

Thèse de Doctorat en Biochimie et Biologie moléculaire

UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (n°446)

Présentée et soutenue publiquement par

Laura LEPREVOST

Le 22 novembre 2024

Caractérisation d'une nouvelle famille de peptides bactériens synthétisés par voie ribosomale et modifiés post-traductionnellement impliqués dans l'homéostasie du cuivre

Composition du Jury :

Pr. Benoit FOLIGNE <i>Professeur de l'Université de Lille, Lille</i>	Président
Dr. Anne Soisig STEUNOU <i>Chargée de Recherche CNRS, Paris-Saclay</i>	Rapporteuse
Pr. Jean-Yves MATROULE <i>Associate professor à l'Université de Namur, Namur</i>	Rapporteur
Dr. Françoise JACOB-DUBUISSON <i>Directrice de Recherche CNRS, Lille</i>	Directrice de thèse
Dr. Rudy ANTOINE <i>Chargée de Recherche Inserm, Lille</i>	Co-encadrant de thèse
Dr Séverine ZIRAH <i>Professeure de l'Université de Paris, Paris</i>	Examinatrice
Dr Yanyan LI <i>Chargée de Recherche CNRS, Paris</i>	Invitée

Remerciements

Pour commencer, je voudrais remercier l'Université de Lille et l'Agence Nationale de la Recherche pour avoir financé cette thèse. Je remercie également les autres tutelles ayant participé à ces travaux, Inserm, CNRS et l'institut Pasteur de Lille.

Merci aux membres de mon jury de thèse : Benoit Foligné, Anne Soisig Steunou, Jean-Yves Matroule et Séverine Zirah d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail ainsi que d'assister à ma soutenance.

Merci également aux membres de mon Comité de Suivi Individuel : Soufian Ouchane et Yanyan Li d'avoir accepté de me suivre durant ces 4 années, merci pour vos conseils et vos idées.

Je remercie en particulier nos collaborateurs.rices et auteur.e.s Séverine Zirah, Céline Guillaume, Yanyan Li, Sophie Junger, Guy Lippens et Svetlana Dubiley pour leur forte implication dans ce projet. Leurs connaissances, leur savoir-faire et leurs remarques constructives ont permis d'aboutir à ce très beau travail d'équipe. Merci également à Giuseppe Sicoli, Gabriel Billon, Lydie Oliveira, Céline Henry, Enrico Falcone, Emiliano de Santis, Francesco Stellato, Alex Rivera-Millot pour avoir apporté leurs idées et leur savoir-faire à notre projet.

Je remercie Nathalie Mielcarek de m'avoir accueillie au sein de l'équipe RMB depuis janvier 2020, d'abord en tant que stagiaire de M2 puis en tant que doctorante.

Je souhaite ensuite exprimer toute ma gratitude à ma directrice de thèse, Françoise Jacob-Dubuisson. Françoise, au cours de ces dernières années, tu as été une encadrante enthousiaste et attentive. Tes qualités scientifiques et humaines font de toi une excellente directrice de thèse. Ces années passées à tes côtés ont renforcé mon esprit scientifique et m'ont aidée à avoir confiance en moi. Je souhaite te remercier sincèrement pour tes connaissances, ton soutien infaillible et la confiance que tu m'as accordée pour travailler sur ce projet. Un projet qui, d'ailleurs, ne se terminera pas avec cette thèse ! C'est un réel plaisir de pouvoir continuer de travailler avec toi sur ce projet.

Merci à mon co-encadrant Rudy Antoine pour ses analyses bio-informatiques et pour sa participation active à ce projet.

J'aimerais à présent remercier les membres (anciens et présents) de l'équipe RMB de m'avoir accueillie, aidée et soutenue toutes ces années.

Tout d'abord, les doctorant.e.s et ami.es, les Teamates : Oriane, Guillaume, Majda et Dacine. Je vous remercie sincèrement d'avoir partagé le chemin de la thèse avec moi. Oriane, le temps est passée si vite depuis nos premières sorties où on vadrouillait à la découverte de Lille. Je suis contente de t'avoir retrouvée sur Lille après nos stages respectifs à Rennes, et d'avoir pu développer cette si belle amitié. Je te remercie pour tous ces bons moments : les Mariodis, les après-midi jeux de sociétés, les karaokés, tous ces moments passés ensemble ! Je sais que la thèse n'a pas été facile pour toi mais accroche-toi, c'est bientôt fini ! Guillaume, sous ce costume trois pièces (oui, j'ai un mauvais à-priori sur les gens qui en portent), j'ai pu découvrir une personne drôle, à l'écoute, et qui n'est finalement pas si introvertie que ça. Je te remercie pour tous ces bons moments passés, merci d'avoir partagé ton goût pour les cocktails. Je te souhaite bon courage pour ta thèse, peut-être aura-t-on un record de temps de 2 ans avec toi ! Dacine, tu es vraiment une personne pétillante, toujours de bonne humeur et toujours présente pour aider les autres (quand tu ne les martyrises pas !). Je te remercie pour les soirées entre filles à parler de spiritualité, d'aspirations, et d'espérances, ces soirées à manger gras, très gras, trop gras, et à regarder des films très tard dans la nuit. Je te remercie pour tes conseils et tes idées au laboratoire et je te souhaite le meilleur pour ta thèse. Enfin, Majda, mon adelphé scientifique et marraine officielle de mes chats : tu es une personne adorable et je te remercie pour ton soutien au laboratoire comme en dehors, notamment aux séances de bike indoor. Merci pour ces soirées de partage culinaire, d'ateliers créatifs, de longues discussions. Je te remercie sincèrement d'avoir pris le temps et de t'être si bien occupée de mes deux chats pendant mes absences. Je te souhaite bon courage pour ta fin de thèse, je sais que tu es entre de bonnes mains. Bref, merci à tous.tes les quatre pour ces moments de joie et de peine, au laboratoire comme à l'extérieur. Tout simplement merci pour tout.

Les post-doc, ou... les ingénieurs de recherche ? Puisqu'apparemment plus personne n'est vraiment en post-doc dans ce bureau ! Merci à Zainab, ma voisine de paillasse, de m'avoir prêté ses portoirs, pour ta bonne humeur et ta bienveillance, les petites discussions, le camping en Belgique (sous la pluie). Merci à Line, pour ton dynamisme et ta créativité : tu as vraiment rajouté ta touche à ce laboratoire qui manquait un peu de couleurs après les années Covid. Merci à Camille, pour ta sympathie, pour ton humour (ou cynisme ?) et ta façon de penser qui m'inspire. Je vous remercie pour ces midis au soleil. Merci aussi à Elena, Kamila et Rim pour tous les bons moments partagés au laboratoire.

Je tiens à remercier Sophie, la lab manager sans laquelle la vie du laboratoire serait chaotique. Je suis impressionnée par ton self control et ta patience face à cette tâche ! Merci pour ton

aide et ta gentillesse. Je remercie aussi Loïc, Carine, Anne-So, Steph, Baptiste, Morgane et Marine pour les moments passés autour de la table à centrale aux pauses déjeuner, à débattre de tout et de rien, de science comme d'actualités. Merci pour ces discussions, parfois animées et parfois mélancoliques, qui ont permis de mieux vous connaître et m'intégrer facilement dans cette équipe. Je remercie aussi Manue, Domi, Violaine, des anciens membres du laboratoire, avec qui j'ai adoré discuter autour de la table centrale. Merci aux autres membres de l'équipe : Romain, Stéphane, Philippe, Alain, Eik, Cyril et Hala, avec qui j'ai eu surtout des interactions pendant les réunions de labo ou pendant les trappistes. Je vous remercie pour les remarques pertinentes, les conseils avisés et votre accessibilité. C'était un plaisir d'échanger avec vous durant ces dernières années.

Je souhaite remercier Fethi, un ancien membre de l'équipe, pour sa gentillesse et pour tous les bons moments qu'on a pu passer au labo comme en dehors. Fethi, je te remercie pour ta bienveillance, toutes les petites sorties, et je te souhaite bon courage pour ton post-doc à Toronto.

Un grand merci à mes prédécesseurs, Gauthier et Alex, qui m'ont transmis de nombreuses connaissances théoriques et techniques. Gauthier, merci pour les après-midi jeux de société et de m'avoir fait découvrir les bars à Lille.

Enfin, je ne peux pas parler de l'équipe RMB sans mentionner certains stagiaires. Merci à Lama, avec qui j'ai commencé l'aventure RMB pendant nos stages de M2 respectifs, mais qui n'est malheureusement pas restée. Mohammed et Arundhati, ce fut un plaisir de partager mon bureau avec eux pour quelques semaines. Finally, Ghida and Daniela, with whom I shared my office for 6 months, who gave me a lot and with whom I also had good times outside the lab. Thank you Ghida for helping me express myself better in English and thank you Daniela for giving me the fiber of crochet (no pun intended).

Bref, un grand merci à tous de m'avoir accepté au sein de la grande famille RMB. Je m'estime heureuse d'avoir pu faire ma thèse dans une équipe bienveillante, diverse et soudée, un environnement qui m'a permis de m'épanouir durant ces quelques années si importantes de ma vie.

En dehors de mon équipe, j'aimerais remercier mes amis, qui ont été d'un grand soutien durant ces quatre ans de thèse, mais aussi les amis qui me soutiennent depuis bien plus longtemps.

