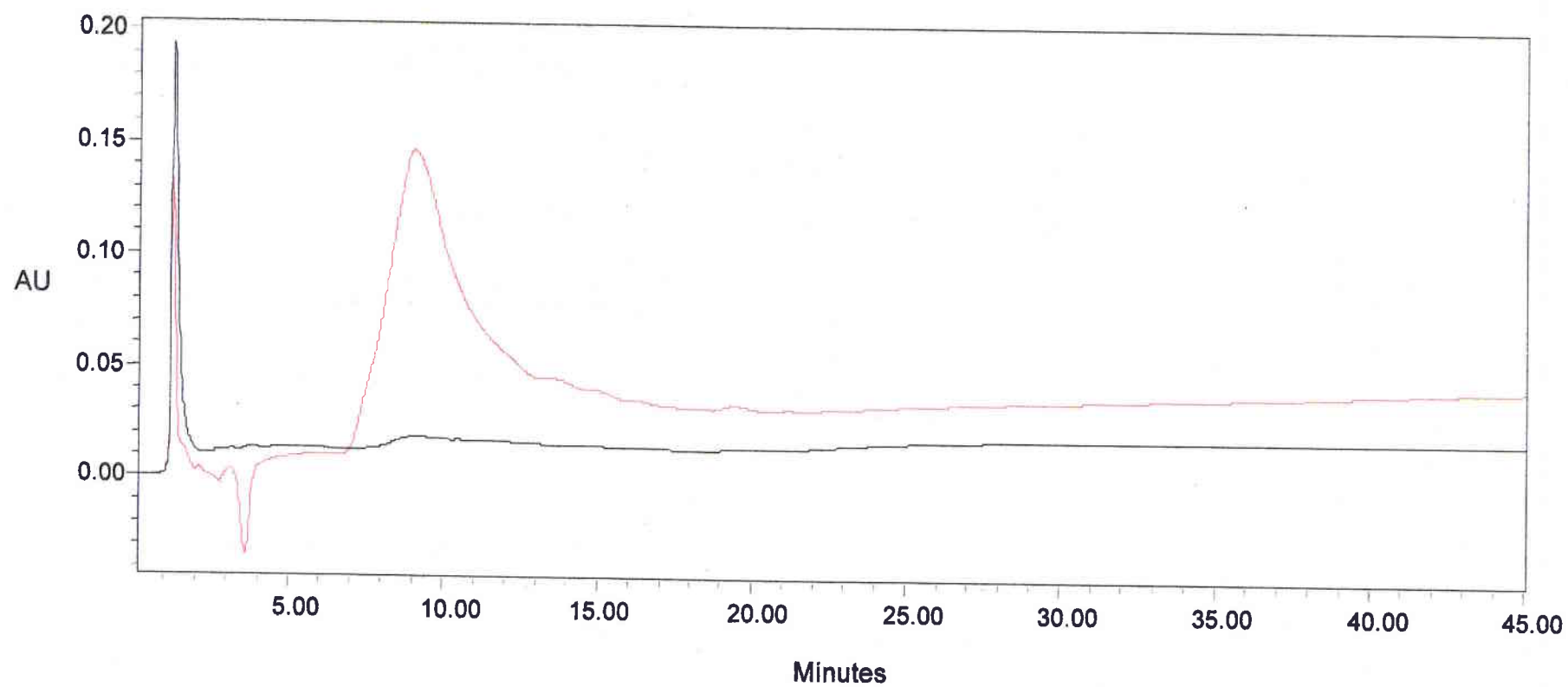


Figure 23 a : Chromatogramme de purification des protéines par IEC, par induction d'un gradient linéaire

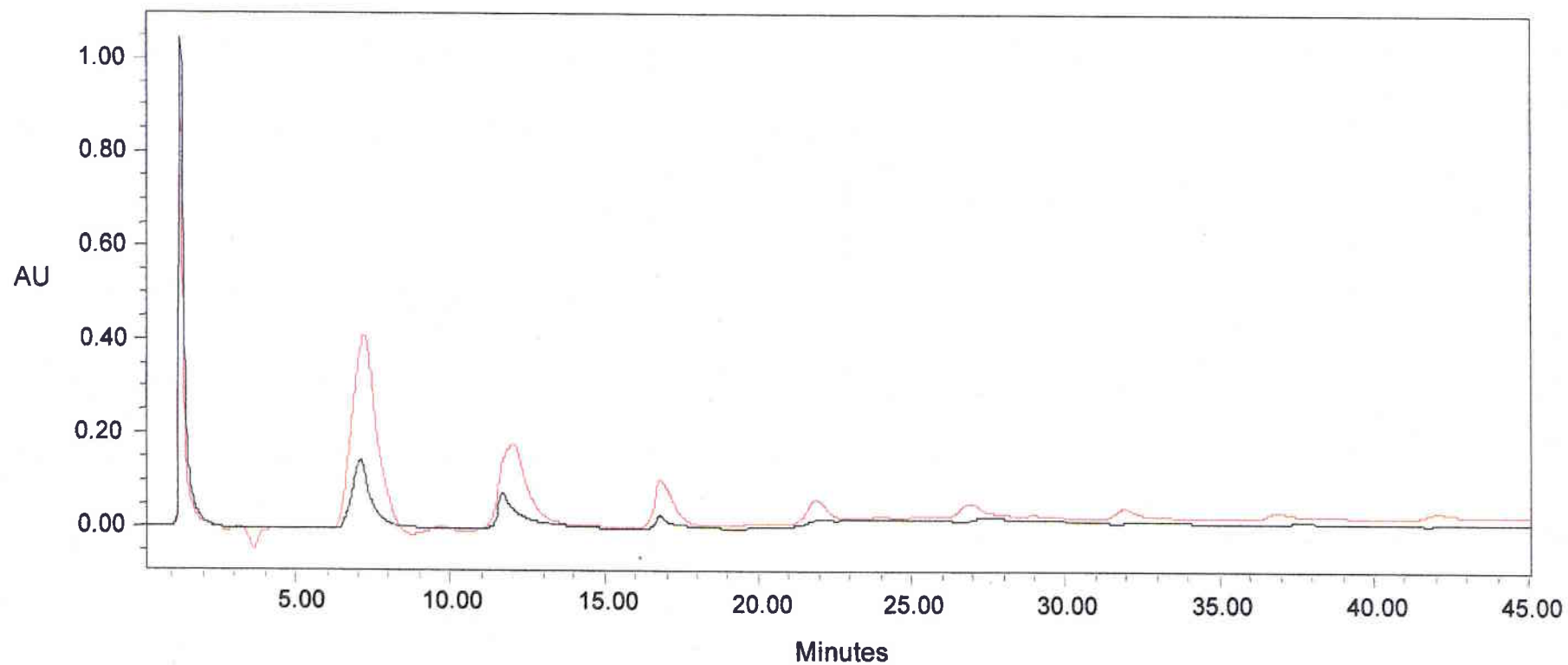


Figure 23 b : Chromatogramme de purification des protéines par IEC, par induction d'un gradient par palier

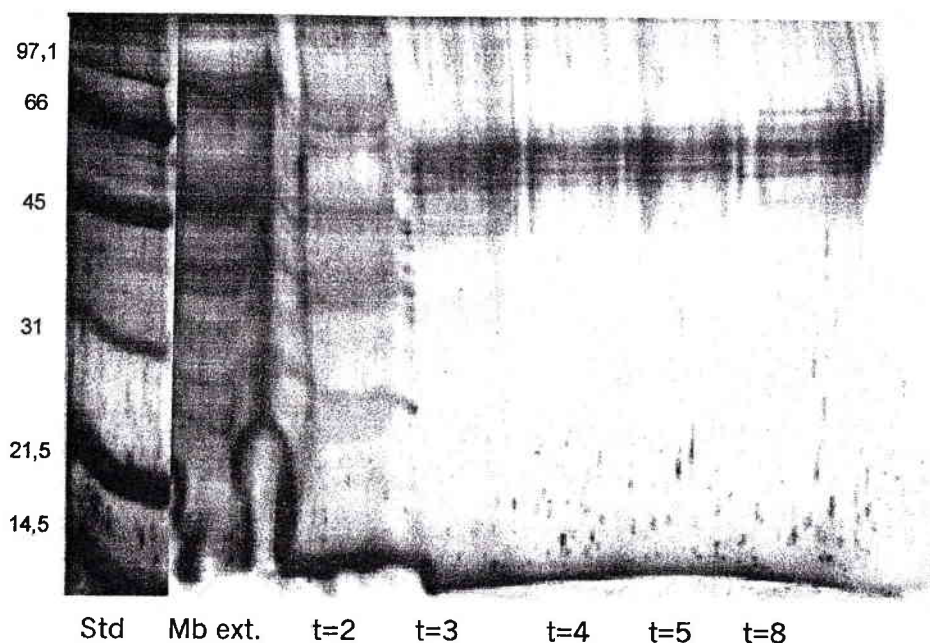


Figure 22 a : électrophorèses des fractions purifiées à 2, 3, 4, 5 et 8 minutes (protocole 4)

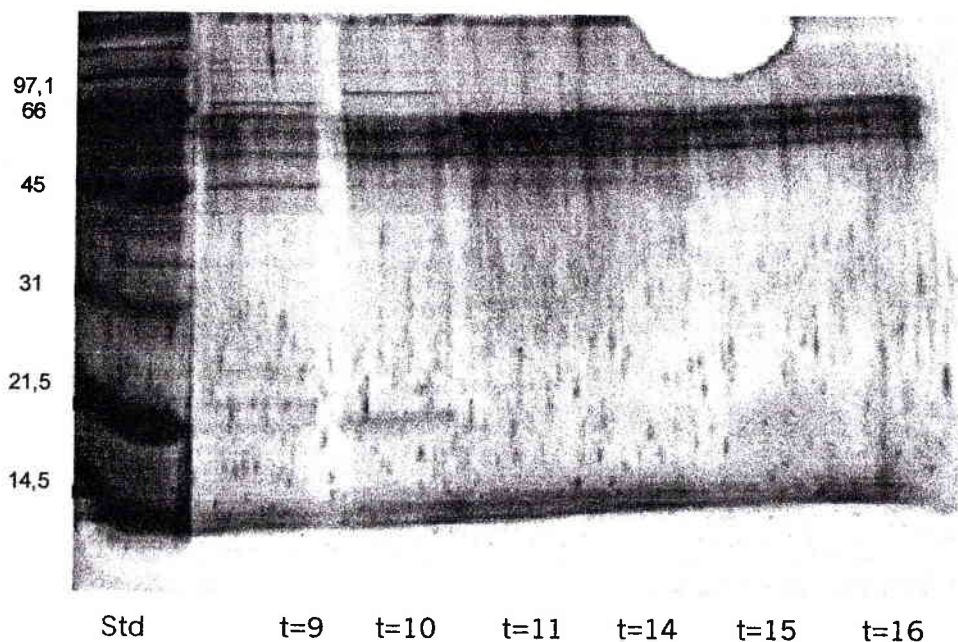


Figure 22 b : électrophorèses des fractions purifiées à 9, 10, 11, 14, 15 et 16 minutes (protocole 4)

Premièrement, le chromatogramme obtenu en chromatographie d'échanges ioniques est constitué d'un ensemble de pics protéiques sortant de la colonne

entre 2 et 18 minutes, plus ou moins bien résolus et très rapprochés. Ainsi, entre 2 et 4 minutes, quatre sommets sont identifiables, ce qui peut traduire une mauvaise séparation des protéines membranaires.

Deuxièmement, la densité optique du pic protéique sortant après deux minutes a triplé par rapport aux résultats obtenus dans le protocole 3 (entre 0,30 DO à 254 nm et 0,093 DO à 254 nm). Ceci montre que les changements apportés au protocole ont permis d'augmenter la concentration des protéines membranaires d'un facteur trois. Des fractions de 1 minute, correspondant à 1 mL, ont été analysées par électrophorèse en SDS-PAGE afin de déterminer le degré de pureté des protéines ainsi purifiées, avant séparation en chromatographie de filtration sur gel.

Troisièmement, les figures 22 a et b présentent les résultats ainsi obtenus. Bien que la concentration protéique ait été augmentée, les protéines purifiées sont en quantité insuffisante. De plus, les protéines ne sont pas complètement séparées. Ce qui laisse supposer que les protéines séparées en chromatographie d'échanges ioniques sont, en fait, des agrégats protéiques.

Quatrièmement, pour confirmer ou non cette hypothèse, le pic sortant après 2 minutes, a été étudié par chromatographie de filtrations sur gel. Nous avons constaté que, ainsi que pour les protocoles développés précédemment, les protéines purifiées sont sous formes d'agrégats (pic à 7 minutes, correspondant à 2000 kDa) ou de fragments protéiques (pics après 12 minutes, correspondant à des poids moléculaires inférieurs à 10 kDa).

Cinquièmement, les résultats obtenus par chromatographie de filtration sur gel confirment que les protéines membranaires sont extraites du reste de la membrane, mais sont en solution sous forme d'agrégats, même après purification par chromatographie d'échanges ioniques. Or la technique utilisée pour concentrer les protéines, peut être à l'origine d'une concentration, en parallèle du détergent. Les protéines déposées sur la colonne de chromatographie d'échanges ioniques, sont alors en présence d'un tampon de faible concentration en détergent (0,5 %). Ce changement peut être à l'origine de l'apparition d'agrégats protéiques.

Sixièmement, les résultats obtenus en électrophorèse mettent en évidence que bien que la quantité de protéines membranaires ait été augmentée, elle reste faible pour toute utilisation ultérieure des protéines semi-purifiées, obtenues à ce

stade de la purification. Or les protéines ont été concentrées sur des membranes après purification en chromatographie d'échanges anioniques. Nous pouvons donc supposer que cette étape n'est pas satisfaisante et ne permet pas d'obtenir des concentrations suffisantes de protéines. En effet, des études tendent à montrer que ce type de membranes, couplé à une force centrifuge, entraîne une fixation irrémédiable des protéines, et plus particulièrement si elles sont hydrophobes.

Bien que les modifications apportées au protocole de purification aient permis d'obtenir des concentrations trois fois plus importantes de protéines, elles ne sont que semi-purifiées, après deux étapes successives de séparation. D'autre part, toutes ces étapes contribuent à diminuer la concentration protéique.

Au vu de ces résultats et pour augmenter de façon significative la concentration de la protéine réceptrice, plusieurs modifications ont été apportées au protocole. Ainsi, les protéines ont été concentrées par un système de dialyse, couplé à un gel qui absorbe le milieu aqueux. Cette étape permettra dans un même temps de diminuer la concentration de détergent dans l'échantillon, afin d'éviter une agrégation des protéines au cours de l'étape de purification.

De plus, le chromatogramme obtenu par filtration sur gel a mis en évidence des fragments protéiques, le PMSF a donc été remplacé par un cocktail d'antiprotéases (inhibiteurs de sérine, cystéine, aspartique et métalloprotéases et aminopeptidases ; SIGMA P8465), également ajouté aux tampons utilisés au cours de la purification.

Enfin, nous avons travaillé à partir de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, qui comme nous avons pu le mettre en évidence dans la première partie surexprime naturellement la protéine membranaire qui pourrait correspondre au récepteur du complexe sidérophore-fer.

e. Analyse du protocole 5

Les protéines de *Ralstonia eutropha* 104 ont été extraites dans une solution contenant 4 % d'octylpolyoxyéthylèneglycol, et des antiprotéases, pendant deux

heures à 37°C, sous agitation. Après centrifugation, les protéines extraites de la membrane sont placées dans un sac de dialyse (Float-A-lyzer) contre 500 mL de tampon TRIS-HCl, pH=8,00, 0,5 % de n-octylPOE et d'antiprotéases (SIGMA - P8465), sous agitation, à 4°C, pendant 2 heures.

Les protéines sont alors concentrées, en plaçant le sac de dialyse dans un gel d'absorption, sous agitation, à 4°C, pendant 6 heures.

Le sac de dialyse, contenant les protéines extraites est alors placé dans 100 mL solution de tampon « propre », une nuit, à 4°C, sous agitation.

Les protéines ainsi concentrées et dialysées sont purifiées par chromatographie d'échanges ioniques faibles.

Afin de vérifier que l'étape de concentration, après l'extraction, a été satisfaisante, l'échantillon a été analysé par électrophorèse SDS-PAGE. La figure 24, présente cette électrophorèse. Un spectre de densité a également été réalisé pour apprécier correctement cette partie du mode opératoire.

L'échantillon est alors déposé sur une colonne chromatographique d'échanges anioniques faibles et les protéines sont séparées selon un gradient salin entre 0 et 0,5 M. La figure 25 présente le chromatogramme obtenu à 254 et 280 nm. Plusieurs points importants peuvent être soulignés :

Tout d'abord, le chromatogramme peut être divisé en deux parties : un premier pic protéique, bien résolu, d'une densité optique de 0,60 à 254 nm, apparaît entre 1 et 2 minutes. Un ensemble de trois pics, dont la base est d'environ deux minutes, se succèdent entre 22 et 28 minutes. Le premier a une densité optique de 0,35 à 254 nm, le second 0,20 et le dernier de 0,05. La composition protéique de chaque fraction de 1 minute a été analysée par électrophorèse SDS-PAGE à 7,5 % (figure 24) :

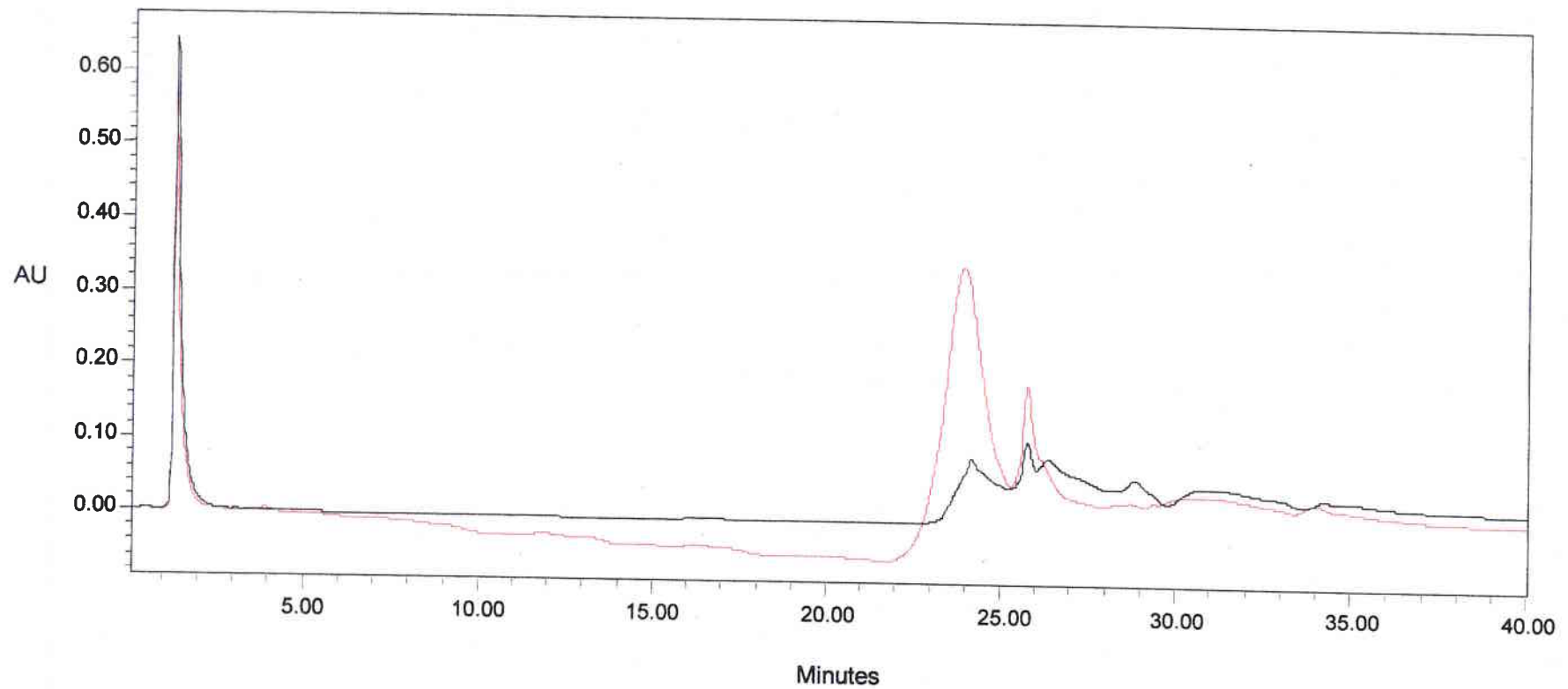


Figure 25 : Chromatogramme de purification des protéines membranaires de *Rastolnia eutropha* 104 par IEC

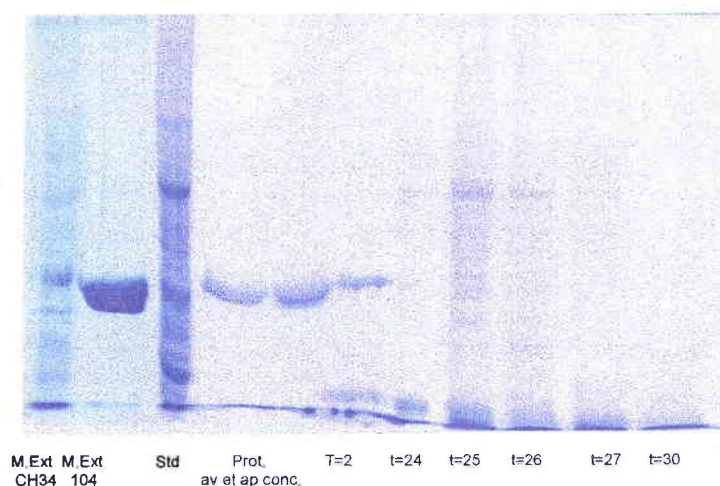


Figure 24 : Electrophorèse des protéines après concentration et après purification

Ce gel d'électrophorèse met en évidence que la protéine purifiée, correspond à la protéine membranaire d'environ 45 kDa, exprimée chez *Ralstonia eutropha* 104. De plus, aucune autre bande protéique n'a été révélée par coloration au bleu de Coomassie, dans cet échantillon. Ce qui confirme que la protéine isolée entre 2 et 3 minutes, n'est pas « contaminée » par d'autres protéines membranaires.

D'autre part, les protéines éluées entre $t=9$ et 12 minutes, et colorées au bleu de Coomassie, laisse apparaître la composition protéique complète de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, comparable aux profils obtenus pour *Ralstonia eutropha* CH34 et *Ralstonia eutropha* 1153. Cette composition protéique de la membrane externe de cette souche n'était pas identifiable en raison de la forte concentration de la protéine de 45 kDa, ce qui n'est plus le cas après extraction de cette protéine.

Enfin, la protéine ainsi purifiée a été dosée selon la méthode du BCA et comparée à la concentration de protéines membranaires, afin de déterminer le rendement de la purification. Ainsi, $0,832 \pm 0,005$ mg de protéines/mL ont été dosées dans la membrane de *Ralstonia eutropha* 104. L'échantillon de protéine purifié contient, quand à lui, $0,323 \pm 0,04$ mg de protéine/mL.

Cet échantillon protéique représente donc près de 39 % des protéines totales de la membrane.

IV.6.3. Synthèse et conclusions concernant la purification de la protéine membranaire de 45 kDa

Plusieurs méthodes d'extraction, de concentration et de purification ont été testées, afin de mettre au point une technique de purification de cette protéine.

A l'issue de cette partie de l'étude plusieurs conclusions peuvent être apportées :

Premièrement, nous avons choisi d'extraire les protéines par un détergent non ionique, ce qui se révèle être une propriété primordiale pour l'étape de purification. En effet, ce détergent n' a pas été un facteur limitant dans le choix du type de colonne chromatographique pour la séparation des protéines extraites.

Deuxièmement, l'évolution des modes opératoires développés a souligné l'importance de contrôler avec précision la composition des tampons utilisés tout au long de cette procédure. Ainsi, la présence d'antiprotéases, la quantité de détergent dans l'échantillon et dans les tampons, la salinité du tampon d'élution au cours de l'étape de purification, sont des paramètres primordiaux dans l'élaboration d'une méthode.

Troisièmement, ces protocoles ont clairement établi la nécessité, dans le cas précis de protéines membranaires, de développer une étape de concentration adaptée. Plusieurs techniques ont été testées : la précipitation (sulfate d'ammonium, polyéthylèneglycol), la filtration sur membrane, la dialyse. Cette dernière technique nous a permis de concentrer les protéines extraites, sans augmenter la concentration de détergent dans l'échantillon protéique, à l'origine d'agréats.

Quatrièmement, nous avons pu constater que des résultats concluants ont finalement été obtenus à partir d'une suspension de membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, souche qui surexprime naturellement la protéine étudiée.

Cinquièmement, un protocole a donc été mis au point et optimisé. Il repose sur trois étapes successives :

- les protéines membranaires de *Ralstonia eutropha* 104 sont extraites à partir d'une suspension membranaire, par action du n-

polyoxyéthylèneglycol 4 %, en présence d'antiprotéases, pendant deux heures, sous agitation. Les protéines extraites sont séparées des débris membranaires par centrifugation, à 100 000 X g, 20 minutes, à 4°C.

- elles sont dialysées deux heures contre le tampon de purification, contenant 0,5 % de n-polyoxyéthylèneglycol, puis concentrées par absorption du milieu aqueux sur un gel (Spectra Gel Absorbent ; SPECTRUM), six heures à 4°C, sous faible agitation. Enfin, la suspension protéique est dialysée une nuit, contre un tampon « propre », de même composition, à 4°C. L'échantillon protéique est alors dans le même tampon que celui utilisé pour la purification par chromatographie ionique, ce qui limite l'agrégation des protéines extraites.
- Les protéines ont alors été purifiées, selon leur charge totale, sur une colonne chromatographique d'échanges anioniques faibles, par un gradient salin entre 0 et 0,4 M en 35 minutes.
- Un suivi de purification a été réalisé par électrophorèse en SDS-PAGE.

Sixièmement, ce mode opératoire, nous a permis d'obtenir une protéine pure et en quantité suffisante pour son analyse. En effet, nous avons vu dans la IV.2. des résultats que cette protéine membranaire d'un poids moléculaire d'environ 45 kDa, pourrait correspondre au récepteur membranaire du complexe sidérophore-fer chez *Ralstonia eutropha* 104. En effet, cette protéine n'est pas une protéine de Braun et son expression est influencée par la présence ou l'absence de fer dans le milieu de culture. Deux bandes de même poids moléculaires (mais moins concentrées) ont été identifiées dans la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 1153, souche qui surexprime la synthèse du sidérophore.

Pour confirmer le rôle de cette protéine nous avons réalisé un suivi d'absorption du fer, mais également de métaux sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, en présence de sidérophores. Le suivi d'absorption du fer sur cette membrane a été comparé à *Ralstonia eutropha* CH34.

IV.7. Etude de l'adsorption du fer ferrique, du cobalt, zinc et cadmium par la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104

IV.7.1. Objectif

Afin de comprendre le mécanisme d'adsorption du fer par la membrane externe de *Ralstonia eutropha*, un isotherme d'adsorption de Freundlich a été représenté pour déterminer l'affinité du fer pour le(s) récepteur(s) membranaire(s) de *Ralstonia eutropha* 104 et CH34. Les quantités de fer et de métaux testées étant faibles (de 0,5 à 15 mg/L suivant le métal), l'isotherme de Freundlich a été préféré à un isotherme de Langmuir, cet isotherme étant basé sur l'équilibre entre le métal en solution et la fraction bactérienne (Falla, 1990). Ce modèle reposant sur l'hétérogénéité de fixation, le nombre de site de fixation et leur constante d'affinité sont déterminés.

IV.7.2. Protocole : technique de dialyse

1 mg de suspension de membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, obtenue à partir d'une culture, en présence et en absence de fer, a été placé en présence de sidérophores et de différentes concentrations de fer, dans un sac à dialyse. L'ensemble a été placé dans 50 mL d'eau suprapure, sous agitation, pendant 48 heures. La quantité de métal non fixé a été mesurée par absorption atomique. L'isotherme d'adsorption a été comparé à celui obtenu sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 (figure 26).

IV.7.3. Analyse et discussion

La droite bleue représente la tendance d'absorption du fer ferrique sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, cultivée sans fer, la rouge est celle obtenue, à partir de cultures en présence de fer. Enfin, la verte est la tendance d'absorption du fer par la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34, cultivée en absence de fer.

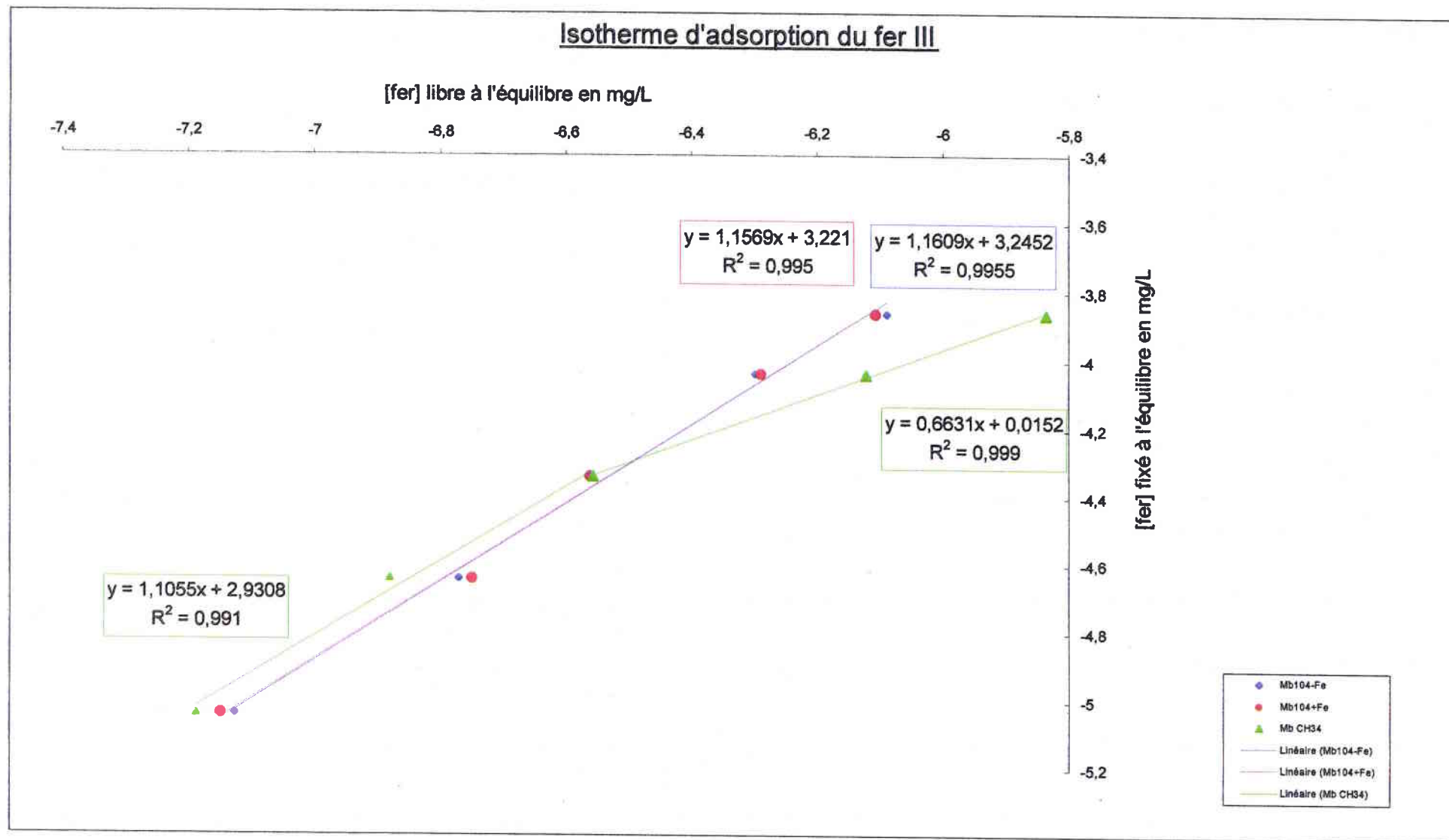


Figure 26 : Isotherme d'adsorption du fer III par les membranes externes de *Ralstonia eutropha* CH34 et 104

La figure 26 montre que les droites obtenues à partir de la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, issue d'une culture en présence ou en absence de fer, sont monophasiques et de pentes identiques. Cette observation tend à démontrer que l'affinité relative du fer pour les récepteurs de la membrane de *Ralstonia eutropha* 104 est toujours la même, que les bactéries aient été cultivées en absence ou en présence de fer. Ces affinités K_{104+} et K_{104-} ont été calculées, en faisant l'exposant de la pente de chaque droite :

- $K_{104+} = e^{1,1569} = 14,35 \text{ L/mg}$
- $K_{104-} = e^{1,1609} = 14,48 \text{ L/mg}$

Ces valeurs, très proches l'une de l'autre confirment que l'affinité du fer pour les récepteurs de la membrane ne varie pas en fonction des conditions de culture. Ce système de forte affinité est un système performant d'accumulation, qui n'a pas atteint une saturation, même en présence de 15 mg/L de fer III dans le milieu.