Merci à Esther et Aless que je connais presque depuis le début de ma vie à Lille, et Kamel un ancien membre de l'équipe RMB, pour les après-midi « Horreur à Arkham », les soirées « Drag Race », « Pâques à Prague », Penestin et pour tout le reste. Esther et Aless, vous êtes des

amis formidables : Esther, je te remercie pour ton soutien indéfectible, ton entrain pour les sorties, et surtout pour cette manie à lancer un sujet de discussion au moment où on doit se quitter. J'espère que t'épanouiras dans ta formation, dans ton alternance et qu'à la clé, tu trouveras un job qui te plaise. Aless, sous cette allure de mec dur, j'ai découvert une personne au grand cœur et bienveillante. Je te remercie pour tous ces moments passés ensemble, les soirées RP et les tartes au maroilles. Je te souhaite tout le meilleur et surtout un bon courage pour supporter la chaleur de Lyon. Kamel, bien qu'il est difficile aujourd'hui de se voir en dehors, je suis contente de te voir continuer à hanter le laboratoire RMB et d'avoir encore ces discussions que j'apprécie tant avec toi. Merci pour ta bienveillance, ta gentillesse et pour tous les bons souvenirs.

Les Costa, Bérénice, Maxime et Charlotte, avec qui je me suis rapprochée cette dernière année. Je vous remercie pour votre convivialité, ces après-midi jeux de sociétés, d'avoir été des acolytes de D&D, les voyages, et aujourd'hui pour les séances de badminton. Bérénice, bien plus qu'une collègue, j'ai découvert une personne qui prend soin de ses amis, très engagée dans ses amitiés, une très bonne professeure de kayak et de badminton, toujours bienveillante et je te remercie pour ça. Maxime, merci pour ta bonne humeur, pour ton côté chaleureux et ton humour absurde qui met tout de suite à l'aise. Charlotte, je te remercie de ta gentillesse, de ta sensibilité et de ton humour bien à toi qu'on ne peut qu'apprécier. Tout simplement, merci pour votre amitié à tous.tes les trois.

Je remercie, les M&Ms, Mattéo et Mathilde pour toutes les bons moments passés ensemble, le camping autour des châteaux de la Loire (le camping Loire et Château remember), le Motocultor, et même dernièrement votre déménagement. Même si on ne se voit pas souvent, c'est toujours un plaisir de se retrouver.

Et enfin, à ma famille de cœur, mes amis Havrais que je connais depuis trop longtemps : Alicia, Anaïs, Antoine, Célestin, Dann, Félix, Koris, Laetitia, Martin, Maximilien, Reynald, Sarah, Tiffany. Il est difficile pour moi d'exprimer toute l'affection que je vous porte et ces remerciements seraient trop long si je devais développer. Je vous remercie juste d'avoir toujours été là durant toutes ces années, bien avant la thèse, et ce malgré la distance, et de m'accueillir au Havre comme si je n'étais jamais partie. Je tiens à remercier particulièrement Félix d'avoir pris le temps de m'expliquer certaines notions de chimie : sans toi, le paragraphe sur les atropitides n'aurait pas vu le jour.

Il est évident que je remercie sincèrement toute ma famille et les amis de la famille. A ceux qui ont été présents, m'ont vu grandir et me lancer dans des études longues et loin du Havre. A ceux qui m'ont soutenue, que ce soit par des encouragements, ou en m'aidant à déménager,

et qui m'ont encouragée à aller jusqu'au bout. Je souhaite remercier René, Chris, Sésé, mon oncle Totof, ma tante Valou, ainsi que mes parents Christophe et Annie, et mon frère Jimmy.

Pour finir j'aimerais remercier mon compagnon de tous les jours, Quentin. Merci pour ton soutien quotidien, que ce soit dans les moments calmes comme dans les moments de stress. Merci d'avoir subi les discussions de biologistes avec mes collègues, mes explications interminables sur les RiPPs et le cuivre : merci de ta patience. Merci tout simplement d'être à mes côtés depuis si longtemps. Je t'aime.

Table des matières

Introduction	1
I. RiPPs (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides).....	1
1. Classification des RiPPs.....	1
2. Biosynthèse des RiPPs	19
3. Fonctions des RiPPs.....	36
4. Découverte d'une nouvelle famille de RiPP en lien avec les métaux.....	49
II. <i>Caulobacter vibrioides</i> , une bactérie environnementale.....	56
1. Une bactérie modèle	56
2. Un cycle de division atypique.....	58
3. Vers des applications fondamentales et technologiques	62
III. Le cuivre.....	63
1. Toxicité du cuivre.....	63
2. Protection contre le cuivre	67
3. Lien entre le cuivre, le stress oxydant et cette nouvelle famille de RiPP.....	76
Objectifs de la thèse.....	79
Résultats	80
I. Caractérisation de la fonction et des modifications des bufferines chez <i>C. vibrioides</i>	80
1. Recherche des conditions d'expression des opérons <i>buf1</i> et <i>buf2</i>	80
2. Recherche de la fonction de Buf1 et Buf2	85
3. Recherche des modifications de Buf1	98
4. Mécanisme d'action de Buf1	112
II. Etude de la biogénèse des bufferines chez <i>C. vibrioides</i>	120
1. Spécificité des enzymes de modification	120
2. Caractérisation des déterminants d'interaction.....	122
3. Caractérisation de la fonction de la protéine DoxX	133
III. Caractérisation de la fonction de la bufferine chez <i>B. pertussis</i>	134
1. Premiers tests phénotypiques	135

2. Fonction de la bufferine dans la protection contre le stress cuivrique ?	139
Discussion et perspectives.....	142
Matériels et Méthodes.....	151
Test de détection des chalcophores.....	161
Références	166
Annexes	177
Matériels et Méthodes supplémentaires	177
Article : A widespread family of ribosomal peptide metallophores involved in bacterial adaptation to metal stress	183

Abréviations

[4Fe-4S]	Cluster fer-soufre
σ/anti-σ	Sigma/anti-sigma
aaRS	Aminoacyl-ARNt Synthétase
Agr	Accessory gene regulator
AIP	Auto-Inducing Peptides - peptides auto-inducteurs
AspRS	Aspartyl tRNA Synthétase
BCA	2,2-BicinChoninic Acid
BG	Milieu de culture Bordet-Gengou
BGC	Biosynthesis Gene Cluster
c-di-GMP	Di-Guanosine MonoPhosphate cyclique
CAS	ChromAzurool S
DCFH-DA	2-7-DiChloroFluorescine DiAcétate
Dha / Dhb	Dehydroalanine / Dehydrobutyrine
DL₅₀	Dose Létale pour 50% des effectifs
DUF	Domain of Unknown Function
ECF	ExtraCytoplasmic Function sigma - sigma de fonction extracytoplasmique
EPR	Electron Paramagnetic Resonance - résonance paramagnétique électronique
GBAP	Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone
GIG	Gold Induced Genes
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Dimère de glutathion oxydé
Hbt	Histidinobutyryne
IPTG	IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside

QS	Quorum Sensing
Lab / Lan / 2MetLan	Labionine / Lanthionine / diméthyllanthionine
LAP	Linear Azol(in)e-containing Peptides - peptides linéaires contenant de l'azol(in)e
LP	Leader Peptide
M2G	Milieu de culture Minimum Medium with Glucose
MBD	Metal-Binding Domains - site de liaison aux métaux
Mbn	Méthanobactines
MBP	Maltose Binding Protein
MCO	MultiCopper Oxydase
MMO / pMMO / sMMO	Méthane MonoOxygénase / MMO particulaire / MMO soluble
MNIO	Multinuclear Non-heme Iron-dependent Oxidase
MOI	Multiplicity Of Infection - multiplicité d'infection
(LC-)MS	(Liquid Chromatography coupled to tandem) Mass Spectrometry – (chromatographie liquide couplé à la) spectrométrie de masse
NrsF	Negative regulator of sigma F
Opp	Oligopeptidique permease - perméase oligopeptidique
PAR	4-(2-PyridylAzo)Resorcinol
PBP	Periplasm Binding Protein - protéine de liaison périplasmique
PE	PhosphatidylEthanolamine
PEARL	PEptide Aminoacyl-tRNA Ligase
POP	Prolyl OligoPeptidase
PYE	Milieu de culture Peptone-Yeast Extract
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RCS	Reactive Chlorine Species - espèce réactive du Cl
ROS	Reactive Oxygen Species - espèces réactives de l'oxygène

RRE	RiPP precursor peptide Recognition Element - élément de reconnaissance des peptides précurseurs de RiPP
RiPP	Ribosomally synthesized et Post-translationally modified Peptides - peptide synthétisé par la voie ribosomique et modifiés post-traductionnellement
RND	Resistance–Nodulation–cell Division - résistance-nodulation-division cellulaire
(r)SAM	(radicale) S-Adénosyl-Méthionine
SKF	Sporulation Killing Factor - facteur de destruction de la sporulation
SOD	SuperOxyde Dismutase
SS	Milieu de culture Stainer-Scholte
SSN	Sequences Similarity Network - réseau de similarité de séquence
TBDT	TonB-Dependant Transportor - transporteur TonB-dépendant
TCEP	Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine
TCS	Two-Composant System - systèmes à deux composants
THIJS	Milieu de culture Thalen-IJSsel
TQO	Thiosulfate Quinone Oxydoréductase membranaire
TOMM	Thiazole/Oxazole-Modified Microcins - microcines modifiées par des thiazoles/oxazoles
XO	Xanthine oxydase
wHTH	winged helix-turn-helix – motif hélice-coude-hélice ailé