Par contre, la courbe de fixation du fer ferrique sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34, issue d'une culture sans fer, est biphasique. Les affinités relatives des deux phases ont également été déterminées :

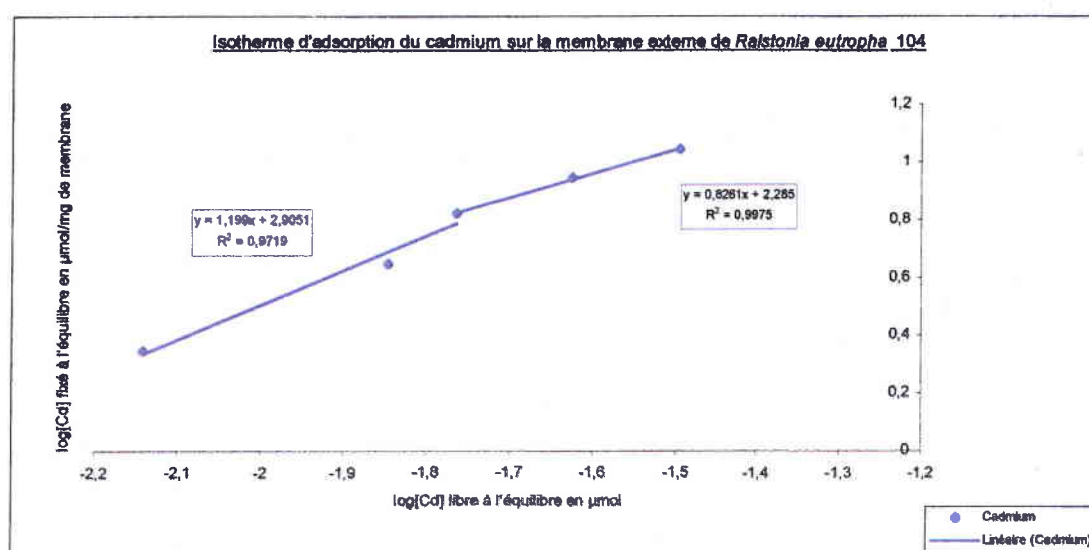
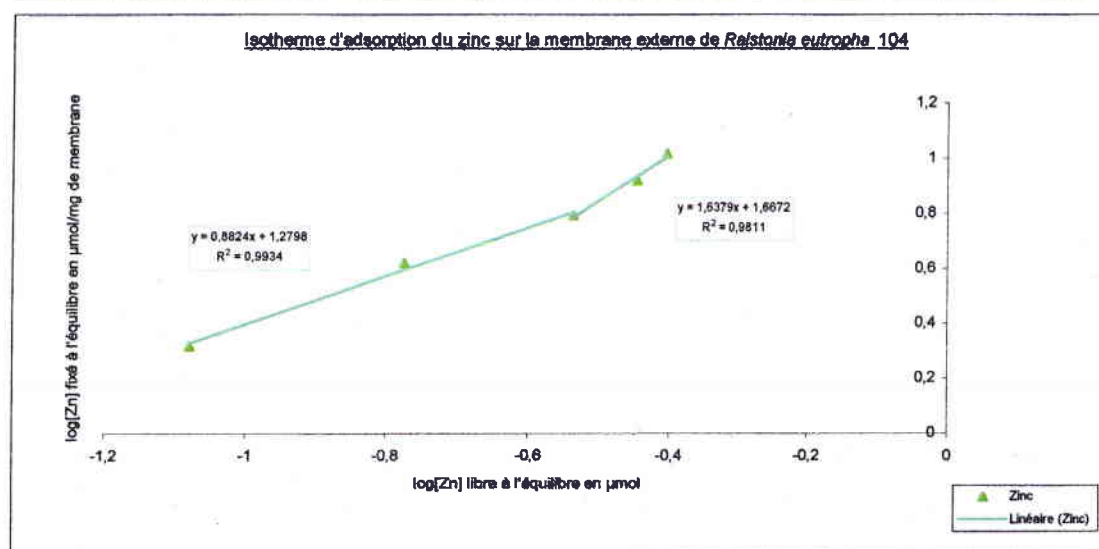
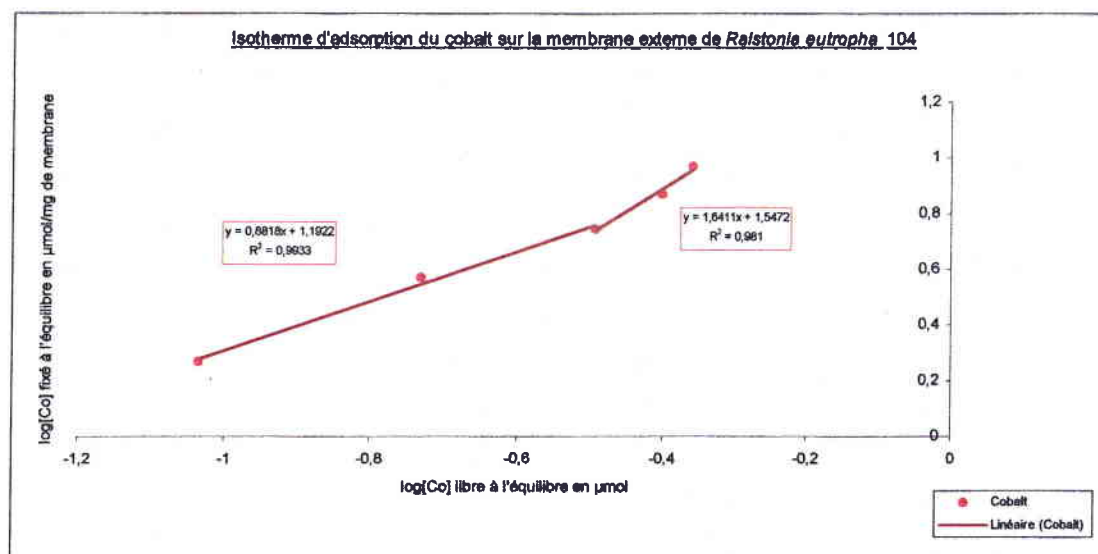
- $K_{CH34_1} = e^{1,1055} = 12,75 \text{ L/mg}$
- $K_{CH34_2} = e^{0,6631} = 4,60 \text{ L/mg}$

Cette courbe biphasique décrit deux étapes dans le processus d'absorption du fer ferrique par la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34. La première étape est rapide et présente une affinité, forte et proche de l'affinité de la membrane de *Ralstonia eutropha* 104 (12,75 L/mg). Ce premier système tend vers la saturation, un second système de fixation du fer, d'affinité relative faible (4,60 L/mg) intervient alors (pente = 0,66).

Ceci peut correspondre à deux systèmes d'accumulation du fer par *Ralstonia eutropha* CH34, le premier serait assuré par le récepteur sidérophore-fer et le second par un autre système protéinique.

IV.7.4. Isothermes d'adsorption du cadmium, cobalt, zinc sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104

L'adsorption de ces métaux sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, a été réalisée de même que pour le fer ferrique, entre 0,5 et 2,5 mg/L



Figures 27 a,b et c : Isotherme de Freundlich du cadmium, cobalt, zinc

de cadmium et entre 0,25 et 1,25 mg/L pour le cobalt et le zinc. Ce mécanisme a été représenté par des isothermes de Freundlich (figures 27 a,b et c). Cette partie de l'étude a pour objectif de vérifier si la fixation des métaux sur la membrane de *Ralstonia eutropha* 104, est active.

IV.7.5. Analyse et discussion

Chacune de ces courbes sont biphasiques, les courbes d'adsorption du cobalt et du zinc semblent similaires. Cependant chaque courbe révèle au moins deux phases d'adsorption de ces métaux l'un de forte affinité, l'autre de faible affinité (tableau VIII).

Tableau VIII :

Métalloïde testé	1 ^{er} constante d'affinité	2 ^o constante d'affinité
Cadmium	15,81L/mg	6,70 L/mg
Cobalt	7,62 L/mg	43,76 L/mg
Zinc	7,63 L/mg	43,44 L/mg

Les courbes traduisant la fixation du cobalt et du zinc sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, sont quasiment identiques. Elles sont toutes deux biphasiques, mais le phénomène de captation de ces métaux est « inversé » par rapport à celui du cadmium. En effet, la première étape de fixation est traduite par une constante d'affinité faible (7,62 et 7,63 L/mg pour le cobalt et le zinc respectivement), qui est suivie d'une seconde étape de fixation beaucoup plus rapide (43,76 et 43,44 L/mg pour le cobalt et le zinc respectivement). Ceci semble indiquer que ces métaux sont, tout d'abord, fixés par un système rapidement saturés et de faible affinité. Ce premier transport pourrait correspondre à la fixation de ces métaux sur le sidérophore. En effet, Gilis *et al.*, en 1998 ainsi que Namiranian *et al.* en 1997 ont démontré la fixation du cadmium et du zinc respectivement sur le sidérophore. Par contre, aucune étude à ce jour n'a démontré que le complexe ainsi formé pouvait se fixer au récepteur de la membrane. Un second mode de fixation des métaux est développé lorsque le

premier est saturé avec une constante d'affinité relative beaucoup plus élevée (de l'ordre de 43 L/mg, soit près de 6 fois plus élevée que la première). Ceci démontre que sur une souche de *Ralstonia eutropha* dépourvue des plasmides de résistances aux métaux, le cobalt et le zinc (qui interviennent comme co-facteurs de divers mécanismes enzymatiques) sont absorbés en deux étapes d'affinité différentes.

Le (les) mécanisme(s) de fixation du cadmium, semblent agir à l'inverse de ce phénomène. Un système de forte affinité s'exprime lorsque les quantités de cadmium dans le milieu sont faibles (inférieures à 1,5 mg/L). Cependant, ce système est saturé quand les concentrations en Cd augmentent, sans doute après saturation des sidérophores, et pour limiter l'entrée de ce toxique dans la cellule bactérienne.

IV.8. Démonstration du système czc

IV.8.1. Objectif

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de produire des anticorps pour confirmer le modèle protéique proposé pour le système de résistance aux cobalt, zinc, cadmium, chez *Ralstonia eutropha* CH34. Les séquences aminées de ces protéines étant connues, nous avons sélectionné des séquences de douze acides aminés pour chaque protéine, immunogènes pour les souris. Notre choix s'est porté sur la production d'anticorps polyclonaux, étant donné la nature des antigènes, leur petite taille limite, en effet, les risques d'obtenir un éventail d'anticorps peu spécifiques. L'identification des protéines constituant le système a été réalisée par Western Blot.

→ Proposition d'un modèle d'expulsion des métaux

Après analyse bibliographique, nous proposons la système suivant, sur lequel sont représentées les quatre protéines constituant le mécanisme de transport des cations métalliques vers le milieu extracellulaire : Czc A, Czc B, Czc C et Czc D.

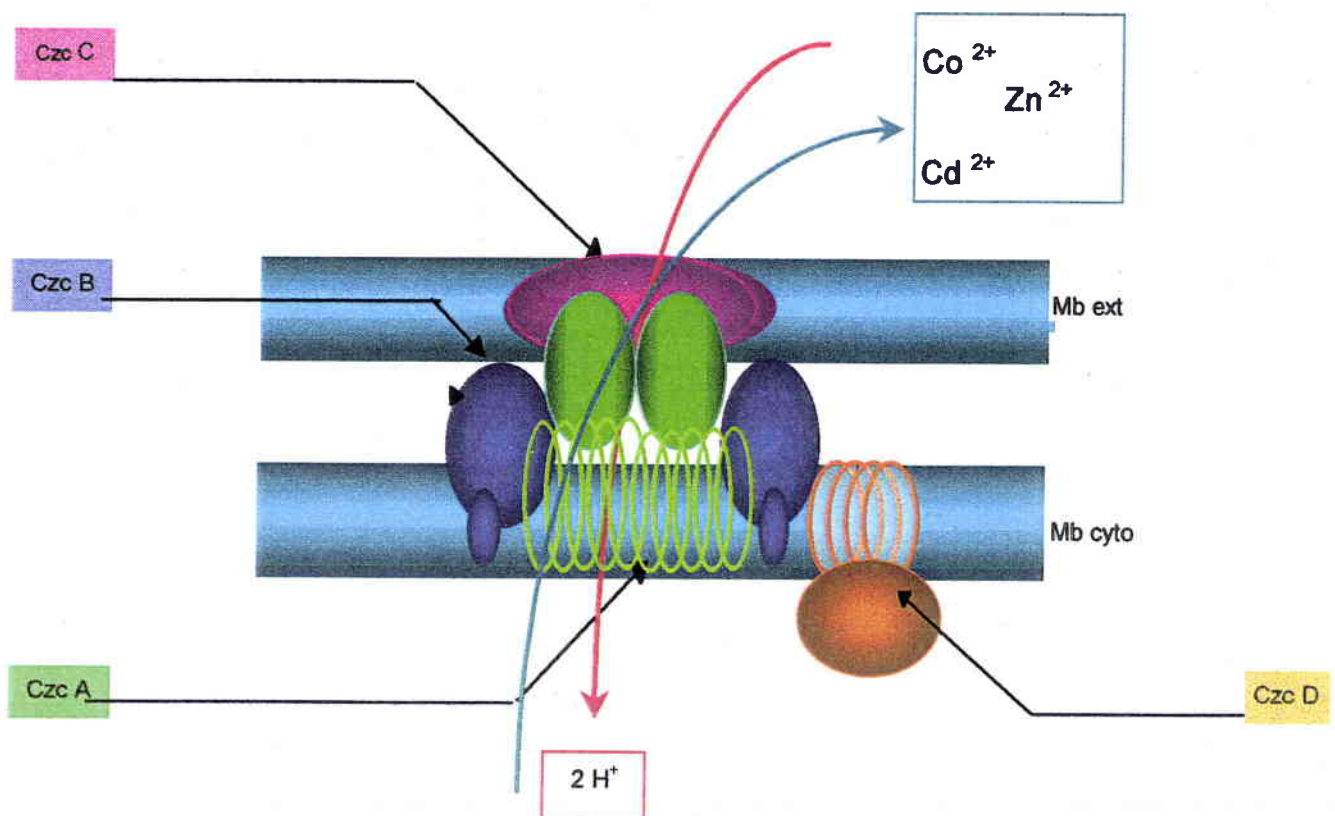


Figure 28 : Schématisation de la pompe de transport des métaux proposée, après analyse bibliographique

IV.8.2. Protocole : Choix des séquences acides aminés pour la production d'anticorps polyclonaux

Les séquences ont été choisies en fonction de leur polarité, après analyse de la séquence de l'opéron *czc* (Nies et Silver, 1989). En effet, une séquence est d'autant plus immunogène, qu'elle est hydrophile (tableau IX) :

Tableau IX : séquences d'acides aminés sélectionnées pour la production d'anticorps polyclonaux

Protéine du système de résistance <i>czc</i> à identifier	Séquence d'acide aminé sélectionnée pour la production des anticorps
Czc A	NQISRENGKRR (hydrophile à 83,3 %)
Czc B	GHSESKGHGDTE (hydrophile à 100 %)
Czc C	EDTR KSTRTSTA(hydrophile à 91,6 %)
Czc D	DKKRTFGYYRFE(hydrophile à 83,3 %)

Trois souris ont été immunisées par antigène, elles ont reçu 200 µg de peptide, en intra péritonéal, trois fois, à quinze jours d'intervalle. Quatre jours avant le sacrifice, elles ont reçu 25 µg de peptides en intraveineuse. Le sang a été récupéré, puis les sérums prélevés, les anticorps polyclonaux qu'ils contiennent ont été testés par Western blott.

a. Analyse des anticorps polyclonaux produits contre la séquence aminée *czc* A

L'analyse bibliographique révèle que Czc A serait le centre de la pompe à l'origine de l'excrétion du cobalt, zinc, cadmium. Cette protéine, composée de douze hélices transmembranaires dans la membrane cytoplasmique, s'étend jusqu'au peptidoglycane, où elle forme deux sous-unités (Anton *et al.*, 1999). Son poids moléculaire est d'environ 120 kDa.

Afin de révéler la localisation et le poids moléculaire de cette première protéine, un western blot a été réalisé sur chacune des enveloppes des trois souches testées (Figure 29).

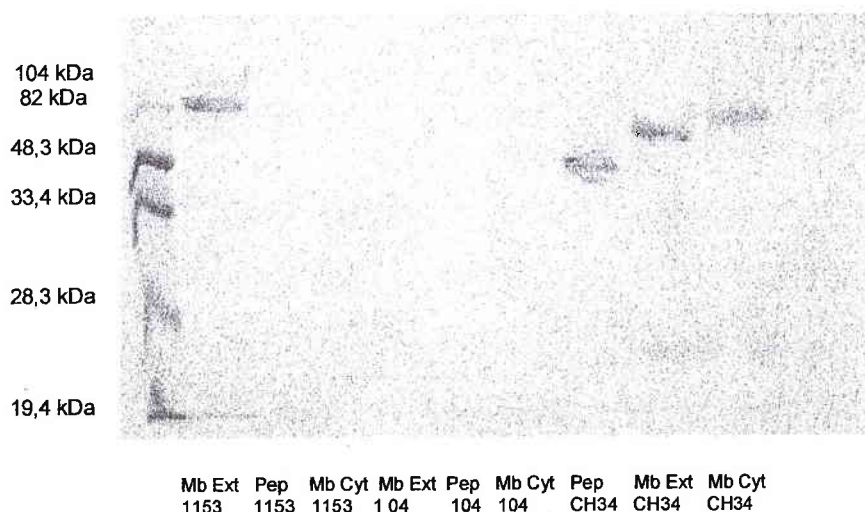


Figure 29 : western blot des anti-CzcA

Les anticorps polyclonaux produits à partir de la séquence aminée *czc A* ont révélé par western blotting, des protéines au niveau des trois enveloppes :

- une protéine d'environ 102 kDa dans le membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34, une de 80 kDa dans le peptidoglycane et enfin une protéine d'environ 97,4 kDa dans la membrane cytoplasmique. Cette observation suggère que le protéine Czc A traverserait les trois enveloppes. Anton *et al.*, en 1999, suggèrent que cette protéine, ancrée dans la membrane cytoplasmique, par 12 hélices α , présente une large partie périplasmique. Ceci est en accord avec la protéines de 80 kDa, du peptidoglycane et celle d'environ 100 kDa de la membrane cytoplasmique. Ainsi la partie membranaire pourrait être de 20 kDa.

Cependant, une protéine de 104 kDa est identifiée dans la membrane externe . **Ceci nous laisse supposer que Czc A présente la même configuration au niveau de la membrane externe : une partie d'où moins 20 kDa dans la membrane externe et de 80 kDa dans le périplasme.** Anton *et al.* avancent que cette protéine n'est pas ancrée dans la membrane externe, mais plusieurs études ont démontré que Czc A seule, permet le transport, des cations bivalents vers le milieu extracellulaire (Rensing *et al.*, 1997 ; Taghavi *et al.*, 1997).

Les résultats que nous avons obtenu sont en accord et confirment cette hypothèse. En effet, il paraît difficile d'imaginer le transport des cations bivalents

par Czc A, seule, si cette protéine ne traverse pas toutes les enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34.

b. Analyse des anticorps polyclonaux produits contre la séquence aminée czc B

En 1989, Nies et Silver montrent que Czc B, protéine qui facilite le passage des ions entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe, est ancrée dans la membrane cytoplasmique, mais présente une partie périplasmique. Les anticorps polyclonaux, produits à partir d'une séquence de cette protéine se sont fixés sur une protéine du peptidoglycane, d'environ 33 à 36 kDa (Figure 30).

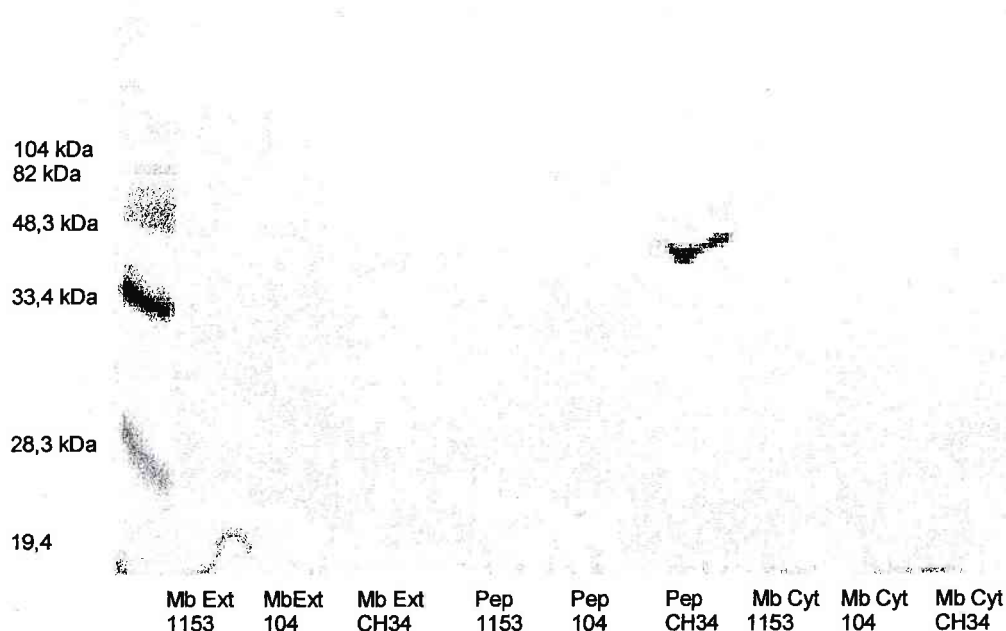


Figure 30 : western blot des anti-Czc B

Or cette protéine étant un homodimère, la protéine révélée pourrait donc correspondre aux sous-unités, séparées au cours de la préparation des échantillons. Cependant, elle pourrait correspondre à une partie tronquée de cette protéine, qui aurait été scindée au cours du protocole de séparation des enveloppes. Ainsi, la partie reconnue par les anticorps est la partie ancrée dans le peptidoglycane. Or la séquence d'acides aminés choisie pour les produire est hydrophile à 100 %, il paraît très probable que l'épitope reconnu se situe dans le

peptidoglycane et non dans la membrane cytoplasmique, qui contiendra les parties à dominance hydrophobe de la protéine.

Pour confirmer cette hypothèse le spectre de densité a été comparé aux spectres de densité des peptidoglycane de *Ralstonia eutropha* CH34, 1153 et 104 (figure 31). Le spectre confirme que l'épitope reconnu par les anticorps est une protéine du peptidoglycane exprimée principalement chez *Ralstonia eutropha* 1153, bien qu'elle soit faiblement apparente chez *Ralstonia eutropha* CH34.

Cette protéine est absente du peptidoglycane de *Ralstonia eutropha* 104. Cette observation confirme que la protéine identifiée est liée au système de résistance aux cobalt, zinc, cadmium.

Le spectre de densité des anticorps, comparé aux spectres des membranes externes et cytoplasmiques (résultats non présentés), confirme qu'ils ne reconnaissent aucune protéine de ces enveloppes.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats tendent à confirmer les hypothèses formulées concernant Czc B. L'expression de cette protéine du peptidoglycane est amplifiée dans des milieux de culture supplémentés en cadmium, cobalt ou zinc. Elle pourrait être constituée de deux sous-unités identiques de 33 à 36 . La séquence révélée par les anticorps montre que la partie périplasmique de cette protéine est de 36 kDa.

Spectres de densité du peptidoglycane des souches testées

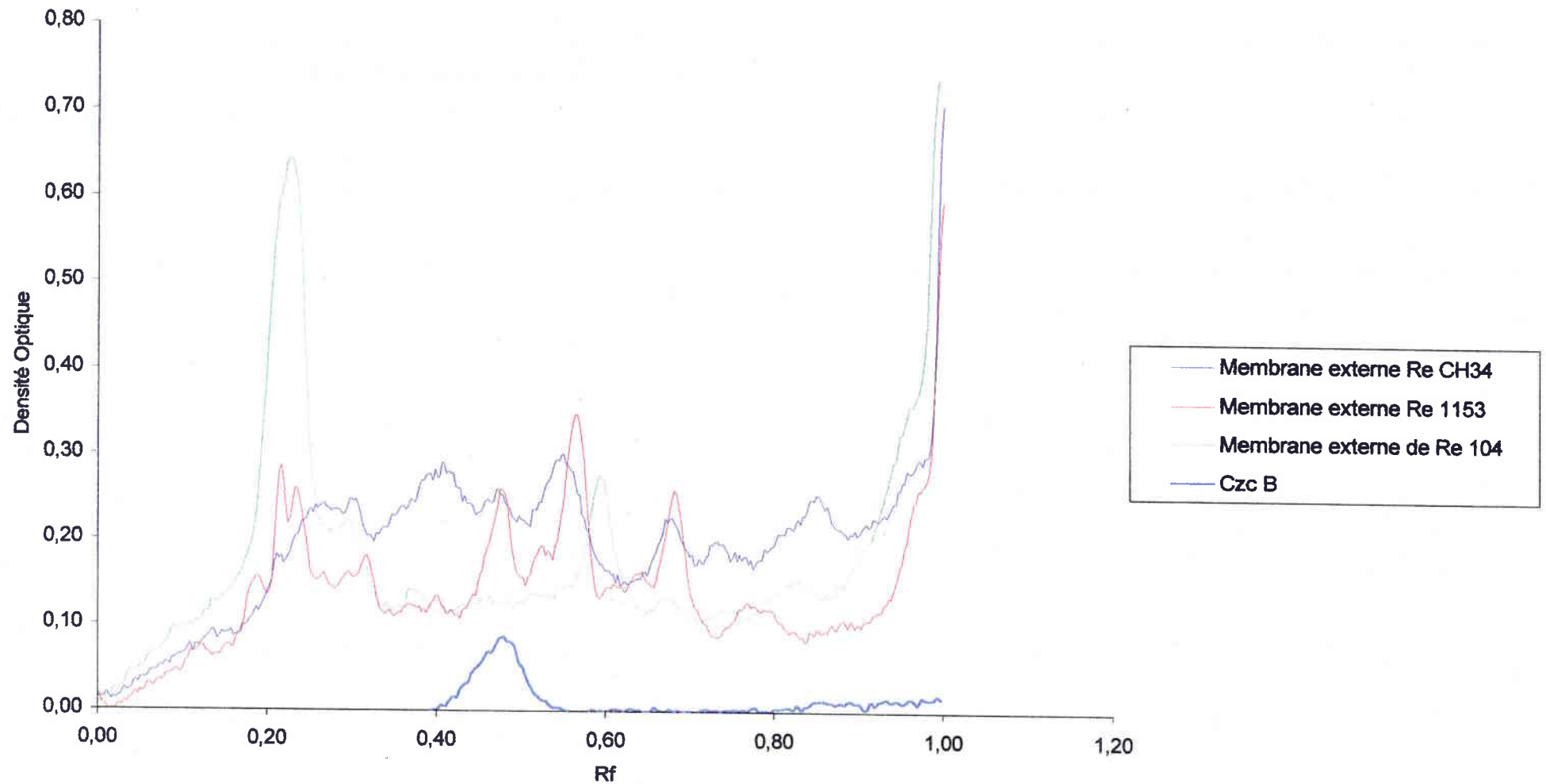


Figure 31 : spectres de densité de la protéine reconnue par les anti-Czc B

c. Analyse des anticorps polyclonaux produits contre la séquence aminée czc C

Cette protéine membranaire, formée de deux sous-unités, aurait un poids moléculaire proche de 80 kDa (Große *et al.* 1999). Elle interviendrait en fin de processus, et permettrait la libération des cations bivalents dans le milieu extracellulaire.

L'épitope (les épitopes) reconnus par les anticorps initiés par la séquence d'acide aminée czc C ont été analysés d'après les techniques développées pour l'identification de Czc A et Czc B (figures 32 et 33).

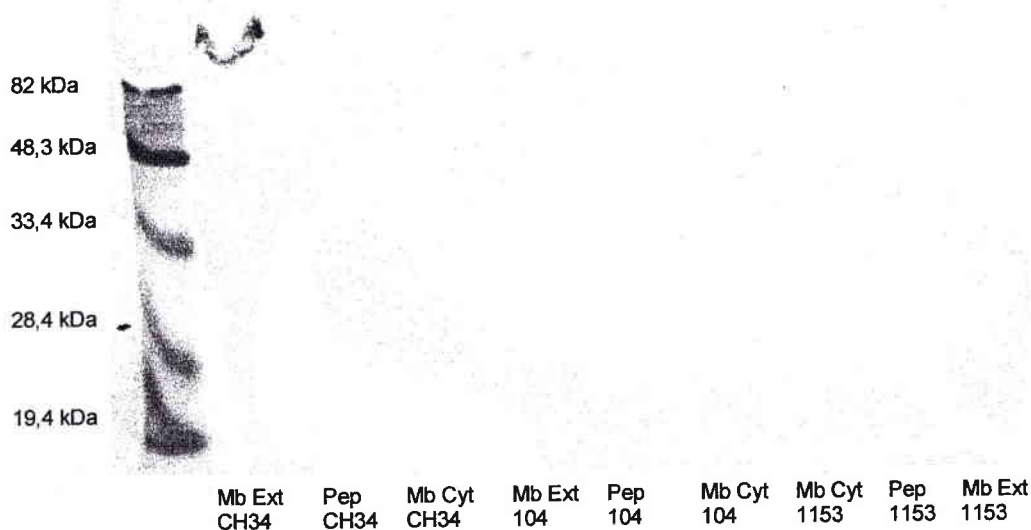


Figure 32 : western blot des anti-Czc C

La protéine reconnue est une protéine de la membrane externe d'environ 88 kDa, exprimée par *Ralstonia eutropha* CH34 et *Ralstonia eutropha* 1153 (figures 32 et 33). Bien que Rensing *et al.* suggèrent en 1997 une localisation périplasmique, Dong et Mergeay en 1994 et Silver et Phung en 1996, ont mis en évidence des similitudes de topologie avec les protéines de la famille des facteurs de membrane externe. Curieusement, cette protéine apparaît à un poids moléculaire d'environ 88 kDa, ce qui pourrait correspondre à une forme monomérique. En effet, la bibliographie présente cette protéine comme un homodimère d'environ 80 kDa.

Spectre de densité de la membrane externe des souches testées

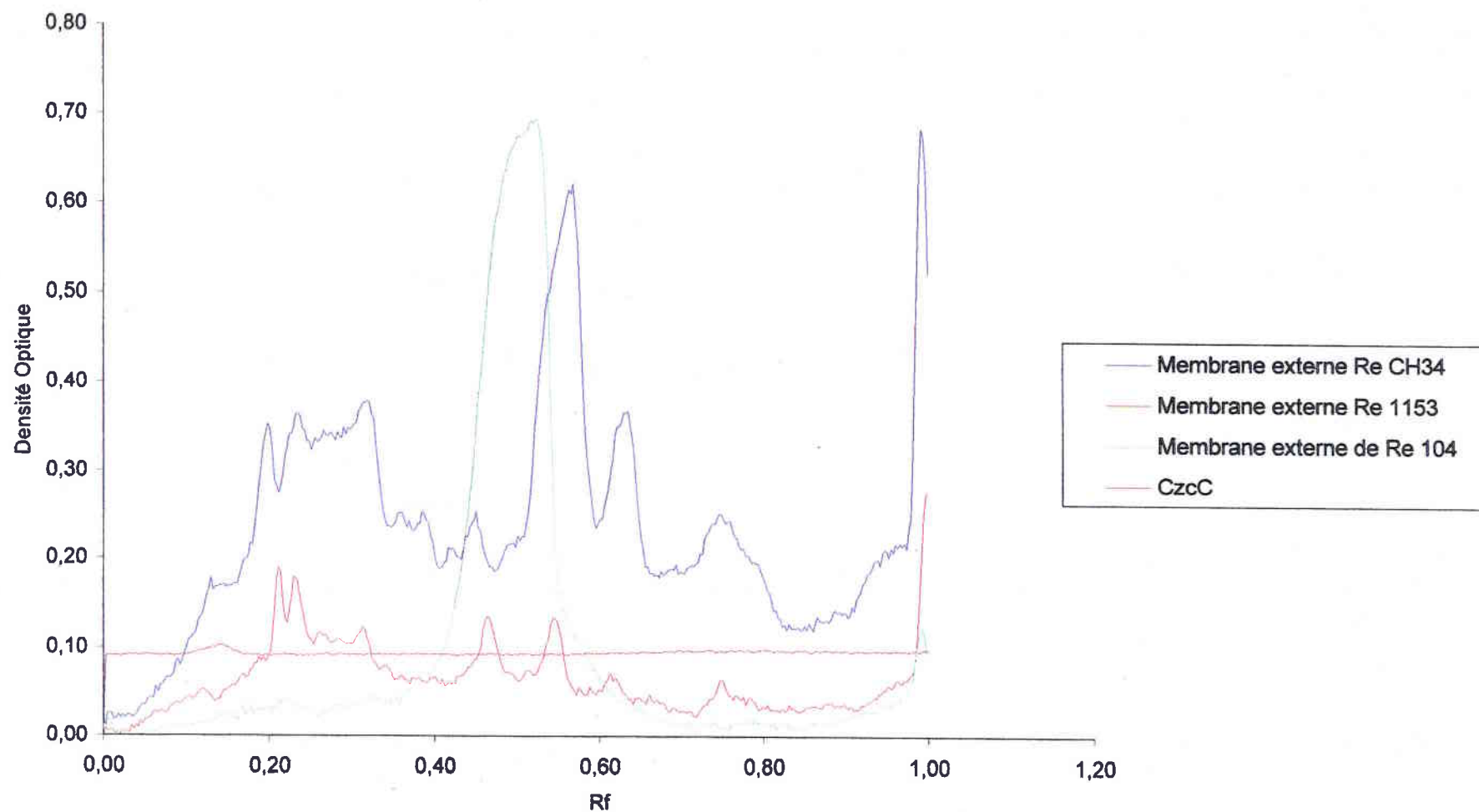


Figure 33 : spectres de densité de la protéine reconnue par les anti-Czc C

d. Analyse des anticorps polyclonaux produits contre la séquence aminée czc D

Cette protéine est, sans doute, la moins bien connue du système. En effet, seule, elle permettrait l'excrétion des métaux vers le milieu extérieur, mais elle jouerait également un rôle dans la régulation du système czc (Anton *et al.*, 1999). Elle serait localisée dans la membrane cytoplasmique, où elle formerait entre quatre et six hélices transmembranaires. L'analyse bibliographique ne nous a cependant pas permis de déterminer son poids moléculaire. Les anticorps produits pour identifier cette protéine ont été testés (figure 34).