Liste des figures et des tableaux

Figure 1. Voie de biosynthèse générale des RiPPs (2).....	1
Tableau 1. Liste non exhaustive des différentes classes de RiPPs actuellement connues et exemples représentatifs (6)	2
Figure 2. Structure de la kalata B1 (kB1), exemple de cyclotide (17).....	5
Figure 3. Structure de la lyciumine A (20).....	5
Figure 4. Structure de l'AIP-1 (4)	7
Figure 5. Lanthipeptides : exemples et biosynthèse (26,28)	10
Figure 6. Structure schématique et séquences de peptides lasso des trois classes (16,28) .	12
Figure 7. Mécanismes d'acquisition hypothétiques de la Mbn et du Cu (33).....	15
Figure 8. Voie de biosynthèse générale des RiPPs (6).....	20
Figure 9. Diverses modifications post-traductionnelles réalisées par les membres de la famille YcaO (6,48).....	24
Figure 10. Diverses modifications post-traductionnelles réalisées par les membres de la famille rSAM (6).....	25
Figure 11. Diverses modifications post-traductionnelles réalisées par les membres de la famille MNIO (DUF692) (52)	26
Figure 12. Biosynthèse, régulation et immunité de la nisine chez <i>L. lactis</i> (54).....	29
Figure 13. Opérons méthanobactines (Mbn) (35,53)	31
Figure 14. Comparaison structurelle de quatre enzymes modifiant les RiPPs (2)	34
Figure 15. Structure cocrystalline des interactions qui médient la liaison entre SuiA et SuiB (6)	35
Figure 16. Les différentes cibles des RiPPs impliqués dans la compétition (10).....	37
Figure 17. Structure en spirale β du polythéonamide B (présent dans un solvant organique pour imiter l'environnement membranaire) (10)	39
Figure 18. Représentation schématique des voies de signalisation de (A) FsrA et de (B) ComX (28).....	43
Figure 19. Cycle de vie des streptomycètes cultivés sur milieu solide (76)	45
Figure 20. Schéma du concept du cannibalisme chez <i>B. subtilis</i> (77).....	47
Figure 21. Structures de méthanobactines (Mbns) chélatées au cuivre (CuMbn) (52).....	48
Figure 22. Représentation schématique de l'opéron, modèles structuraux et localisation des quatre produits de gènes de cette nouvelle famille d'opérons chez <i>C. vibrioides</i>	50
Figure 23. Weblogos des séquences des différents peptides précurseurs montrant les motifs conservés (Rudy Antoine)	51

Figure 24. Organisation génétique des opérons de type GIG trouvés dans les génomes de <i>C. crescentus</i> (NC_011916.1), <i>B. pertussis</i> (NC_002929.2), <i>C. metallidurans</i> (NC_007974.2) et <i>L. pneumophila</i> (NC_002942.5).....	52
Figure 25. Organisation intracellulaire du cycle cellulaire chez <i>C. vibrioides</i> (91)	60
Figure 26. Organisation intracellulaire du cycle cellulaire chez <i>C. vibrioides</i> (91)	61
Tableau 2. Représentation des différentes géométries impliquées dans la liaison du Cu^{2+} et du Cu^+	64
Figure 27. Mécanismes de toxicité du cuivre (37).....	65
Figure 28. Systèmes de protection contre le cuivre chez les bactéries Gram négatives (37).....	68
Figure 29. Modèle de la réponse bimodale de <i>C. vibrioides</i> (98)	74
Figure 30. Schéma de la réaction enzymatique catalysée par la Xanthine oxydase (102).	80
Figure 31. Activités β -galactosidase en présence de différents métaux, reflétant l'induction de l'expression de <i>buf1</i> et <i>buf2</i>	81
Figure 32. Activités β -galactosidase en présence de différents stress oxydants, reflétant l'induction de l'expression de <i>buf1</i> et <i>buf2</i>	81
Figure 33. Activités β -galactosidase en présence de différentes concentrations de CuSO_4 , reflétant l'induction de l'expression de <i>buf1</i> et <i>buf2</i>	82
Figure 34. Etude de la stabilité du cuivre Cu^+ dans le milieu PYE et résultats des activités β -galactosidase induites	83
Figure 35. Activités β -galactosidase en présence de cuivre ou d'IPTG pendant 6 h ou une nuit, reflétant l'induction de l'expression de <i>buf2</i>	84
Figure 36. Activités β -galactosidase en présence de CuSO_4 ou d'IPTG pendant une nuit en milieu pauvre M2G ou en milieu riche PYE, reflétant l'induction de l'expression de <i>buf1</i>	85
Figure 37. Représentation schématique des opérons de bufferine	86
Figure 38. Suivi de croissance en présence ou en absence de CuSO_4 à 225 μM en milieu de culture PYE	87
Figure 39. Suivi de croissance en présence ou en absence de différentes concentrations de CuSO_4 en présence de 200 μM d'ascorbate en milieu de culture PYE	88
Figure 40. Etudes des mutants de complémentation	90
Figure 41. Résultats de survie des souches WT et DKO après un choc cuivrique à 1 mM en milieu de culture PYE	91
Tableau 3. Conditions de tests phénotypiques utilisées.....	92
Figure 42. Résultats de survie des souches WT et DKO après un choc H_2O_2 à 50 mM en milieu de culture PYE	93
Tableau 4. Résultats des diamètres des halos d'inhibition produit par l' HOCl à différentes concentrations sur les souches WT et DKO	93

Figure 43. Représentation schématique de la méthode de quantification des ROS par la 2-7-dichlorofluoresceine diacétate dans une bactérie (102)	94
Figure 44. Intensité relative de fluorescence, reflétant la quantité de ROS chez les bactéries WT et DKO.....	95
Figure 45. Images de microscopie optique des amibes <i>A. castellanii</i> et <i>D. discoideum</i> , grossissement X40.....	96
Figure 46. Résultats de mise en contact des bactéries WT avec <i>D. discoideum</i> , reflétant le taux d'internalisation	96
Figure 47. Résultats des lyses bactériennes des souches WT et DKO par les amibes, obtenus après 3 jours d'incubation à 25°C.....	97
Figure 48. Western Blot obtenus pour les différents compartiments de la souche WT après une induction de 6h ou d'une nuit au cuivre (100 µM) en milieu de culture PYE	99
Figure 49. Western Blot obtenus pour les différents compartiments des souches de fusions après une induction d'une nuit au CuSO ₄ (100 µM) en milieu de culture PYE	100
Figure 50. Résultats de Western Blot obtenus pour les différentes constructions après une induction d'une nuit au CuSO ₄ (100 µM) en milieu de culture PYE	100
Figure 51. Western Blots obtenus pour les deux purifications de Buf1 His-taggé, après une induction d'une nuit au CuSO ₄ (100 µM) ou à l'HOCl (300 µM)	101
Figure 52. Prédiction de modèle 3D de Buf1 (A) et de Buf2(B) obtenu avec Alphafold2	102
Figure 53. Résultats de la coloration au bleu de Coomassie Colloïdal et des analyses en Mass Finger Printing.....	103
Figure 54. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 µM.....	104
Figure 55. Analyses LC-MS des extraits cellulaires des souches buf1, buf2 et DKO après une induction à l'IPTG (100 µM) pendant une nuit en milieu de culture PYE.....	105
Figure 56. Gel de coomassie et analyses LC-MS des différentes fractions de Buf1 ^{6His} purifiée sur colonne Ni ²⁺	106
Figure 57. Analyse des peptides générés par clivage à la trypsine des extraits cellulaires de buf1 ou des fractions de Buf1 ^{6His} avec le logiciel PEAKS.....	107
Figure 58. Comparaison des spectres optiques UV-visible de Buf1 ^{6His} et Buf2 ^{6His}	109
Figure 59. Comparaison du spectre optique UV-visible de Buf1 ^{Twnstr} et du spectre de Buf1 ^{Twnstr(CIIS+CIIS)}	109
Figure 60. Spectres RMN 1D (A) et 2D (B) obtenus pour Buf1 ^{6His} (Guy Lippens et Svetlana Dubiley).....	110
Figure 61. Structures chimiques d'une cystéine (rouge) native ou modifiée selon trois modifications possibles (Guy Lippens et Svetlana Dubiley)	112
Figure 62. Résultats du tests CAS sur cellules entières après induction ou non des souches WT et DKO au CuSO ₄ (100 µM) ou à l'HOCl (300 µM).....	114

Figure 63. Résultats des tests CAS sur surnageants après induction ou non des souches WT et DKO au CuSO ₄ (100 µM) ou à l'HOCl (300 µM)	115
Figure 64. Résultats des tests CAS sur extraits cellulaires solubles après induction à l'IPTG (100 µM) des souches WT, DKO, buf1 et buf2	116
Figure 65. Suivi de croissance en présence ou en absence de CuSO ₄ 225 µM.....	117
Figure 66. Etude de l'interaction de Buf1Twstr avec le Cu ²⁺ par spectrophotométrie : l'absorbance maximale du complexe Cu ²⁺ -PAR est de 505 nm	119
Figure 67. Etude de l'interaction de Buf1 ^{Twstr} avec le Cu ⁺ par spectrophotométrie : l'absorbance maximale du complexe Cu ⁺ -BCA est de 562 nm	119
Figure 68. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 µM	120
Figure 69. Activités β-galactosidase selon la position du rapporteur dans les opérons.....	121
Figure 70. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 µM	122
Figure 71. Prédiction de modèle 3D de l'interaction de BufA avec la protéine de fusion BufBC chez <i>R. gelatinosus</i> obtenue avec Alphafold2	123
Figure 72. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 µM	124
Figure 73. Western Blot pour détecter C1 dans les différentes souches, après une induction d'une nuit au CuSO ₄ (100 µM).....	125
Tableau 5. Constructions et conditions de co-précipitation utilisées	126
Figure 74. Western Blot montrant une interaction spécifique entre BufB1C1 S-tag et différents variants de la fusion MBP-BufA1	128
Tableau 6. Séquences protéiques des précurseurs des mutants de BufA1	129
Figure 75. Suivi de croissance en présence ou en absence de CuSO ₄ à 225 µM.....	130
Figure 76. Alignement des peptides signaux de BufA1 avec celui de BufA2 (Rudy Antoine)	130
Figure 77. Alignement des peptides signaux de BufA1 avec celui de CCNA_01592 (Rudy Antoine).....	131
Figure 78. Résultats de polarisation de fluorescence obtenus pour les tests d'interaction entre le peptide 2 et B1C1 ou C1	133
Figure 79. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 µM	134
Figure 80. Représentation schématique de l'opéron bufferine de <i>B. pertussis</i>	135
Figure 81. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 1 mM	136
Figure 82. Résultats de survie des souches BPSM, BPEL, BPΔ26 et BPOP après 2h d'exposition à 3 mM de CuSO ₄ (+ 4 mM d'acide ascorbique)	137
Tableau 7. Conditions de tests phénotypiques utilisées et résultats	137
Figure 83. Survie des souches BPSM, BPEL, BPΔ26 et BPOP après 1h, 4h ou 24h d'exposition aux THP1.....	138