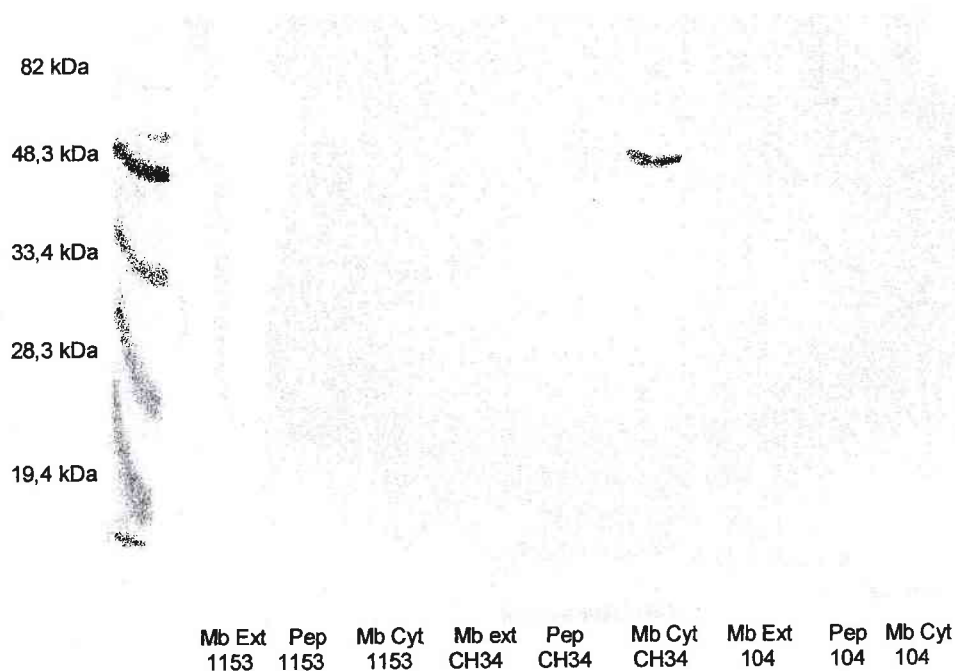


Figure 34 : Western Blot des enveloppes bactériennes en présence d'anti-CzcD

Spectre de densité de la membrane cytoplasmique des souches testées

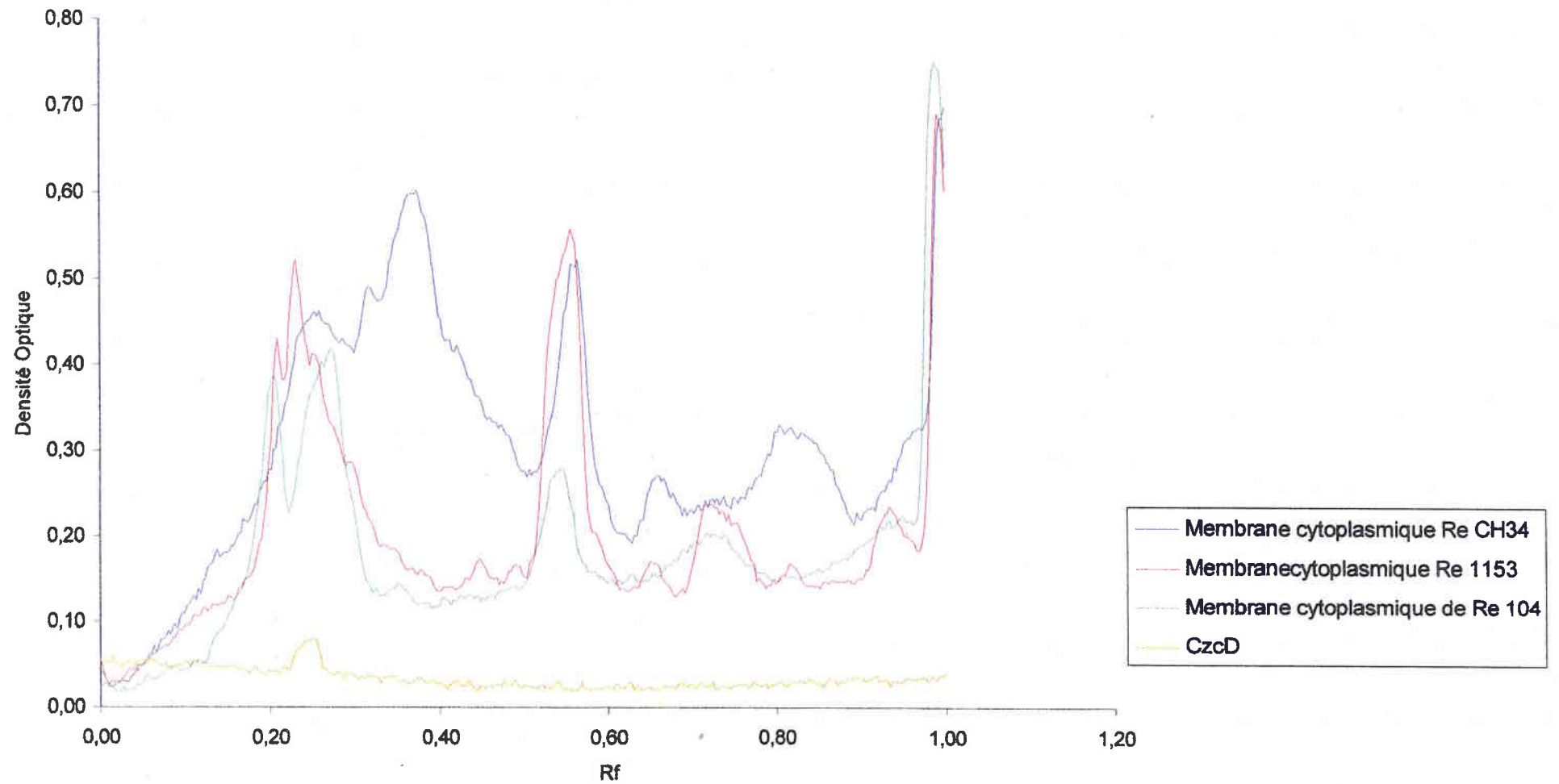


Figure 35 : Spectre de densité de la protéine reconnue par les anti-CzcD

Les anticorps anti-CzcD testés sur des enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, 1153 et 104, puis marqué par un anticorps secondaire et colorés par la phosphatase alcaline (Figure 34) mettent en évidence une protéine de 60,6 kDa. Cette protéine fait partie de la membrane cytoplasmique. La protéine reconnue par ces anticorps n'étant identifiée que dans la membrane cytoplasmique, de la souche cultivée en présence de métaux, plusieurs points peuvent en être déduits :

Premièrement, l'expression de cette protéine est métalloïde dépendante, ce qui explique pourquoi elle n'est pas présente chez *Ralstonia eutropha* 104.

Deuxièmement, cette protéine est ancrée dans la membrane cytoplasmique, mais elle ne s'étend pas jusqu'au peptidoglycane. En effet, elle n'a pas été identifiée dans cette enveloppe.

Enfin, le graphique présentant les spectres de densité confirme que cette protéine a un poids moléculaire de 60,6 kDa.

Ces observations tendent à démontrer que la protéine Czc D est au sein du système *czc*, synthétisé par *Ralstonia eutropha* CH34, telle qu'elle a été schématisée sur le modèle proposé.

e. Conclusions concernant le système *czc*

Les protéines du système *czc* de résistances aux cobalt, zinc, cadmium chez *Ralstonia eutropha* CH34, ne sont pas suffisamment exprimées par rapport aux autres protéines des enveloppes pour être purifiées et identifiées par des méthodes biochimiques. C'est pourquoi des anticorps spécifiques de chacune des protéines du système ont été synthétisés chez des souris, par injections de séquences d'acides aminés.

Afin d'identifier les protéines dans chacune des enveloppes, la liaison antigène-anticorps a été révélée, en western blot, par un anticorps secondaire marqué à la phosphatase alcaline. Ces tests ont permis de conclure sur la localisation des protéines et leur poids moléculaire :

- Czc A : serait une protéine ancrée dans la membrane cytoplasmique, mais qui s'étend dans le peptidoglycane et jusque dans la membrane externe. Or Goldberg *et al.*, en 1999 présentent cette protéine comme une protéine de la membrane cytoplasmique avec une partie périplasmique. Cependant, ceci

expliquerait pourquoi cette protéine de 120 kDa, seule, permet l'expulsion des cations bivalents (Rensing *et al.*, 1997 ; Taghavi *et al.*, 1997).

- Czc B : protéine de 33-36 kDa, elle est surproduit en pression métallique et est localisée dans le peptidoglycane. La protéine identifiée pourrait être constituée de deux sous-unités de 33 kDa. En effet, cette protéine apparaît comme une protéine de fusion membranaire, dimérique de 66 kDa (Große *et al.*, 1999).

- Czc C : protéine de la membrane externe, de 88 kDa, elle pourrait être monomérique ou constituée de deux sous-unités, n'ayant pas été dissociées au cours de l'électrophorèse. En effet, cette protéine est présentée comme une protéine dimérique, d'un poids total de 80 kDa et qui permet l'expulsion des cations métalliques vers le milieu extracellulaire, au niveau de la membrane externe, par Große *et al.*, en 1999.

- Czc D : cette protéine de 60,6 kDa a été identifiée au niveau de la membrane cytoplasmique de *Ralstonia eutropha* CH34 uniquement. Or, Anton *et al.*, en 1999, révèlent que cette protéine, de la famille des Facilitateurs de Diffusion de Cations, présente entre 4 et 6 hélices, ancrées dans la membrane cytoplasmique

IV.9. Perspectives et premiers résultats.

Cette étude a eu pour principal objectif d'identifier les systèmes de résistances au cadmium, cobalt, zinc et de transport de fer chez *Ralstonia eutropha* CH34, mais également de révéler un lien éventuel entre ces deux mécanismes.

Or, dans des conditions de stress environnemental, tel la présence de concentrations importantes de métaux, la cellule bactérienne devient « avare » en énergie, afin de résister à ces conditions extrêmes. Cependant, le transport de fer, comme nous l'avons vu au cours de l'étude, est énergie-dépendant (Postle, 1999). Ces deux observations mises en relation, nous ont amenées à formuler l'hypothèse suivante :

→ l'excrétion des cations bivalents dans le milieu extracellulaire, par le système *czc* pourrait être due, non pas à un gradient de protons, mais à un gradient de fer ferreux (figure 36).

La première étape dans la démonstration de cette hypothèse est de vérifier la présence de fer ferreux dans le milieu de culture. En effet, le fer est apporté sous forme de citrate ferrique. Or le milieu de culture contient de l'acide gluconique, apporté comme source de carbone, qui est un réducteur. De plus, le milieu est stérilisé avant ensemencement, par chauffage à 120°C, pendant 20 minutes. Cette action peut favoriser la réduction du fer ferrique en fer ferreux. Ainsi le fer total et le fer ferreux ont été dosés dans le milieu de culture, selon la Norme AFNOR NF T 90.017. La différence de ces deux dosages donne la quantité de fer ferrique. Plusieurs dosages ont été effectués au cours de la préparation du milieu (figure 36):

1. avant ajout de fer, afin de déterminer si les composants du milieu de culture apportent une quantité significative de fer.
2. avant et après autoclave, afin de déterminer le rôle de cette étape dans le processus de réduction du fer.

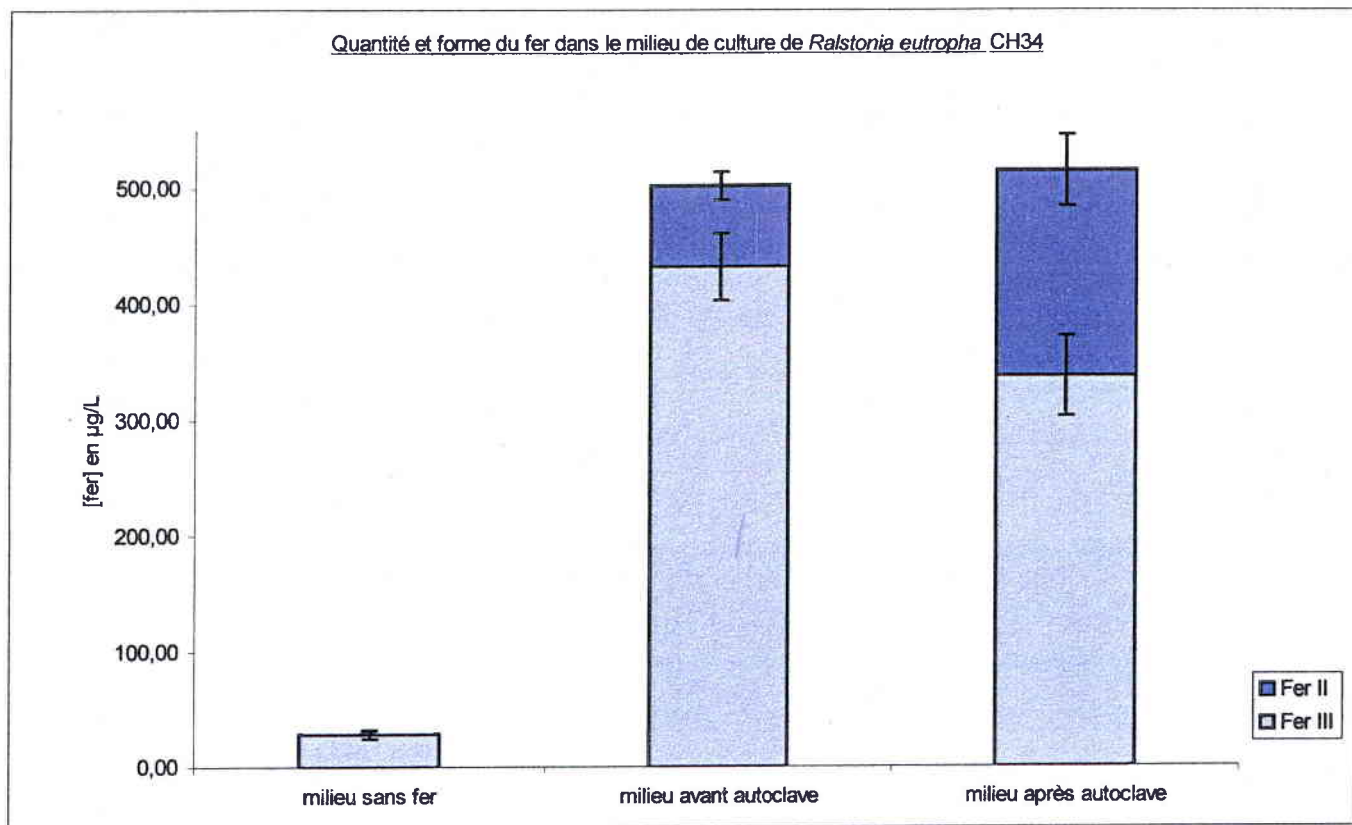


Figure 36 : composition du milieu de culture en fer II et fer III

Les différents minéraux et molécules organiques apportent $28,3 \pm 3,58$ µg/L de fer ferrique, soit 5 % du fer total avant stérilisation. Cependant, il est uniquement sous forme oxydée.

Après autoclave (colonne 3), le graphique met en évidence que 34,3 % du fer est sous forme réduite (soit 2,5 fois plus qu'avant autoclave). Ainsi, plus de 1/3 du fer en solution est sous forme ferreuse, plus biodisponible pour la bactérie.

Il est donc logique de supposer que la bactérie absorbera d'abord le fer ferreux biodisponible, et plus particulièrement en présence de pressions métalliques.

Afin de confirmer ou non l'hypothèse formulée, nous étudierons l'expression des protéines du système *czc*, dans les enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34 cultivée en présence de fer réduit et en pressions métalliques.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a eu pour principal objectif d'identifier les protéines impliquées dans le système de résistance *czc* et le transport du fer. La connaissance de ces systèmes est essentielle pour l'utilisation de *Ralstonia eutropha* CH34 dans la remédiation des métaux dans l'eau et les sols.

Deux souches dérivées de *Ralstonia eutropha* CH34 ont été utilisées comme témoin :

- *Ralstonia eutropha* 1153, qui surexprime la production de sidérophores, est le témoin positif des deux systèmes
- *Ralstonia eutropha* 104, dépourvue des plasmides de résistances, est le témoin positif du système de transport de fer.

Après vérification de la pureté des souches, et détermination des concentrations minimales d'inhibition pour le cadmium, le zinc et le cobalt, les enveloppes bactériennes de *Ralstonia eutropha* ont été séparées. Le rendement de cette étape et la pureté des enveloppes ont été déterminées par dosages de marqueurs spécifiques et non spécifiques :

- le KDO, marqueur de la membrane externe
- la SDH, marqueur de la membrane cytoplasmique
- les hexosamines, principalement retrouvées dans le peptidoglycane

Chaque enveloppe a été obtenue avec un rendement d'environ 98 %. Leur composition protéique en pression métallique et/ou en absence de fer a été établie par électrophorèse SDS-PAGE. Cette première partie de l'étude a révélé la présence d'une protéine de la membrane externe, d'environ 45 kDa, dont l'expression est régulée négativement par la présence de fer, chez *Ralstonia eutropha* 104.

D'autres protéines impliquées dans la résistance aux cadmium, zinc, cobalt (*czc*) ont été mises en évidence, mais cette technique reste empirique et peu précise.

Au vue de ces résultats, ce travail s'est orienté autour de deux axes :

- Premièrement, une technique de purification de protéines membranaires a été mise au point, afin d'isoler la protéine membranaire de 45 kDa de *Ralstonia eutropha* 104. Un suivi d'adsorption du fer et de métaux a été réalisé sur la membrane externe de cette souche, afin d'en déterminer le mode d'absorption.

- Deuxièmement, à partir de cette première série d'expériences, il a été nécessaire de développer une technique d'identification spécifique des protéines composant le système *czc*. Nous avons donc choisi de produire des anticorps polyclonaux reconnaissant ces protéines. Ces anticorps ont été induits par une séquence d'acides aminés, sélectionnée après analyse bibliographique, en fonction de leur hydrophilie.

La technique de purification mise au point pour isoler la protéine de 45 kDa repose sur trois étapes : extraction des protéines par du n-octylpolyoxyéthylène, dialyse et concentration de l'échantillon protéinique et purification par chromatographie d'échanges ioniques. Cette méthode a permis d'obtenir une protéine pure et qui représente 40 % des protéines membranaires totales.

Cette protéine sera reconstituée dans une bicouche lipidique et un suivi d'adsorption sera réalisé afin de déterminer si elle intervient dans le transport du fer chez *Ralstonia eutropha* 104. Des tests préliminaires ont été réalisés sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104 et ont montré que :

- l'adsorption du fer ferrique par la membrane externe de cette souche n'atteint pas la saturation, même en présence de 15 mg de fer/L. Par contre, l'isotherme de Freundlich obtenu pour *Ralstonia eutropha* CH34, dans les mêmes conditions opératoires, révèle au moins deux types d'adsorption. Le premier, dont la constante d'affinité forte est comparable à celle de *Ralstonia eutropha* 104 ($K_{CH34_1} = 12,75$ L/mg et $K_{104} = 14,48$ L/mg). Ce phénomène de fixation pourrait correspondre au mécanisme sidérophore – fer. Lorsque ce système arrive à saturation, un second mécanisme intervient alors, d'affinité beaucoup plus faible ($K_{CH34_2} = 4,60$ L/mg).

- l'adsorption du zinc et du cobalt sur la membrane externe de *Ralstonia eutropha* 104, semble être du au même système. Ces éléments, qui interviennent comme co-facteurs de métabolismes enzymatiques, seraient captés par un mécanisme rapidement saturé et de faible affinité ; un second, de forte affinité intervient alors (43,76 et 43,44 L/mg pour le cobalt et le zinc respectivement). Le premier pourrait correspondre à la fixation des métaux par le sidérophore.
- l'isotherme d'adsorption du cadmium (métal non indispensable à la bactérie) est inversée. En effet, la saturation du système qui fixe cet élément est rapide, sans doute afin de limiter l'entrée de ce toxique.

Cette protéine sera, par ailleurs, séquencée et cristallographiée, afin de déterminer la structure géométrique de cette biomolécule par diffractométrie X.

La dernière partie de l'étude a eu pour but de confirmer le modèle protéique proposé pour *czc*. L'analyse de *Czc A* a révélé une protéine qui traverse les enveloppes de *Ralstonia eutropha* CH34, d'un poids moléculaire d'environ 104 et 97 kDa dans les membranes cytoplasmique et externe respectivement, et de 80 kDa dans le peptidoglycane. Ceci pourrait expliquer la capacité de transporter les métaux à l'extérieur de la cellule, par cette protéine, seule.

La séquence de *Czc B* reconnue par les anticorps est une protéine de 36 kDa, qui pourrait correspondre aux deux sous-unités de la protéine, ou à sa partie périplasmique, ce qui est en accord avec la bibliographie.

Czc C a été identifiée dans le membrane externe, uniquement, à 88 kDa. Or la bibliographie la présente comme un dimère de 80 kDa. Cependant Rensing *et al.* suggèrent en 1997 que l'expulsion des métaux pourrait être due à ce niveau à une Omp Y.

Enfin, *Czc D* est une protéine ancrée dans la membrane cytoplasmique, d'un poids moléculaire d'environ 60 kDa.

Cette étude a permis d'identifier et de localiser avec précision les protéines impliquées dans ce système. Nous suggérons un mode d'action différent de celui proposé dans la bibliographie :

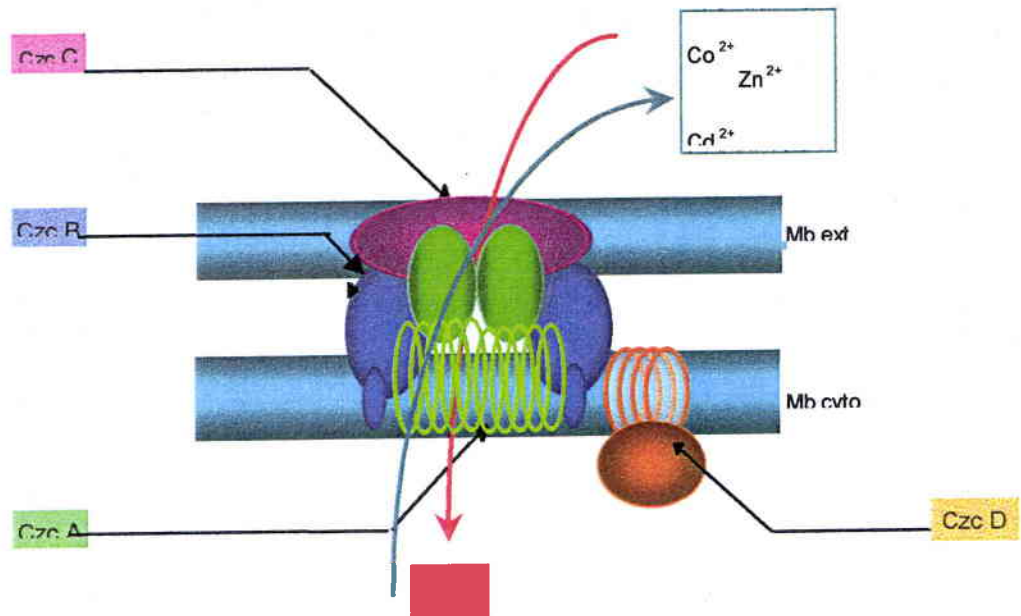


Figure 38 : Proposition de fonctionnement du système czc

→ le transport du fer ferreux pourrait être couplé à ce système de résistance, en induisant un gradient qui permet l'expulsion des métaux toxiques. En effet, la membrane externe de *Ralstonia eutropha* CH34 révèle deux modes de fixation du fer, contrairement à *Ralstonia eutropha* 104 (qui ne synthétise pas czc), qui n'en présente qu'un. Afin de confirmer cette hypothèse nous avons vérifié que le milieu de culture contient, en effet, près de 30 % de fer ferreux.

VI. LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- ACHOUAK W., PAGES J.M., DE MOT R., MOLLE G. and HEULIN T., 1998,**
 "A major membrane protein of *Rahnella quatis* functions as a porin and root adhesine", Journal of Bacteriology, Vol 180, N°4, p 909-913.
- ACHOUAK W., HEULIN T. and PAGES J.M., 2001,**
 "Multiple facets of bacterial porins", FEMS Microbiology Letters, Vol 199, p 1-7.
- AHMER B.M.M., THOMAS M.G., LARSEN R.A. and POSTLE K., 1995,**
 "Characterization of the *ExbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function stability", Journal of Bacteriology, Vol 177, N°16, p 4742-4747.
- AHRLAND S., CHAM I. and DAVIS N.R., 1958,**
 "The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions", Quarterly Review of Biology, Vol 12, p 265-276.
- ALLEN R.C., SARAVIS C.A. and MAURER H.R., 1984,**
 "Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of proteins : selected techniques", Eds de Gruyter, Berlin, p 105-113.
- ALTHAUS E.W., OUTTEN C.E., OLSON K.E., CAO H. and O'HALLORAN T.V., 1999,**
 "The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein", Biochemistry, Vol 38, p 6559-6569.
- AMES G.F.L., 1974,**
 "Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on Slabs", Journal of Biological Chemistry, Vol 249, N°2, p 634-644.
- AMINOFF D., 1961,**
 "Methods for the quantitative estimation of N-aceyl neuraminic acid and their application to their sialomucoids", Journal of Biochemistry, Vol 81, p 384-392.
- ANDRES Y., THOUAND G., BOUALAM M. and MERGEAY M., 2000,**
 "Factors influencing the biosorption of gadolinium by micro-organisms and its mobilisation from sand", Applied Microbiology Biotechnology, Vol 54, p 262-267.
- ANGERER A., ENZ S., OCHS M. and BRAUN V., 1995,**
 "Transcriptional regulation of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12. Fecl belongs to a new subfamily of sigma 70-type factors that respond to extracytoplasmic stimuli.", Molecular Microbiology, Vol 18, N°1, p 163-174.

- ANKENBAUER R.G. and QUAN H.N., 1994,**
 "Fpt A the Fe(III) – pyochelin receptor of *Pseudomonas aeruginosa* : a phenolate siderophore receptor homologous to hydroxamate siderophore receptor", Journal of Bacteriology, Vol 176, N°2, p 307-319.
- ANTON A., GROßE C., REIßMANN J., PRIBYL T. and NIES D.H., 1999,**
 "Czc D is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia eutropha* sp strain CH34", Journal of Bacteriology, Vol 181, N°22, p 6876-6881.
- ASSIM, ASSociation des enseignants d'IMmunologie des Universités de langue française, 1990,**
 "Méthodes en immunologie", Medsi/Mc Graw-Hill, p 1-37.
- BACH J.F. and LESAVRE P., 1993,**
 "Structure et gènes des immunoglobulines." in "Immunologie de la biologie à la clinique", Eds Médecine et Sciences/ Flammarion, France, p 63-68.
- BACHEM, 1996,**
 "Tensides/Detergents", Information Sheet, BACHEM BIOCHIMIE SARL, Voisins le Bretonneux, 17 p.
- BARCELOUX D.G., 1999,**
 "Zinc", Journal of Toxicology and Clinical Toxicology, Vol 37, N°2, p 265-278.
- BEVERIDGE T.J. and KOVAL J.F., 1981,**
 "Binding of metal to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12", Applied and Environmental Microbiology, Vol 42, p 325-335.
- BEYERSMANN D. and HARTWING A., 1992,**
 "The genetic toxicology of cobalt", Toxicology and Applied Pharmacology, Vol 115, N°1, p 137-145.
- BJORCK L. and KRONVALL G., 1994,**
 "Purification and some proprieties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent", Journal of Immunology, Vol 133, p 969-974.
- BLAKE M.S., JOHNSON K.H., RUSSELL-JONES and GOTSCHLICH E.C., 1984,**
 "A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western Blots", Analytical Biochemistry, Vol 136, p 175-179.
- BOISSET M., 1996,**
 "Plomb, cadmium et mercure dans l'alimentation, Evaluation et gestion", Eds

Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 237 p.

BOOTH B.R. and CURTIS N.A.C., 1977,

"Separation of the cytoplasmic and outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO.1", Biochemica and Biophysica Research Community, Vol 74, p 1168-1176.

BRAUN V. and KILLMANN H., 1999,

"Bacterial solutions to the iron-supply problem", -reviews-, Trends in Biochemical Sciences, Vol 24, p 104-109.

BRIAT JF., 1992,

"Iron assimilation and storage in prokaryotes", Journal of General Microbiology, Vol 138, Pt 12, p 2475-2483.

BRIAT JF. and LEBRUN M., 1999,

"Plant responses to metal toxicity", Academic Science III, Vol 322, N°1, p 43-54.

BRUINS M.R., KAPIL S. and OEHME F.W., 2000,

"Review : Microbial resistance to metals in the environment", Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol 45, p 198-207.

CATTY D., 1989,

"Antibodies, volume II : a practical approach", IRL, Oxford University Press, Oxford.

CEVENINI R., SARUBRI V., PILERI S., RATTI G. and LA PLACA M., 1991,

"Development of transplantable ascites tumours which continuously produce polyclonal antibodies in pristine primed BALB/C mice immunized with bacterial antigens and complete Freud's adjuvant", Journal of Immunology Methods, Vol 140, p 111-118.

CHANG C., MOOSER A. PLÜCKTHUN A. and WLODAWER A., 2001,

"Crystal Structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold", Journal of Biological Chemistry, sous presse.

CHAMBERS C.E., MAC INTYRE D.D., MOUCK M. and SOKOL P.A., 1996,

"Physical and structural characterization of yersiniophore, a siderophore produced by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*", Biometals, Vol 9, N° 2, p 157-167.

COLLARD J.M., CORBISIER P., DIELS L., DONG Q., JANTHON C., MERGEAY M., TAGHAVI S., VAN DER LELIE D., WILMOTTE A. and WUERTS S., 1994,

"Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34 : Mechanisms and Application", Microbiology Reviews, Vol 14, p 405-414.

CONNELL T.D., DICKENSON A., MARTONE A.J., MILITELLO K.T., FILIATRAUT M.J., HAYMAN M.L. and PITULA J., 1998,

"Iron starvation of *Bordetella avium* stimulates expression of five outer membrane proteins and regulates a gene involved in acquiring iron from serum", Infection and Immunity, Vol 66, N° 24, p 3597-3605.

COSTERTON J.W., FORSBERG C., NATULA T.I., BUCKMIRE F.L.A. and MAC LEOD R.A., 1967,

"Nutrition and metabolism of marine bacteria. XVI. Formation of protoplasts, spheroplasts and related forms from a gram-negative marine bacterium", Journal of Bacteriology, Vol 94, p 1764-1777.

COULANGES V., ANDRE P., ZIEGLER O., BUCHHEIT L. and VIDON D.J., 1997,

"Utilization of iron-catecholamine complexes involving ferric reductase activity in *Listeria monocytogenes*", Infection and Immunity, Vol 65, N°7, p 2778-2785.

COY M. and NEILANDS J.B., 1991,

"Structural dynamics and functional domains of the Fur protein", Biochemistry, Vol 30, N°33, p 8201-8210.

CROSA J.H., 1989,

"Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria", Microbiological Reviews, Vol 53, N°4, p 517-530.

CUTTING J.A. and ROTH T.F., 1973,

"Staining of phospho-proteins on acrylamide gel electrophograms", Analytical Biochemistry, Vol 54, p 386-394.