Figure 84. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre Cu ²⁺ ou Cu ⁺ à différentes concentrations.....	140
Figure 85. Suivi de croissance en milieu THIJS et milieu Milnez	141
Figure 86. Modèle actuel de l'état des lieux de nos connaissances et de nos hypothèses sur les bufferines chez <i>C. vibrioides</i> et <i>B. pertussis</i>	150
Tableau 8. Liste des protéines recombinantes utilisées.....	163
Tableau 9. Liste des souches de <i>C. vibrioides</i> construites et utilisées dans ce travail	177
Tableau 10. Liste des souches de <i>B. pertussis</i> utilisées dans ce travail	179
Tableau 11. Liste des plasmides utilisés dans ce travail.....	180

Introduction

I. RiPPs (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides)

Les RiPPs sont des produits naturels peptidiques (moins de 10 kDa) synthétisés par voie ribosomale et modifiés post-traductionnellement (1). Dans la plupart des familles de RiPPs, le peptide précurseur est constitué d'une région N-terminale assez conservée appelée « peptide leader » et d'une région variable centrale C-terminale appelée « peptide core ». Une protéine appelée RRE (RiPP precursor peptide recognition element) associée aux enzymes de biosynthèse des RiPPs reconnaît la séquence du peptide leader, permettant aux enzymes de modifier spécifiquement le peptide core. Certaines modifications post-traductionnelles peuvent se former en l'absence de cette séquence leader (1,2). Le RiPP résulte ensuite de maturation(s) protéolytique(s) qui clive(nt) généralement au moins le peptide leader. Les RiPPs sont produits par une variété d'organismes, y compris certains eucaryotes, mais surtout par les bactéries et les archées, et ils possèdent une variété de fonctions biologiques (1) (Fig. 1).

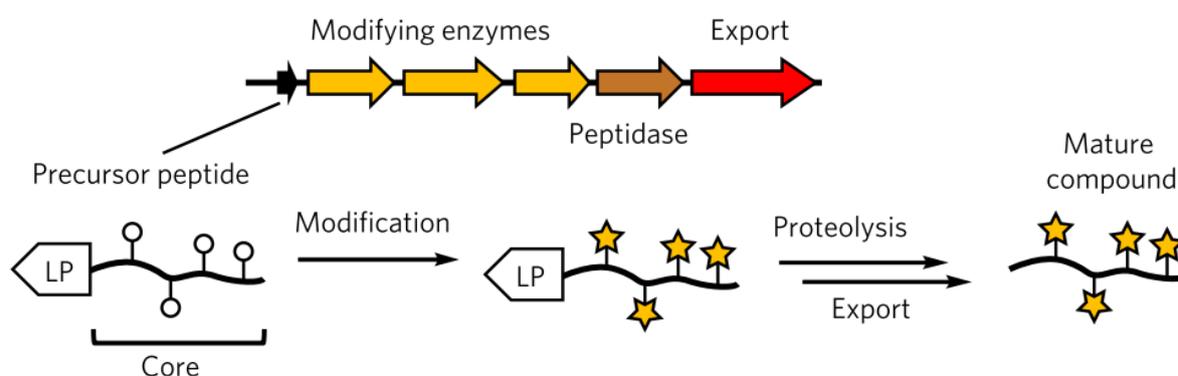


Figure 1. Voie de biosynthèse générale des RiPPs (2). Le précurseur synthétisé par les ribosomes présente un peptide core fusionné à un peptide leader. Le peptide leader permet le recrutement des enzymes de modifications post-traductionnelles (jaune) au précurseur puis est clivé par une protéase (marron). Le peptide mature est exporté par une protéine d'export. Schéma adapté de Burkhart et al. (2015).

1. Classification des RiPPs

Le plus ancien RiPP connu mais aussi le plus étudié est la nisine produite par *Lactococcus lactis* (1,3). Découverte pour la première fois dans les années 1920 et utilisée comme conservateur alimentaire depuis les années 1960, la nisine fait partie de la famille des lanthipeptides (1,4,5) (section Introduction. I. 1. d. lanthipeptides).

Initialement, les RiPPs étaient classés soit en fonction de leurs organismes producteurs soit en fonction de leur rôle. Depuis 2013, les familles de RiPPs sont définies sur la base de leur structure et de leur biosynthèse. Aujourd'hui, plusieurs dizaines de familles sont caractérisées, dont la plupart ont été découvertes chez des bactéries (1,4,6) (Tab. 1).

Tableau 1. Liste non exhaustive des différentes classes de RiPPs actuellement connues et exemples représentatifs (6). Certaines de ces classes sont présentées dans l'introduction. Lorsqu'une modification implique une famille d'enzymes, celle-ci est notée entre parenthèses. Abréviations: AEP, asparaginyl endoprotease; Dha/Dhb, dehydroalanine/dehydrobutyrine; DUF, domain of unknown function; LP, leader peptide; MT, methyltransferase; PEARL, peptide aminoacyl-tRNA ligase; POP, prolyl oligopeptidase; rSAM, radical SAM. Tableau adapté de Montalbán-López et al. (2021).

Class	Example	Class-defining PTM(s) or feature (enzyme responsible)
Fungus		
Amatoxins/Phallotoxins	α -amanitin	N-to-C cyclization, Cys–Trp crosslink
Borosins	Omphalotin	Amide backbone N-methylation (N-MT), N-to-C cyclization (POP)
Dikaritins	Ustiloxin	Tyr-Xxx ether crosslink (UstY)
Animals		
Conopeptides	Conantokin G	Peptides produced by cone snails
Bacteria		
Atropitides	Tryptorubin A	Aromatic amino acids crosslinked to give a non-canonical atropisomer
Autoinducing peptides	AIP-I	Cyclic ester or thioester
Bacterial head-to-tail cyclized peptides	Enterocin AS-48	N-to-C cyclization (DUF95 & ATP-grasp)
Bottromycins	Bottromycin A1	Macrolactamidine (YcaO)
ComX	ComX168	Indole cyclization and prenylation
Conopeptides	Conantokin G	Peptides produced by cone snails
Cyanobactins	Patellamides	N-terminal proteolysis (PatA protease)
Cyclotides	Kalata B1	N-to-C cyclization, disulfide(s) (AEP)
Epeptides	YydF	D-Amino acids (rSAM)
Glycocins	Sublancin 168	S, O-glycosylation of Ser/Cys
Lanthipeptides	Nisin	(Methyl)lanthionine, labionin
Lasso peptides	Microcin J25	Macrolactam with threaded C-terminal tail (Asn synthetase homolog)
Linear azol(in)e-containing peptides (LAPs)	Microcin B17	Cys, Ser, or Thr derived azol(in)es (YcaO)
Lyciumins	Lyciumin A	Pyroglutamate, Trp–Gly crosslink

Streptide	Streptide	Trp–Lys crosslink (rSAM)
Methanobactins	Methanobactin	Oxazolones (DUF692)
Microcin C	Microcin C	Aminoacyl adenylate or cytidylate with a phosphoramidate linkage (ubiquitin E1 homolog)
Orbitides	Cyclolinopeptide A	N-to-C cyclization; no disulfides
Pearlins	Thiaglutamate	aa-tRNA derived (PEARL)
Proteusins	Polytheonamide	Nitrile hydratase LP
Sactipeptides	Subtilosin	Sactionine crosslink (rSAM)
Thiopeptides	Thiostrepton	[4 + 2] cycloaddition of two Dha

a. RiPPs chez les champignons

Amatoxines et phallotoxines

Le genre *Amanita*, du phylum des Basidiomycètes est à l'origine de 90 % des intoxications mortelles causées par des champignons (7). Cette toxicité est due à la production de petits peptides appelés amatoxines et phallotoxines, deux RiPPs structurellement proches mais ayant des modes d'action différents.

Les amatoxines (par exemple l' α -amanitine) provoquent une insuffisance hépatique en inhibant l'ARN polymérase II, sont létales en 2-8 jours et sont hautement toxiques avec une dose létale pour 50% des effectifs (DL₅₀) de 0.4-0.8 mg/kg. Les phallotoxines (par exemple la phalloïdine) sont inactives par voie orale mais létales en 2-5 heures par injection, avec une DL₅₀ de 2-3 mg/kg (7–9). Elles sont moins toxiques que les amatoxines, (7–9) et causent des dommages aux cellules hépatiques en stabilisant la F-actine. Ces RiPPs sont caractérisés par une cyclisation entre les résidus N- et C-terminaux (head-to-tail) et un lien covalent entre une cystéine (Cys) et un tryptophane (Trp) (6,7,10).