DAVID C., DARO A., SZALAI E., ATARHOUGH T. and MERGEAY M., 1996,

"Formation of polymeric pigments in the presence of bacteria and comparison with chemical oxidative coupling – II. Catabolism of tyrosine and hydroxyphenylacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* CH34 and mutants", European Polymer Journal, Vol 32, N°6, p 669-679.

DAVIS B.J., 1964,

"Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins", Annual New York Academic Science, Vol 121, p 404-427.

DE RORE H., TOP E., HOUVEN F., MERGEAY M. and VERSTRAETE W., 1994,

"Evolution of heavy metal resistant transconjugants in a soil environment with a concomitant selective pressure", Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Ecology 14, p 263-274.

- DEUTSCHER M.P., 1990,**
"Guide to Protein Purification", MP. DEUTSCHER, JN ABELSON and MI. SIMON, Eds Academic Press, San Diego, Methods in Enzymology, Vol 182, 894 p.
- DIELS L., FAELEN M., MERGEAY M. and NIES D., 1985,**
"Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34", Arch. Int. Physiol. Bioch., Vol 93, B27-B28.
- DIELS L. and MERGEAY M., 1990,**
"DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals", Applied and Environmental Microbiology, Vol 56, N°5, p 1485-1491.
- DIELS L., VAN ROY S., SOMERS K., WILLEMS I., DOYEN W., MERGEAY M., SPRINGAEL D. and LEYSEN R., 1995,**
"The use of bacteria immobilized in tubular membrane reactors for heavy metal recovery and degradation of chlorinated aromatics", Journal of Membrane Science, p 249-258.
- DONG Q. and MERGEAY M., 1994,**
"Czc/Cnr efflux : a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein", Molecular Microbiology, Vol 14, p 185-187.
- DRESSLER C., KUES U., NIES D.H. and FRIEDRICH B., 1991,**
"Determinants encoding resistances to several heavy metals in newly isolated copper-resistance bacteria", Applied and Environmental Microbiology, Vol 57, N°11, p 3079-3085.
- EITINGER C. and MANDRAND-BERTHELOT M.A., 2000,**
"Nickel transport systems in microorganisms", Archives of Microbiology, Vol 173, p 1-9.
- ELLIASSON M., OLSSON A., PALMCRANTZ E., WIBERG K., INGANAS M., GUSS B., LINBERG M. and UHLEN M., 1988,**
"Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G", Journal of Biological Chemistry, Vol 263, p 4323-4327.
- ENGLAND S. and SEIFTER S., 1990,**
"Precipitation Techniques", Methods in Enzymology, Vol 182, p 380-391.
- ESCOLAR L., PEREZ-MARTIN J. and DE LORENZO V., 1998,**
"Binding of the Fur (Ferric Uptake Regulator) Repressor of *Escherichia coli* to

arrays of the GATAAT sequence", Journal of Molecular Biology, Vol 283, N°3, p

EVANS S.L., ARCENEUX J.E., BYERS B.R., MARTIN M.E. and ARANHA H., 1986,
"Efficient iron transport in *Streptococcus mutans*", Journal of Bacteriology, Vol 168, N°3, p 1096-1099.

EXNER M.M., DOIG P., TRUST T.J. and HANCOCK R.E.W., 1995,
"Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*", Infection and Immunity, Vol 63, N°4, p 1567-1572.

FAELEN M., MERLIN C., GEUSKENS M., MERGEAY M. and TOUSSAINT A., 1993,
"Characterization of a temperate phage hosted by *Alcaligenes eutrophus* strain A5", Research in Microbiology, Vol 144, p 627-631.

FAHNESTOCK S., 1987,
"Cloned streptococcal protein G genes", TIBS, Vol 5, p 79-83.

FATH M.J. and KOLTER R., 1993,
"ABC transporters : bacterial exporters", Microbiological Reviews, Vol 57, N°4, p 995-1017.

FALLA J.A., BAUDA P. and BLOCK J.C., 1988,
"Isolation of cell envelop of *Pseudomonas fluorescens*", Journal of Microbiological Methods, Vol 7, p 285-294.

FALLA J.A., 1990,
"Rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation des métaux (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+})", thèse de doctorat, Université de Metz, 200 p.

FEIN J.B., 2000,
"Quantifying the effect of bacteria on adsorption reactions in water-rock systems", Chemical Geology, Vol 169, p 265-280.

FINDLAY J.B.C., BRETT M. and PAPPIN D.J.C., 1981,
"Primary structure of C-terminal functional sites in ovine rhodopsin", Nature, Vol 293, p 314-316.

FONTECAVE M., COVES J. and PIERRE J.L., 1994,
"Ferric reductases or flavin reductases ?", Biometals, Vol 7, N°1, p 3-8.

- FORSBERG C.W., COSTERTON J.W. and Mc LEOD R.A., 1970,**
 "Quantitation Chemical Characteristics and Ultrastructure of the Three Outer Cell Wall Layers of a Gram-Negative Bacterium", Journal of Bacteriology, Vol 104, N°3, p 1354-1368.
- FOX C.F., LAW N., TSUKAGOSHI N. and WILSON G., 1970,**
 "A density label for membranes", National Academy of Sciences, Vol 2, p 598-605.
- FRENCH D.L., LASKOV R. and SCHARFF M.D., 1989,**
 "The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity", Science, Vol 244, p 1152-1157.
- GANDER J.E., 1984,**
 "Gel protein strains: glycoproteins", Methods in Enzymology, Vol 104, p 447-451.
- GALFRE G., HOWE S.C., MILSTEIN C., BUTCHER G.W. and HOWARD J.C., 1977,**
 "Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines", Nature, Vol 266, p 550-552.
- GARFIN D.E., 1995,**
 "Electrophoretic methods, reprinted from introduction to biophysical methods for proteins and nucleic acid research", A. GLASEL and M.P. DEUTSCHER, Bio-Rad, Eds Academic Press Inc., USA, 109 p.
- GARVEY J.S., CREMER N.E. and SUSSDORF D.H., 1977,**
 "Methods in Immunology : a laboratory text for instruction and research", Eds W.A. Benjamin, Inc.: Reading, Massachusetts.
- GILIS A., AYUB KHAN M., CORNELIS P., MEYER JM., MERGEAY M. and VAN DER LELIE D., 1996,**
 "Siderophore-mediated iron uptake in *Alcaligenes eutrophus* CH34 and identification of ale B encoding the ferric iron-Alcaligin E receptor", Journal of Bacteriology, Vol 178, N°18, p 5499-5507.
- GILIS A., CORBISIER P., BAEYENS W., TAGHAVI S., MERGEAY M. and VAN DER LELIE D., 1998,**
 "Effect of the siderophore alcaligin E on the bioavailability of Cd to *Alcaligenes eutrophus* CH34", Journal of Industrial Microbial Biotechnology, Vol 20, N°1, p 61-68.
- GIRI L., 1990,**
 "Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology, Vol 182, p 380-391.

- GOLDBERG M., PRIBYL T., JUHNKE S. and NIES D.H., 1999,**
 "Energetics and topology of Czc A, a cation antiporter of the resistance –
 nodulation cell division protein family", Journal of Biological Chemistry, Vol 274,
 N°37, p 26065-26070.
- GRASS G., GROßE C. and NIES H.D., 2000,**
 "Regulation of the cnr cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp
 strain CH34", Journal of Bacteriology, Vol 182, N°5, p 1390-1398.
- GRAVITO M. and ROSENBUSCH J.P., 1986,**
 "Isolation and crystallization of bacterial porin", Methods in Enzymology, Vol 125,
 p 306-328.
- GRISCELLI C., PAUPE J. and PONVERT C., 1985,**
 "Immunologie fondamentale et immunopathologie", Eds MARKETING, Paris, 350
 p.
- GORIS J., DE VOS P., COENYE T., HOSTE B., JANSSENS D., BRIM H., DIELS L.,
 MERGEAY M., KERSTERS K. and VANDAMME P., 2001,**
 "Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia*
campinensis sp.nov., *Ralstonia metallidurans* sp.nov.and *Ralstonia basilensis*
 Steinle et al. 1998 emend.", International Journal of Systematic and Evolution ary
Microbiology, Vol 51, p 1773-1782.
- GROßE C., GRASS G., ANTON A., FRANKE S., NAVARRETE SANTOS A., LAWLEY
 B., BROWN N. and NIES D.H., 1999,**
 "Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant
 from *Alcaligenes eutrophus* CH34", Journal of Bacteriology, Vol 181, N°8, p
 2385-2393.
- GUERINOT L., 1994,**
 "Microbial iron transport", Annual Review of Microbiology, Vol 48, p 743-772.
- HAAG H., HANTKE K., DRECHSEL H., STOJILJKOVIC I., JUNG G. and ZAHNER
 H., 1993,**
 "Purification of yersiniabactin : a siderophore and possible virulence factor of
Yersinia enterocolitica", Journal of General Microbiology, Vol 139, p 2159-2165.
- HADDOCK B.A. and JONES C.W., 1977,**
 "Bacterial respiration", Bacterial Review, Vol 41, p 47-99.
- HANCOCK R.E.W. and NIKAIÐO H., 1978,**
 "Outer membranes of gram negative bacteria XIX. Isolation from *Pseudomonas*
aeruginosa PAO 1 and use in reconstitution and definition of the permeability

barrier", Journal of Bacteriology, Vol 136, N°1, p 381-390.

HANTKE K., 2001,

"Iron and metal regulation in bacteria", Current Opinion in Microbiology, Vol 4, N°2, p 172-177.

HATMANN A. and BRAUN V., 1981,

"Iron uptake and iron limited growth", Archives of Microbiology, Vol 130, p 353-356.

HARRIS E.L.V. and ANGAL S., 1995,

"Proteins purification methods, a practical approach", E.L.V.HARRIS and S.ANGAL, Oxford, "The Practical Approach Series", 313 p.

HIGGS P.I., MYERS P.S. and POSTLE K., 1998,

"Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex : ExbB and ExbD form homomultimers", Journal of Bacteriology, Vol 180, N°22, p 6031-6038.

HJELMELAND L.M. and CHAMBACH A., 1984,

"Solubilization of functional membrane proteins", Methods in Enzymology, Vol 104, p 305-318.

HJELMELAND L.M., 1990,

"Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology, Vol 182, p 253-263.

HONG T.H., CHEN S.T., TANG T.K., WANG S.C. and CHANG T.H., 1989,

"The production of polyclonal and monoclonal antibodies in mice using novel immunization methods", Journal of Immunological Methods, Vol 120, p 151-157.

HOYLE B.D. and BEVERIDGE T.J., 1983,

"Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*", Applied and Environmental Microbiology, Vol 46, p 749-752.

JASCOW, 1990,

"Guide to Protein Purification", MP. DEUTSCHER, JN ABELSON and MI. SIMON, "Methods in Enzymology", Vol 182, 894 p.

JENSEN A.A. and TÜCHSEN F., 1990,

"Cobalt exposure and cancer risk", Critical Reviews in Toxicology, Vol 20, N°6, p 427-437.

JUSTE, CASSIN, GOMEZ, LINERES, MOQUOT, FEIX and WIART, 1995,

"Les micropolluants métalliques dans des boues résiduelles des stations

d'épurations urbaines", Convention ADEME-INRA, Paris, 209 p.

KAMMLER M., SCHON C. and HANTKE K., 1993,

"Characterization of the ferrous ion uptake system of *Escherichia coli*", Journal of Bacteriology, Vol 175, N° 19, p 6212-6219.

KASAHARA M. and ANRAKU Y., 1974,

"Succinate deshydrogenase of *Escherichia coli* membrane vesicles", Journal of Biochemistry, Vol 76, p 956-966.

KERSTERS K. and DE LEY J., 1984,

"Gram negative aerobic rods and cocci, Genus *Alcaligenes*", in Kriegs NR. et Holt JG (Eds) Bergeay's manual of systematic bacteriology, Williams et Wilkins, Baltimore, Vol 1, p 141-199.

KOSTER W. and BRAUN V., 1990,

"Iron (III) hydroxamate transport into *Escherichia coli*. Substrate binding to the periplasmic FhuD protein", Journal of Biological Chemistry, Vol 265, N°35, p 21407-21410.

KATO Y., KOMAIYA K. and HASHIMOTO T., 1982,

"Study of experimental conditions in high-performance ion-exchange chromatography of proteins", Journal of Chromatography, Vol 246, p 13-22.

KATO Y., NAKAMURA K. and HASHIMOTO T., 1983,

"New anion exchanger for the separation of proteins and nucleic acids", Journal of Chromatography, Vol 266, p 385-394.

KATO Y., NAKAMURA K. and HASHIMOTO T., 1984,

"New high-performance cation exchanger for separation of proteins", Journal of Chromatography, Vol 294, p 207-212.

KATO Y., KATIMURA T., NAKAMURA K., MITSUI A., YAMASAKI Y. and HASHIMOTO T., 1987a,

"High-performance liquid chromatography of membrane proteins", Journal of Chromatography, Vol 391, p 395-407.

KATO Y., KATIMURA T., MITSUI A. and HASHIMOTO T., 1987b,

"High-performance ion-exchange chromatography of proteins on non-porous ion exchangers", Journal of Chromatography, Vol 398, p 327-334.

- KATO Y., YAMASAKI Y., MORIYAMA H., TOKUNAGA K. and HASHIMOTO T., 1987c,**
"New high-performance gel filtration columns for proteins separation", Journal of Chromatography, Vol 404, p 333-339.
- KENNEDY R.M., 1990,**
"Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology, Vol 182, p 339-342.
- KÖHLER G. and MILSTEIN C., 1975a,**
"Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature, Vol 256, p 495-497.
- KÖHLER G. and MILSTEIN C., 1975b,**
"Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion", European Journal of Immunology, Vol 6, p 511-519.
- KUBY J., 1992,**
"Immunology", Eds W.H. Freeman and Company, New York, 585 p.
- KUNITO T., KUSANO T., OYAZU H., SENOO K., KANAZAWA S. and MATSU S. 1996,**
"Cloning and Sequence analysis of *czc* genes in *Alcaligenes* sp strain CT14", Bioscience en Biotechnology Biochemistry, Vol 60, N°4, p 699-704.
- LAÏ C.H., BLOOMQUIST C. and LELJEMARK W.F., 1990,**
"Purification and characterization of an outer membrane protein adhesin from *Haemophilus parainfluenzae* HP 28", Infection and Immunity, Vol 58, N°12, p 3833-3839.
- LAKEY J.H. and PATTUS F., 1989,**
"The voltage-dependent activity of *Escherichia coli* porins in different planar bilayer", European Journal of Biochemistry, Vol 186, N° 1-2, p 303-308.
- LAEMMLI U.K., 1970,**
"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature (London), Vol 227, p 680-685.
- LEJEUNE P., MERGEAY M., VAN GIJSEGEN F., FAELEN M., GERITS J. and TOUSSAIN A., 1983,**
"Chromosome transfer and R-prime plasmid formation mediated by plasmid pULB113 (RP4::mini-Mu) in *Alcaligenes eutrophus* CH34 and *Pseudomonas fluorescens* 6.2.", Journal of Bacteriology, Vol 3, p 1015-1026.
- LE MAIRE M., KWEE S., ERSEN J.P. and MOLLER J.V., 1983,**
"Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane

proteins", European Journal of Biochemistry, Vol 166, p 308-312.

LEE C., LEVIN A. and BRANTON D., 1987,

"Copper staining : a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels", Analytical Biochemistry, N°143, p1019-1027.

LESELLIER E. and TCHAPALA A., 2001,

"Classification comparative de 109 colonnes en chromatographie liquide à polarité de phases inversées", Communication Orale, Congrès Sep'2001, 12-14 juin 2001, Paris.

LEVISSON P.R., MUMFORD C., STREATER M., BRANDT-NIELSEN A., PATHIRANA N.D. and BADGER S.E., 1997,

"Performance comparison of low-pressure ion-exchange chromatography media for protein separation", Journal of Chromatography A, Vol 760, p 151-157.

LIESEGANG H., LEMKE K., A.SIDDIQUI R. and SCHLEGEL H.G., 1993,

"Characterisation of the inducible nickel and cobalt resistance determination cnr from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34", Journal of Bacteriology, p767-778.

LOMAX D.P., ROUBAL W.T., MOORE J.D. and JOHNSON L.L., 1998,

"An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*) : development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids", Comparative Biochemistry and Physiology, Vol 121 (part B), p 425-436.

LOPEZ J., COFRE G. and RODRIGUEZ M., 1996,

"A study of some pathogenic factors of *Salmonella typhi*", Revisca Medica de Chile, Vol 120, N°4, p 365-374.