Borosines

Les membres fondateurs des borosines sont les omphalotines (omphalotine A, le composé principal, et ses dérivés omphalotines B à I), produites par le Basidiomycète *Omphalotus olearius* (1). L'omphalotine A est utilisée en agriculture car elle présente une forte activité contre les nématodes (vers), notamment contre le phytopathogène *Meloidogyne incognita* et ne présente aucune activité phytotoxique, antibactérienne ou antifongique (1,11).

La structure de l'omphalotine A est caractérisée par une cyclisation head-to-tail avec neuf N-méthylations sur le squelette amide. C'est en raison de sa ressemblance avec le symbole mythologique Ouroboros que le nom « borosine » a été proposé par Van der Velden *et al.* (2017), pour cette nouvelle famille de RiPP (1).

Dikaritines

En 2014, une première caractérisation de RiPPs chez les Ascomycètes a été faite et plusieurs groupes de composés ont été découverts dans cette famille : les dikaritines (1,6,12). Les premiers exemples sont les ustiloxines A et B. Produite par *Ustilagoidea virens* (6,12,13), un champignon pathogène du riz, l'ustiloxine B présente une activité phytotoxique en inhibant l'assemblage des microtubules (1). Elle est aussi produite par *Aspergillus flavus* (1,12,13), champignon connu pour produire d'autres mycotoxines (13).

D'autres composés structurellement apparentés aux dikaritines sont les phomopsines, produit par le phytopathogène *Phomopsis leptostromiformis* (1,6,12,14) *P. leptostromiformis* infecte les tiges et les gousses des lupins (*Lupinus*), et les phomopsines présentes dans ces plantes infectées provoquent la lupinose chez les ovins et les bovins, une maladie du foie (1,12). Cette toxine agit sur la mitose des cellules hépatiques en ciblant la tubuline (1,12).

Les épichloëcyclines sont le premier exemple de RiPPs trouvés chez un champignon symbiotique mutualiste (1,15). En effet, les champignons endophytes appartenant au genre *Epichloë* forment des associations avec des graminées de la sous-famille des *Poöideae*, et les épichloëcyclines joueraient un rôle important dans la symbiose. Cependant, leur bio-activité n'a pas encore été découverte (15).

Le terme dikaritines décrit tous ces composés dont les caractéristiques structurelles principales sont des liaisons entre un groupe phénolique dérivé de la tyrosine (Tyr) et les chaînes latérales d'autres acides aminés (1,6).

b. RiPPs chez les plantes

Cyclotides

Ces RiPPs d'origine végétale ont été découverts dans les familles *Rubiaceae* (ex. café), *Violaceae*, *Cucurbitaceae* et *Fabaceae* (1,6,17). Un même individu peut exprimer des dizaines voire des centaines de cyclotides différents, impliqués dans sa défense (16). Ces RiPPs possèdent une large gamme d'activités : insecticides, antivirales, antimicrobiennes et cytotoxiques, et ils ont un intérêt pharmaceutique en raison de leur forte stabilité (1,16). Malgré la variété de composés et d'activités, le mécanisme d'action commun à toutes les cyclotides implique la formation de pores dans des membranes biologiques (16).

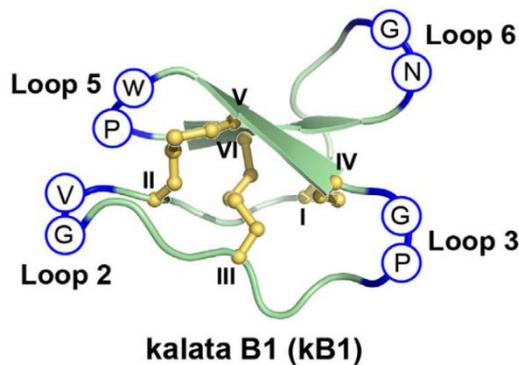
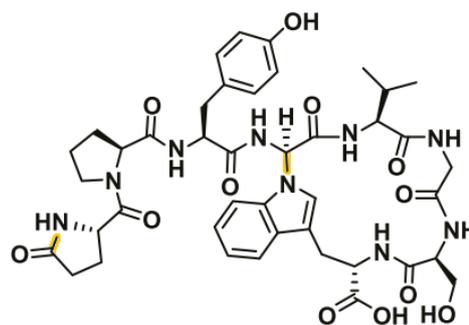


Figure 2. Structure de la kalata B1 (kB1), exemple de cyclotide (17). La cyclisation head-to-tail est faite entre la glycine (Gly) N-terminale et l'Asparagine (Asn) C-terminale (Loop 6). Les cystéines formant les ponts disulfure (I-IV, II-V et III-VI) sont représentées en jaune.

La famille des cyclotides est définie par une cyclisation head-to-tail et par un motif de nœud Cys, correspondant à trois liaisons disulfure conservées (Fig. 2) (1,16,17).

Lyciumines

Les lyciumines ont initialement été découvertes chez les plantes médicinales chinoises du genre *Lycium* (6,18). Ces arbustes connus pour leurs baies, comme les baies de gogi (18,19), produisent notamment 4 types de lyciumines (20). Les écorces de la racine du lyciet de Chine, sont utilisées comme antipyrétique, tonique et hypotenseur de par leur activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et de la rénine (18). Des lyciumines ont aussi été découvertes chez 7 autres espèces de plantes cultivées, dont certaines ont une importance économique comme les amarantes, le quinoa ou le soja (20).



Lyciumin A

Figure 3. Structure de la lyciumine A (20). Les modifications définissant la classe sont en jaune. De gauche à droite : un résidu pyroglutamate et une cyclisation entre Trp et Gly. Schéma adapté de Kersten et al. (2018).

Les lyciumines sont caractérisées par une cyclisation entre l'azote d'un Trp et le carbone d'une Gly et par la présence d'un résidu pyroglutamate à l'extrémité N-terminale (Fig. 3).

c. RiPPs chez les animaux

Conopeptides

L'étude de la biosynthèse des RiPPs animaux est très difficile car les gènes ne sont pas organisés en clusters, laissant les mécanismes et les bases moléculaires des modifications post-traductionnelles largement inexplorés (1). Les escargots marins produisent une variété de venins qui sont un mélange complexe de protéines dont des RiPPs (1,16). Ces escargots

venimeux représentent la lignée de mollusques la plus riche avec 10 000 espèces différentes, classés dans la superfamille des *Conoidea* (16).

Les RiPPs des escargots marins ayant fait l'objet d'études approfondies sont les conopeptides ou conotoxines, produits par des escargots coniques (16). On a identifié jusqu'à 70 000 conopeptides différents, dont 50 à 200 peuvent être trouvés dans le venin d'une espèce donnée (1,16). De nombreuses modifications post-traductionnelles ont été rapportées à ce jour (1,16). Certaines sont largement répandues comme la γ -carboxylation du glutamate (Glu) (16). Il existe une base de donnée, ConoServer (conoserver.org) qui répertorie les structures connues des conopeptides, leur classification et leurs modifications post-traductionnelles (1).

Le venin des escargots prédateurs est produit au niveau des cellules épithéliales qui tapissent le conduit, sécrété dans la lumière et injecté dans la proie, entraînant une paralysie (1). Les peptides produits affectent le plus souvent les canaux ioniques et les récepteurs du système nerveux de manière puissante et sélective. Cette sélectivité serait apportée par les modifications post-traductionnelles et est notamment utile en neurologie (1,16). Par exemples, la ziconotide est un agoniste des canaux calciques utilisé comme traitement contre la douleur chronique (1), et la contulakine G et la conotokine G sont respectivement utilisées contre la douleur et l'épilepsie. Certains peptides venimeux, comme la conopressine, sont présents dans d'autres tissus de l'escargot et pourraient avoir une fonction endogène (16).

d. RiPPs chez les bactéries

Atropitides

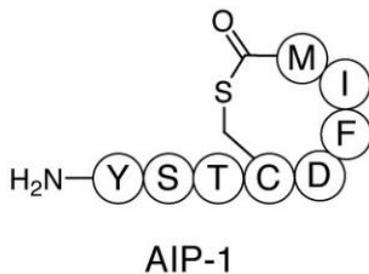
Les fourmis (famille des *Formicidae*) de la tribu des Attini sont fongicoles, formant des associations mutualistes avec des champignons qu'elles cultivent pour se nourrir et des bactéries qui fournissent des défenses chimiques (6,21,22). L'étude de ces symbioses multipartites a permis de montrer la diversité des fourmis fongicoles avec plus de 230 espèces décrites, la diversité des champignons basidiomycètes cultivés et la diversité des actinobactéries mutualistes (21). Les bactéries produisent des RiPPs jouant un rôle clé dans le maintien de ces symbioses en défendant le champignon contre des parasites et contre la concurrence d'autres champignons (6,21,22).

Les atropitides, dont fait partie la tryptorubine A, ont été nommées en raison de leur atropoisomérisation non canonique, c'est à dire présentant une chiralité axiale (non superposable à son image dans un miroir). Celle-ci est causée par l'incapacité physique de rotation de plusieurs liaisons chimiques pour des raisons d'encombrement stérique (6,23).

Auto-inducing peptides (AIP) ou peptides auto-inducteurs

Le Quorum Sensing (QS) est une stratégie de communication et de coordination des traits sociaux dépendant de la densité bactérienne et impliquant la production, la diffusion et la perception d'une molécule de signalisation. Contrairement aux bactéries Gram-négatives qui utilisent surtout des homosérine-lactones comme molécules de signalisation, les bactéries Gram-positives utilisent des peptides ribosomiques dont des RiPPs (16).