MASSAD G., ARCENEUX J.E. and BYER B.R., 1991,

"Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species", Journal of Genetic and Microbiology, Vol 137, p 237-241.

MELCHIOR F., LEDRICH M.L., FOUCAUD L. and FALLA J., 2001,

"Rapid Identification of *Ralstonia eutropha* CH34 using monoclonal antibodies", Hybridoma, sous presse.

MERGEAY M., HOUBA C. and GERITS J., 1978,

"Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions : evidence from curing in a *Pseudomonas*", Arch. Int. Physiol. Bioch., Vol 86, p 440-441.

MERGEAY M., NIELS D., SCHELDEL H.G., GERITS J., CHARLES P. and VAN GIJSEGEN F., 1985,

"*Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals", Journal of Bacteriology, p 328-334.

MERGEAY M., 1990,

"Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance", Trends in Biotechnology, Vol 9, N°1, p 17-24.

MERRIL C.R., 1990,

"Gel staining techniques", Methods in Enzymology, Vol 182, p 477-488.

MEYER J.M., 2000,

"Pyoverdines : pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* Species", Archives of Microbiology, Vol 174, p 135-142.

MIGNINI F., BALDUCCI E. and COVELLI I., 1994,

"Netilmicin influences siderophores production and iron receptor expression in *Escherichia coli*", New Microbiology, Vol 17, N°4, p 337-340.

MISHELL B.B. and SHIIGI S.M., 1980,

"Selected Methods in immunology", Eds W.H. Freeman and company, San Francisco.

MODUN B., EVANS R.W., JOANNOU C.L. and WILLIAMS P., 1998,

"Receptor-mediated recognition and uptake of iron from human transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*", Infection and Immunity, Vol 66, N°8, p 3591-3596.

MODUN B. and WILLIAMS P., 1999,

"The staphylococcal transferrin-binding protein is cell wall glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase", Infection and Immunity, Vol 67, N°3, p 1086-1092.

MOECK G.S. and COULTON J. W., 1998,

"TonB-dependent iron acquisition : mechanisms of siderophore-mediated active transport", Molecular Microbiology, Vol 28, p 675-681.

MONTREUIL J. and SPIK G., 1963,

"Microdosage des glucides. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux", Monographies du Laboratoire De Chimie-Biologie de la Faculté des Sciences, Lille, p 74-89.

- MÜNZINGER M., TARAZ K. and BUDZIKIEWICZ H., 1999,**
"Staphyloferrine B, a citrate siderophore of *Ralstonia eutropha*", Zeitschrift für Naturfortschritt, Vol 54, P 867-875.
- NACHALS M.M., MARGULIES S.I. and SELIGMAN A.M., 1960,**
"A colorimetric method for the estimation of succinic deshydrogenase activity", Journal of Biological Chemistry, Vol 235, p 499-503.
- NAMIRANIAN S., RICHARDSON D.J., RUSSELL D.A. and SODEAU J.R., 1997,**
"Excited state proprieties of the siderophore pyochelin and its complex with zinc ions", Photochemistry and Photobiology, Vol 65, p 777-782.
- NEILANDS J.B., 1981,**
"Microbial iron compounds", Annual Review of Biochemistry, Vol 50, p 715-731.
- NEILANDS J.B., 1982,**
"Microbial envelope proteins related to iron", Annual Review of Microbiology, Vol 36, p 285-309.
- NEUGEBAUER J.M., 1990,**
"Detergents : an overview", Methods in Enzymology, Vol 182, p 239-252.
- NIEBOER E. and RICHARDSON D.H.S., 1980,**
"The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions", Environmental Pollution, Vol 1, p 3-26.
- NIES D.H. and SILVER S., 1989,**
"Plasmid-determined Inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*", Journal of Bacteriology, Vol 171, N°2, p 896-900.
- NIES D.H., 1992a,**
"Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel, in microbes", Plasmid 27, p 17-28.
- NIES D.H., 1992b,**
"Czc R and Czc D, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc and cadmium (czc System) in *Alcaligenes eutrophus*", Journal of Bacteriology, Vol 174, N°24, p 8102-8110.
- NIES D.H., 1995,**
"The cobalt, zinc and cadmium efflux system Czc ABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia Coli*", Journal of

Bacteriology, Vol 177, N°10, p 2707-2712.

NIES D.H., 1999,

"Microbial heavy-metal resistance", Applied Microbial Biotechnology, Vol 51, p 730-750.

OCHSNER U.A. and VASIL M.L., 1996,

"Gene repression by the ferric regulator in *Pseudomonas aeruginosa* : cycle selection of iron-regulated gene", Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, Vol 93, N°9, p 4409-4414.

ORNSTEIN L., 1964,

"Disc electrophoresis. I. Background and theory", Annual N.Y. Academic Science, Vol 121, p 321-349.

OSBORN M.J., GAUDER J.M., PARISI E. and CARSON J., 1972,

"Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*", Journal of Biological Chemistry, Vol 247, p 3962-3972.

PEITZSCH N., EBERZ G. and NIES D.H., 1998

"*Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor", Applied and Environmental Microbiology, Vol 64, p 453-458.

PELMONT J., 1993,

"Bactéries et environnement – Adaptations physiologiques", Presses Universitaires de Grenoble, Eds J. Bornarel, chapitres 1 et 29.

PEARSON R.G., 1963,

"Hard and soft acids and bases", Journal of American Society, Vol 85, p 3533-3539.

PETERS J.H. and VAN NOORDEN S., 1983

"Monoclonal antibodies", Eds Springer Verlag, New York.

POOLE K., NESHAT S., KREBES K. and HEINRICHS D.E., 1993,

"Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*", Journal of Bacteriology, Vol 175, N°15, p 4597-4604.

POPOT J.L., 1999,

"Méthodes innovantes pour l'étude structurale des protéines membranaires", Introduction de l'Atelier de Formation INSERM N°109, 28-30 Juin 1999, Le Vesinet.

- POSTLE K., 1990,**
"TonB and Gram-negative dilemma", Molecular Microbiology, Vol 4, p 2019-2025.
- POSTLE K., 1999,**
"Active transport by customized β -barrels", Nature Structure Biology, Vol 6, N°1, p 3-6.
- PRATT J.P., LAMY J.N. and QEILL J.D., 1969,**
"Coloration des lipoprotéines après électrophorèse en gel de polyacrylamide", Bulletin de la Société de Chimie et de Biologie, Vol 51, p 9.
- PRESCOTT, HARLEY and KLEIN, 1995,**
"Microbiologie", Bruxelles, de Boeck-Wesmael, 2°Eds, 1014 p.
- RAYMAN M.K. and MAC LEOD R.A., 1975,**
"Interaction of Mg^{2+} with peptidoglycane and its relation to the prevention of kysis of a marine *Pseudomonad*", Journal of Bacteriology, Vol 122, p 650-659.
- RAYMOND Y. and SUE M., 1993,**
"Lymph node primary immunization of mice for the production of polyclonal and monoclonal antibodies", Journal of Immunological Methods, Vol 93, p 103-106.
- RENSING C., PRIBYL T. and NIES D.H., 1997,**
"News functions for the three subunits of *czc* CBA", Journal of Bacteriology, Vol 179, N°22, p 6871-6879.
- ROHRBACH M.R., BRAUN V. and KOSTER W., 1995,**
"Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12 : altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of Fhu D with the integral membrane protein FhuB", Journal of Bacteriology, Vol 177, N°24, p 7186-7193.
- ROE S., 1990,**
"Separation based on structure" in "Protein Purification Methods – A practical approach", HARRIS E.L.V. and ANGAL S., Eds IRL PRESS, Oxford, 313 p.
- ROGERS H.J., PERKINS H.R. and LESTER J.N., 1980,**
"Microbial cell wall and membrane", Eds Chapmann et Hall , London, 564 p.

- ROSSOMANDO E.F., 1990,**
 "Ion-exchange Chromatography", Methods in Enzymology, Vol 182, p 309-316.
- ROSENBUSCH J.P., 1990,**
 "Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology, Vol 125, p 309-329.
- ROUX M., SARRET G., PIGNOT-PAINTRAND I., FONTECAVE M. and COVES J., 2001,**
 "Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34", Applied and Environmental Microbiology, Vol 67, N°2, p 769-773.
- SADOUK A. and MERGEAY M., 1993,**
 "Chromosome mapping in *Alcaligenes eutrophus* CH34 ", Molecular General Genetic, Vol 240, p 181-187.
- SALTON M.R.J. and HORNE R.W., 1951,**
 "Studies of bacteria cell wall, II. Method of preparation and some proprieties of cell wall", Biochemica and Biophysica Acta Vol 107, p 19-42 ; p 117-191.
- SAUVAGE C., 1995,**
 "Le fer chez *Erwinia chrysanthemi* 3937 : étude du gène fct codant le récepteur de la ferrichrysobactine et rôle du fer dans la régulation de l'expression des pectates lyases", Thèse de doctorat, Paris VI, p 12-50.
- SCATCHARD G., 1949,**
 "The attraction of proteins for small molecules and ions", Annual New York Academic Sciences, Vol 51, p 600-672.
- SCHÄGGER H., BRANDT U., GENCIC S. and VON JAGOW G., 1995,**
 "Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria", Methods in Enzymology, Vol 260, p 82-96.
- SCHALK I., KYSLIK P., PROME D, VAN DORSSELAER A., POOLE K., ABDALLAH M. and PATTUS F., 1999,**
 "Co-purification of the Fpv A pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand : implication for siderophore-mediated iron transport", Biochemistry, Vol 38, p 9357-9365.
- SCHNEIDER K. and SCHLEGEL H.G., 1976,**
 "Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16", Biochemica and Biophysica Acta, Vol 452, p 66-80.

- SCHINK B. and SCHLEGEL H.G., 1979,**
"The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* (I. Solubilization, purification and biochemical properties)", Biochemica and Biophysica Acta, Vol 567, p 315-324.
- SCOPES R.K., 1987,**
"Proteins Purification, Principles and Practice", 2° Eds Springer Verlag, New York, 358 p.
- SENDRA R.M., ESTEVE C. and ALCAIDE E., 1998,**
"Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Aeromonas hydrophila* serogroup O :19", FEMS Microbiology Letter, Vol 157, p 123-129.
- SENSFUSS C. and SCHLEGEL H.G., 1988,**
"Plasmid pMOL28-encoded resistance to nickel is due to specific efflux", FEMS Microbiology Letter, Vol 55, p 295-298.
- SIDDIQUI R. A. and SHLEGEL H. G., 1987,**
"Plasmid pMOL28-mediated Inducible nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* strain CH34", FEMS Microbiology, Vol 43, p 9-13.
- SIGEL S.P. and PAYNE S.M., 1982,**
"Effect of iron limitation on growth, siderophore production and expression of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*", Journal of Bacteriology, Vol 150, N°1, p 148-155.
- SILVER S. and PHUNG L.T., 1996,**
"Bacterial heavy metal resistance : new surprises", Annual Review of Microbiology, Vol 53, p 753-789.
- SIMONI R.D. and POSTMA P.W., 1975,**
"The energetics of bacterial active transport", Annual Review of Biochemistry, Vol 44, p523-554.
- SMITH P.K., KROHN R.I., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J. and KLENK D.C., 1985,**
"Measurement of proteins using bicinchoninic acid", Analytical Biochemistry, Vol 150, N°1, p 76-85.
- SPITZ M., 1986,**
""Single-shot" intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies", Methods in Enzymology, Vol 121, p 33-41.

- SPRINGAEL D., DIELS L., HOOYBERGHS L., KREPS S. and MERGEAY M., 1993,**
"Construction and characterization of heavy metal-resistant haloaromatic-degrading *Alcaligenes eutrophus* strains", Applied and Environmental Microbiology, Vol 59, N°1, p 334-339.
- STEVENS G., DOWNES S. and RALSTON A., 1998,**
"Thyroid dose in children undergoing prophylactic cranial irradiation", International Journal of Radiation Biology and Physic, Vol 42, N°1, p 385-390.
- STINTZI A., BARNES C., XU J. and RAYMOND K.N., 2000,**
"Microbial iron transport via a siderophore shuttle : a membrane ion transport paradigm", Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, Vol 97, N°60, p 10625-10630.
- STOJILJKOVIC I. and SRINIVASAN N., 1997,**
"*Neisseria meningitidis* TonB, ExbB and ExbD genes : Ton-dependent utilization of protein-bound iron in *Neisseria*", Journal of Bacteriology, Vol 179, N°3, p 805-812.
- STOEBNER J.A., BUTTERTON J.R., CALDERWOOD S.B. and PAYNE S.M., 1992,**
"Identification of the vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae*", Journal of Bacteriology, Vol 174, N°10, p 3270-3274.
- STOPPEL R.D. and SCHLEGEL H.G., 1995,**
"Nickel-resistance bacteria from Anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems", Environmental Microbiology, Vol 61, p 2276-2285.
- STRYER L., 1981,**
"Biochemistry - second Eds", Eds W.H. FREEMAN and co., New York, 949 p.
- TAGHAVI S., MERGEAY M. and VAN DER LELIE D., 1997,**
"Genetic and physical maps of *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature induced mutagenesis and mortality", Plasmid, Vol 37, p 22-34.
- THOMAS T.C. and MAC NAMEE M.G., 1990,**
"Methods in Enzymology - Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology, Vol 182, p 499-520.
- THOMPSON J., COSTERTON J.W. and MAC LEOD R.A., 1970,**
" K^+ - dependent deplasmolysis of a marine *Pseudomonad* plasmolyzed in a hypotonic solution", Journal of Bacteriology, Vol 102, p 843-854.

THORNE K.J.L., THORNLEY M.J. and GLAUERT A.M., 1973,

"Chemical analysis of the outer membrane and other layers of the cell envelope of *Acinetobacter* sp.", Journal of Bacteriology, Vol 116, p 410-417.

THULASIRAMAN P., NEWTON S.M., XU J., RAYMOND K.N., MAI C., HALL A., MONTAQUE M.A. and KLEBBA P.E., 1998,

"Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in GRAM negative bacteria", Journal of Bacteriology, Vol 180, N° 24, p 6689-6696.

TIBARZAWA C., WUERTZ S., MERGEAY M., WYNS L. and VAN DER LELIE D., 2000,

"Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34", Journal of Bacteriology, Vol 182, N° 5, p 1399-1409.

TIBARZAWA C., CORBISIER P., MENCH M., BOSSUS A., SOLDA P., MERGEAY M., WYNS L. and VAN DER LELIE D., 2001,

"A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants", Environmental Pollution, Vol 113, N°1, p 19-26.

TOBWIN J., STAEHELIN T. and GORDON J., 1979,

"Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications", Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, Vol 76, p 3350-4354.

TOSOHAAS, 1997,

"The Separations Catalogue", SHIELDS M.T., Montgomeryville, 260 p.

TRIESCHMANN M.D., PATTUS F. and TADIOS M.H., 1996,

"Molecular analysis of *Rhobacter capsulatus* B10 porin (por Ca) gene purification and biochemical characterization of the porin protein", Molecular General Genetic, Vol 253, N° 1-2, p 253-258.

TYLER C., VAN AERLE R., HUTCHINSON T.H. and MADDIX S., 1999,

"An in vivo testing system for endocrine disrupters in fish early life stages using induction of vitellogenin", Environmental Toxicology and Chemistry, Vol 18, N°2, p 337-347.

VAN DER LELIE D., SCHWUCHOW T., SCHWIDETZKY U., WUERTZ S., BAEYENS W., MERGEAY M. and NIES D.H., 1997,

"Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*", Molecular Microbiology, Vol 23, p 493-503.

VASIL M.L. and OCHSNER U.A., 1999,

"The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron : genetics, biochemistry and virulence", Molecular Microbiology, Vol 34, N° 3, p 399-413.

VIALA A., 1998,

"Eléments de Toxicologie", Eds Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 521 p.

VISCA P., COLOTTI G., SERINO L., VERZILI D., ORSI N. and CHIANCONE E., 1992

"Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes", Applied and Environmental Microbiology, Vol 58, N°9, p 2886-2893.

WALKER J.M., 1996

"The Protein Handbook", Eds Humana Press Inc., New Jersey, USA, 809 p.

WILLIAMS R.J.P., 1981,

"Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes", Phil. Trans. R. Soc. Lond., Vol 294, p 57-74.

YABUUCHI E., KOSADO Y., YANO I., HOTTA H. and NISHUICHI Y., 1995,

"Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. : proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov. *Ralstonia solanacearum* (Snith 1986) comb. nov. *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov.", Microbiology and Immunology, Col 39, p 897-904.

YAMATO I., ANRAKU Y. and HIROSAWA K., 1975,

"Cytoplasmic membrane vesicles of *Escherichia coli*", Journal of Biochemical, Vol 77, p 705-718.