La production de nombreux facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus*, bactérie qui colonise environ 30 % de la population mondiale, est sous le contrôle du QS dépendant de RiPP, les peptides auto-inducteurs (AIP) (24). Présent chez de nombreuses espèces de staphylocoques, ce QS consiste en la production et le transport des AIP à l'extérieur de la cellule. Les AIP s'accumulent dans l'environnement avec l'accroissement de la densité bactérienne et se lient au senseur d'un système à deux composants spécifique du QS. En présence de ce signal, le récepteur s'auto-phosphoryle puis transmet la phosphorylation au régulateur, qui est un facteur de transcription. Celui-ci permet ainsi la transcription du système du QS, amplifiant le signal, et des facteurs de virulence comme les hémolysines et les modulines associées aux infections par *S. aureus* (16,24).



Les AIP se distinguent par la présence d'un macrocycle généré par un pont ester ou thioester conservés (Fig. 4) (6,16), qui est nécessaires à la liaison au récepteur. Il existe plusieurs groupes d'AIP divergeant du système de *S. aureus*

Figure 4. Structure de l'AIP-1 (4). Cette famille est définie par une cyclisation générée par un pont thioester conservé. (24).

Bactériocines cycliques

Le membre le plus étudié des bactériocines cycliques est l'entérocyne AS-48, un puissant agent antimicrobien à large spectre actif contre plusieurs Gram-positives et certaines Gram-négatives, isolé d'*Enterococcus faecalis* (4,5,10,16). Les bactériocines cycliques se caractérisent par une résistance aux hautes températures, à certaines protéases et au changement de pH, mais aussi par leur nature hydrophobe et leurs propriétés antimicrobiennes (16).

Certaines bactériocines cycliques induisent la mort cellulaire en créant des pores dans les membranes bactériennes, ce qui entraîne une perméabilité ionique (4,10,16). Le mode d'action n'est cependant pas le même pour toutes les bactériocines et reste inconnu pour la plupart d'entre elles (16). Pour l'entérotoxine AS-48, c'est la dimérisation de ses deux sous-unités qui jouerait un rôle dans la formation des pores membranaires (4,10,16).

Les bactériocines cycliques sont caractérisées par une liaison peptidique head-to-tail (4–6,10). Le mécanisme de cyclisation et donc la classification des bactériocines repose sur la présence d'une protéine membranaire de fonction inconnue appelée DUF95 (Domain of Unknown Function) et d'une protéine liant l'ATP (ATP-grasp) (4,6,16).

Botromycines

Les botromycines constituent une classe de peptides antimicrobiens présentant une puissante activité inhibitrice contre *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) et sur les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) (6,16). Les botromycines agissent en bloquant la liaison de l'aminocycl-ARNt au ribosome 50S (16). Elles sont conservées parmi plusieurs espèces de *Streptomyces*.

Cette classe de RiPP est définie par un macrocycle amidine (macrolactamide) impliquant la protéine ATP-dépendante YcaO (5,6,16).

Cyanobactines

En 1980, deux petits peptides cytotoxiques, l'ulicyclamide et l'ulithiacyclamide, ont été découverts chez le tunicier *Lissoclinum patella*, collecté sur les récifs coralliens tropicaux du Pacifique (16). C'est en 2005 que ces composés de nature RiPP ont été attribués à *Prochloron didemni*, une cyanobactérie symbiotique de *L. patella* (16). Aujourd'hui, environ 200 RiPPs ont été identifiées chez des cyanobactéries libres ou symbiotiques, décrits comme des peptides macrocycliques N-C : on parle de cyanobactines (5,6,16).

Les cyanobactines ont des activités anticancéreuses, antivirales, antiprotéases ou antibiotiques (16). *Prochloron spp.* produisent notamment les patellamides et le trunkamide ayant un potentiel clinique, de par leur activité contre la multirésistance aux médicaments de certaines cellules cancéreuses (5,25).

La protéase PatA, responsable du clivage protéolytique N-terminale et de la macrocyclisation, est l'enzyme commune à toutes les cyanobactines et donc celle qui caractérise la classe de cette famille de RiPP (5,6,16,25).

Lanthipeptides

Les lanthipeptides sont produits principalement par les bactéries lactiques comme les *Lactococcus*, *Streptococcus* et certaines souches de *Staphylococcus*. Ceux avec des propriétés antimicrobiennes sont appelés lantibiotiques, efficaces sur les bactéries Gram-positives mais pas Gram-négatives (4). Les lanthipeptides peuvent avoir des activités autres qu'antimicrobiennes (4,16).

Ils sont caractérisés par la présence de groupements lanthionine (Lan) et/ou labionine (Lab) (4–6,16) (Fig. 5B). La Lan résulte d'une cyclisation par une liaison thioéther entre le β -carbone d'un résidu Ser ou Thr déshydraté, déhydroalanine (Dha) ou déhydrobutyrine (Dhb) respectivement, et d'une Cys (4,16,26). La Lab est un groupement semblable à la lanthionine où une liaison carbone-carbone supplémentaire est générée sur la sérine (Ser) déshydratée (16,26,27).

Les lanthipeptides sont répartis en cinq classes différentes (6,26) selon les enzymes de biosynthèse impliqués dans la formation des motifs Lan et Lab (5,16). Pour les lanthipeptides de classe I, le motif est formé par une déshydratase (Lan B) et une cyclase (LanC) séparées, pour les lanthipeptides des classes II (LanM), III (LanKC), IV (LanL), le motif est formé par des lanthionines synthétases bifonctionnelles et pour les lanthipeptides de classe V ou lanthidines (6,26), la cyclisation serait spontanée (5,16,26) (Fig. 5A).

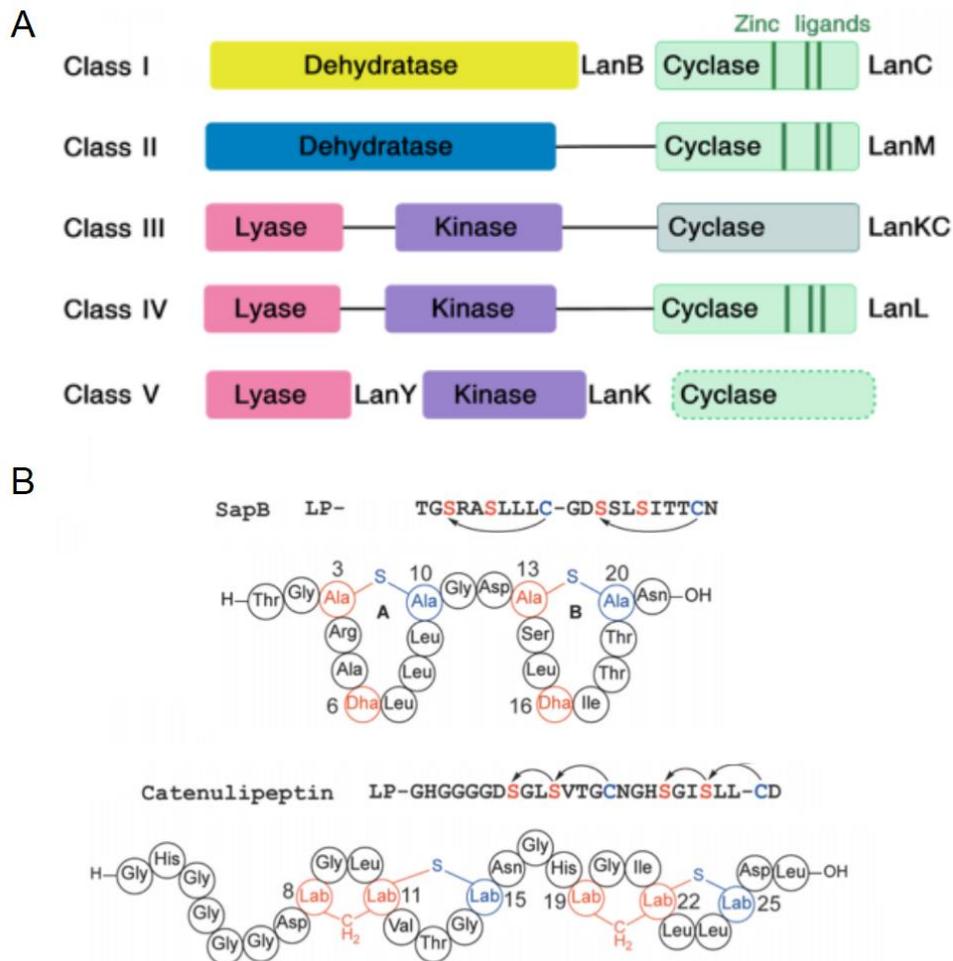


Figure 5. Lanthipeptides : exemples et biosynthèse (26,28). A. Organisation des domaines de l'enzyme ou des enzymes produisant les lanthipeptides des classes I à V. Une déshydratase (LanB) et une cyclase séparées (LanC) génèrent ces motifs dans la classe I et une lanthionine synthétase bifonctionnelle génère ces motifs pour les classes II (LanM), III (LanKC) et IV (LanL). Pour la classe V, les cyclases n'ont pas encore été identifiées. Les barres foncées représentent des ligands zinc et des régions conservées importantes pour l'activité catalytique. B. Exemples de lanthipeptides de classe III. Structures de SapB et de la catunilipeptine. Les réticulations provenant de Cys sont en bleu et les réticulations provenant de Ser sont en orange. Figure adaptée de Pei et al. (2022) et de Ongpipattanakul et al (2022).

La nisine, découverte chez *Lactococcus lactis* à la fin des années 1920, est le lanthipeptide le mieux étudié. Ce lantibiotique de classe I est utilisé dans l'industrie alimentaire comme agent de conservation (Nisapline® et Niprosine®) dans plus de 80 pays depuis les années 1980. La nisine se lie et séquestre le lipide II, un précurseur essentiel du peptidoglycane, entraîne l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire et la formation de pores (4,16). La nisine est aussi associée à la communication bactérienne interspécifique via le QS, ce qui permet l'auto-induction de sa biosynthèse (4,5).

Les lanthipeptides de classe II comprennent quelques exemples ayant un intérêt médical comme l'actagardine, un dérivé semi-synthétique développé contre *Clostridium difficile*, et la duramycine, ayant une capacité de liaison aux phosphatidyléthanolamines (PE),

qui est évaluée comme traitement contre la mucoviscidose (16). Un groupe intéressant de lanthipeptides de classe II sont les lantibiotiques appelés « lantibiotiques à deux composants », produits sous forme de deux entités peptidiques distinctes qui, en synergie ont une activité antibactérienne optimale mais qui, séparées n'ont peu ou pas d'effet (16).

Les lanthipeptides de classe III peuvent présenter les deux modifications Lan et/ou Lab car il existe un sous-ensemble d'enzymes bifonctionnelles permettant leur formation (6,16). La modification Lab a été détectée pour la première fois chez la labyrinthopeptide A, produite par l'Actinomycète *Actinomadura namibiensis* et ayant une activité anti-douleur (17,27). Une variante des lanthipeptides de classe III porte un acide gras ajouté à l'extrémité N-terminale d'un peptide avec une modification Lab : on parle de lipolanthines (6).

Aujourd'hui, seule la venezueline produit par *Streptomyces venezuelae*, et ses homologues structurels, ont été caractérisés comme lanthipeptides de classe IV (6,29).

Le premier lanthipeptide de classe V ou lanthidines découvert est la cacaoïdine isolée d'une souche de *Streptomyces cacaoi*. Ce lantibiotique possède une forte activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et porte une diméthyllanthionine (2MetLan), une modification que l'on ne retrouve pas dans les lanthipeptides connus. D'autres molécules antibiotiques ont été caractérisées comme lanthipeptides de classe V (6,26,30).

A l'heure actuelle, plus d'une centaine de lanthipeptides sont connus et une centaine d'autres sont identifiés grâce à l'exploration des bases de données génomiques. On trouve des gènes de biosynthèse des lanthipeptides dans d'autres groupes que les Firmicutes et les Actinobactéries, comme chez les Bactéroïdes, Chlamydiae, Protéobactéries et Cyanobactéries (16,29).

Peptides-lasso

En raison de leur ressemblance avec la forme adoptée par le lasso d'un cow-boy, le terme « peptide-lasso » a été proposé pour nommer les RiPPs de cette classe (4). En effet, leur structure est caractérisée par un macrocycle fermé par une liaison lactame entre la chaîne latérale d'un résidu Aspartate (Asp) ou Glu et l'extrémité N-terminale du peptide (6,16), et par une queue C-terminale enfilée dans l'anneau et maintenue par encombrement stérique et/ou par des ponts disulfures (4). Cette conformation très compacte et stable confère une forte résistance vis-à-vis des protéases, des agents dénaturants et de la chaleur (6,16). Les peptides-lasso peuvent être produits par des Actinomycètes, des Proteobactéries et quelques Firmicutes (4,16).

Ces peptides présentent des capacités d'inhibition d'enzymes et d'antagonisme à des récepteurs, leur conférant un large éventail de fonctions biologiques comme des activités antimicrobiennes contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (4,16), anticancéreuses et antivirales (6). Concernant les activités antimicrobiennes, le spectre d'activité des peptides-lasso est généralement limité aux bactéries phylogénétiquement proches des bactéries productrices (16).

Les peptides-lasso sont divisés en 3 classes en fonction de leurs caractéristiques structurales (Fig.6).

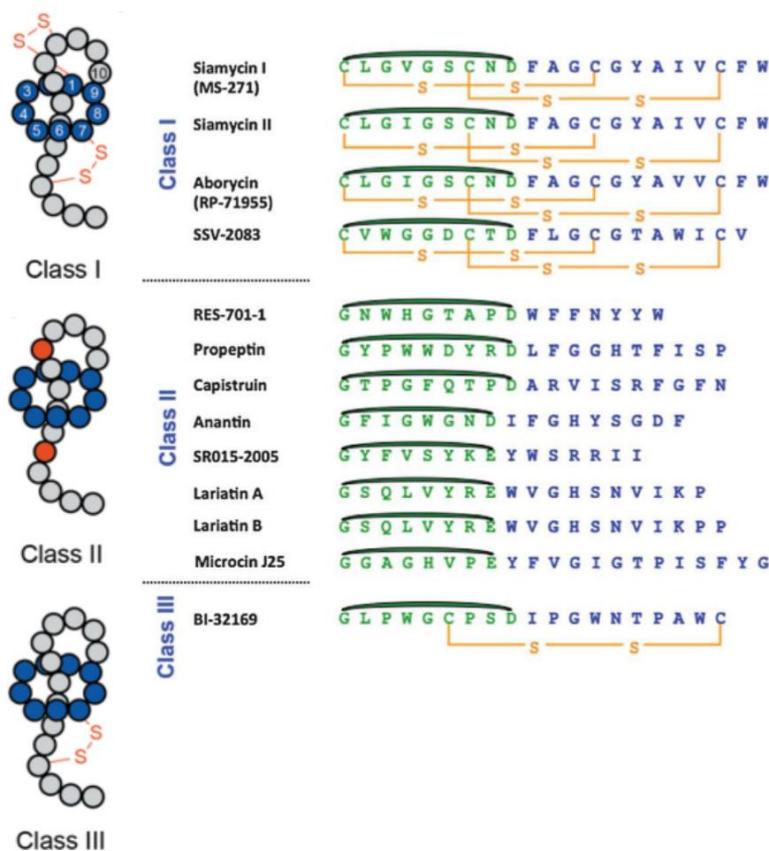


Figure 6. Structure schématique et séquences de peptides lasso des trois classes (16,28). La liaison lactame entre l'extrémité N-terminale et la chaîne latérale de Asp ou Glu est représentée en vert. Les peptides lasso de classe I ont deux liaisons disulfure (jaune) qui relient l'anneau à la boucle et à la queue. Une grande majorité des peptides lasso appartiennent à la classe II, dépourvue de liaisons disulfure. Les peptides lasso de classe III ont une seule liaison disulfure qui relie l'anneau à la boucle. Figure adaptée de Coates et al (2011) et de Ongpipattanakul et al. (2022).

Les peptides de classe I ont une Cys N-terminale et deux liaisons disulfures. Cette classe regroupe 4 représentants, dont certains ont des propriétés anti-VIH (16).

La classe II est définie par des peptides avec une Gly N-terminale et aucun pont disulfure. La microcine J25 produite par *Escherichia coli* est le peptide-lasso antibactérien le plus étudié (4,5,16). Elle pénètre les bactéries Gram-négatives via le système de récepteur de sidérophore de la membrane externe et un transporteur de la membrane interne (4), et inhibe l'ARN polymérase (ARNP) (4,16).

Récemment découverte, la classe III est définie par des peptides ayant une Gly N-terminale et un pont disulfure. Le seul peptide-lasso représentant cette classe est BI-32169, un antagoniste du récepteur du glucagon (16).

Aujourd'hui, environ 70 peptides-lasso ont été isolés (6) et grâce aux études d'exploration des génomes, 76 producteurs potentiels ont été découverts, comportant 9 phyla bactériens et un phylum archéen (16).

Peptides linéaires contenant de l'azol(in)e (LAPs)

La découverte de ces peptides débute dans les années 1930 avec l'analyse d'isolats de *Streptococcus pyogenes* et l'observation du facteur β -hémolytique : la streptolysine S (SLS). Ce n'est qu'en 1996, avec l'étude de la microcine B17 produite par *E. coli*, que la structure et la biogénèse de cette famille de RiPPs ont été résolues (4,16). Avec la découverte de la microcine B17, le terme « microcines modifiées par des thiazoles/oxazoles » (thiazole/oxazole-modified microcins ou TOMMs) est également utilisé pour les LAPs (4).

Les LAPs sont produits par diverses bactéries et possèdent une variété d'activités biologiques (4,5,16). Ils comprennent des toxines comme la SLS, la listeriolysine S de *Listeria monocytogenes* et la stapholysine S de *S. aureus* (4,16), ainsi que des peptides antimicrobiens comme la microcine B17, la klebsazolicine produite par *Klebsiella pneumoniae*, et bien d'autres (4,5). La plupart des modes d'action des LAPs restent méconnus (16) mais certains d'entre eux ont été établis : la microcine B17 bloquerait l'ADN gyrase, et la phazolicine et la klebsazolicine inhiberaient le ribosome (4).

Comme leur nom l'indique, la classe des LAPs est définie par la présence d'une combinaison d'hétérocycles thiazole/thiazoline et oxazole/oxazoline ou méthyloxazole/méthyloxazoline dérivés de résidus Cys, Ser et Thr (4–6,16). La formation des hétérocycles impliquent la protéine ATP-dépendante YcaO, deuxième déterminant de cette classe (6,16).

Méthanobactines

Certains métaux de transition comme le fer (Fe), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn) et le zinc (Zn) sont essentiels chez les bactéries car ils sont impliqués dans la catalyse de certaines enzymes (4,31). Cependant, certains métaux dont le Cu sont utilisés comme agents antibactériens dans l'industrie et les hôpitaux car ils induisent du stress métallique et oxydant. Il est donc indispensable d'avoir un maintien de l'homéostasie physiologique de ces métaux. Un exemple bien connu de RiPP impliqué dans l'homéostasie du Cu sont les méthanobactines (Mbn) (6).

Ces molécules chalcophores sont impliquées dans l'acquisition du Cu (31,32), semblables aux sidérophores qui lient le Fe chez les bactéries (du grec *chalko-* pour Cu et du grec *sidero-* pour Fe) (4,31,33). Les Mbn ont initialement été isolées chez certaines bactéries méthanotrophes comme *Methylosinus trichosporium* (31,32) dans des conditions de privation de Cu (4,33) mais ont également été identifiées dans des bactéries non méthanotrophes (16,34,35). Sur la base d'une analyse phylogénétique, les opérons de Mbn ont été divisés en cinq groupes selon les enzymes de biosynthèse impliquées. Les Mbn des méthanotrophes sont classées dans les groupes I et II et celles des non méthanotrophes dans les groupes III, IV et V (34,35).

Les bactéries méthanotrophes sont des bactéries Gram-négatives qui utilisent le méthane comme source de carbone et d'énergie (16,33,34). Des métalloenzymes appelées méthane monooxygénases (MMO) permettent l'oxydation du méthane en méthanol, et deux formes ont été caractérisées : une enzyme cytoplasmique soluble dépendante du Fe (sMMO) et une enzyme particulière liée à la membrane dépendante du Cu (pMMO) (4,33,34). La pMMO représente jusqu'à 20 % du protéome totale de nombreuses méthanotrophes et c'est pourquoi l'acquisition du Cu est indispensable pour ces bactéries (6,32,33). L'expression et l'activité de ces deux formes de MMO est dépendante du Cu ou « copper switch ». L'expression de la sMMO augmente en absence de Cu, alors que celle de la pMMO augmente en présence de Cu (36) (Fig. 7).

Dans des conditions de limitation en Cu et pour répondre aux besoins élevés en Cu de la pMMO, les Mbn sont sécrétées sous forme apo (apo-Mbn) dans l'environnement (32–34,37). Elles sont capables de fixer avec une grande affinité les ions Cu^+ et Cu^{2+} , avec des constantes de dissociation (Kd) de 10^{-21} à 10^{-19} M pour le Cu^+ et de 10^{-14} à 10^{-11} M pour le Cu^{2+} (4,33,34). Lorsque le Cu^{2+} est fixé, il est rapidement réduit en Cu^+ grâce au couplage avec l' H_2O comme donneur d'électrons, permettant la libération d' O_2 (34,38).

Le complexe Cu-Mbn est ensuite internalisé (33) par un transporteur TonB-dépendant (TBDT) selon un mécanisme similaire aux autres métallophores (4,34). Le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD de la membrane interne apporte l'énergie afin de transporter les substrats à travers la membrane externe (33). La Mbn serait ensuite transportée dans le cytoplasme via un transporteur de type ABC (37). Les TBDTs dédiés aux Mbn présentent une certaine spécificité de substrat mais ils sont capables de lier des Mbn autres que celles de l'espèce productrice, avec des affinités différentes. Les Mbn sont donc partagées au sein d'une communauté bactérienne mais aussi « piratées » par d'autres espèces, de la même manière que les sidérophores (Fig. 7).

Les Mbn, de par leur très forte affinité pour le Cu, ont un intérêt thérapeutique et environnemental (31). Elles sont étudiées dans le cadre d'essais cliniques comme traitement

contre la maladie de Wilson (35), une maladie génétique qui entraîne une accumulation de Cu dans les organes (31), ainsi que dans le traitement des eaux et des sols pollués par des métaux toxiques (32).

Enfin, la classe des Mbn est définie par des modifications de type oxazolone thioamide ou pyrazinedione thioamide, dérivées de résidus Cys et catalysées par des enzymes MNIO (multinuclear non-heme iron-dependent oxidases, DUF692) (6,32), qui sont des enzymes ferro-dépendantes (4,31) dont il sera question plus bas. Ces modifications sont impliquées dans la chélation du Cu (4,6).

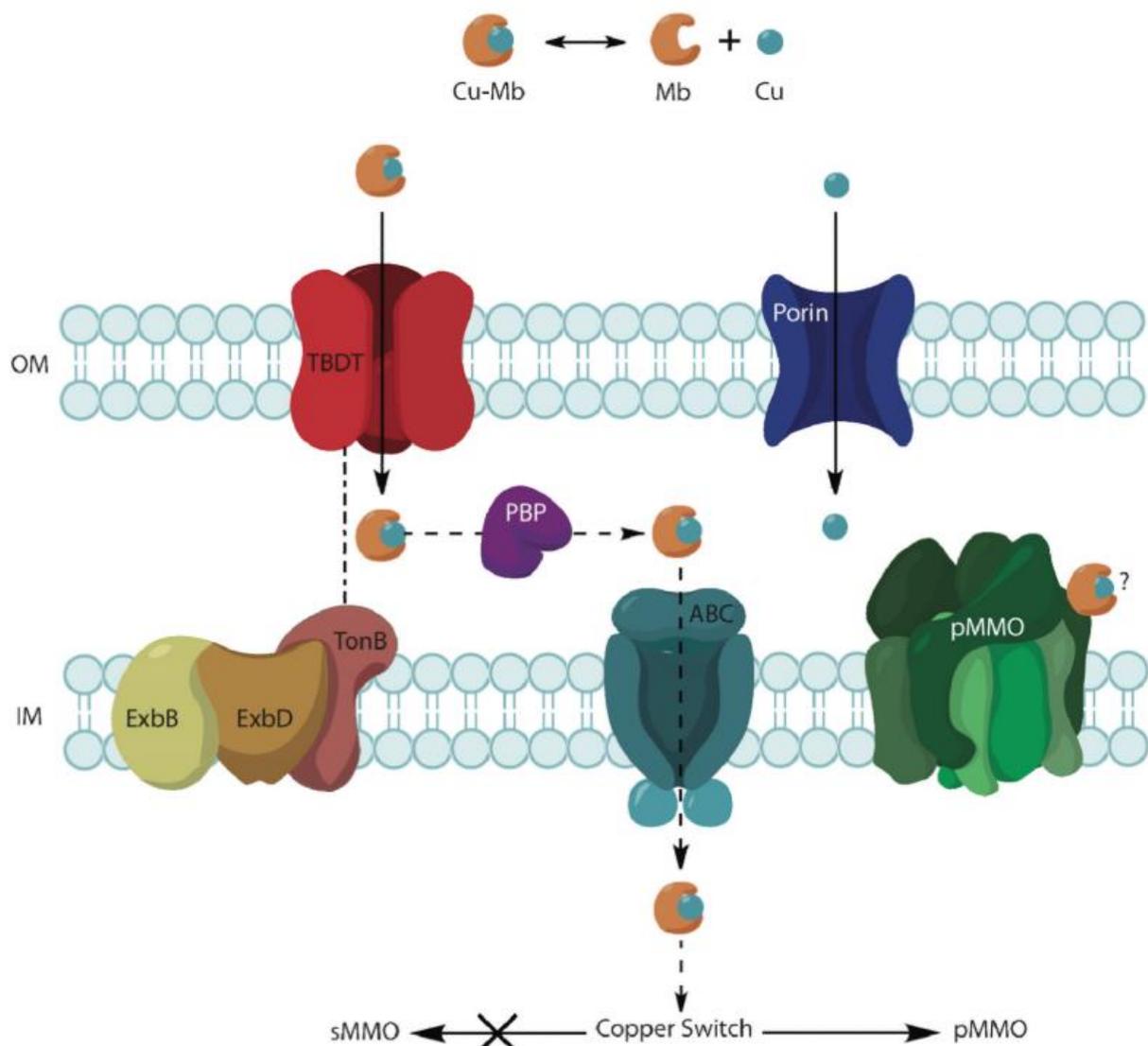


Figure 7. Mécanismes d'acquisition hypothétiques de la Mbn et du Cu (33). Le Cu est transporté à travers la membrane externe soit sous forme libre par un transport passif impliquant des porines, soit sous forme de complexe Cu-Mbn par un transport actif impliquant des TBDT. Par analogie avec les sidérophores, le transport vers le cytoplasme pourrait impliquer un transporteur ABC et une « periplasmic binding protein » (PBP). Le transport du complexe Cu-Mbn dans le cytoplasme permet le « copper switch ».

Microcines C

Alors que les microcines B17 et J25 font respectivement partie des classes LAPs et peptides-lasso, seule la microcine C constitue une nouvelle classe de RiPP. Elle se distingue des autres microcines par une structure comprenant un aminoacyl adénylate ou un cytidylate avec une liaison phosphoramidate (6,39). Cette microcine est appelée « cheval de Troie » car son activation nécessite deux étapes à l'intérieur de la bactérie cible (39). Dans un premier temps, une déformylase peptidique va éliminer le groupe formyl N-terminal, puis l'une des aminopeptidases cellulaires va couper le peptide du côté N-terminal. Ces modifications permettent d'obtenir une molécule qui imite l'aspartyle adénylate, un puissant inhibiteur de l'aspartyl-ARNt synthétase, ce qui bloque la synthèse protéique (16,39).

Thiopeptides

Les Actinomycètes et certains Firmicutes synthétisent des thiopeptides (4,5), une classe de peptides macrocycliques avec plus de 100 membres identifiés. Leur classification, basée sur l'état d'oxydation de l'hétérocycle central, distingue cinq séries (de a à e) (6,16,40).

Les thiopeptides sont surtout connus pour leurs propriétés antibactériennes (6). Cette activité est puissante contre les Gram-positives mais a peu d'effet contre les Gram-négatives, les thiopeptides étant incapables de pénétrer la membrane externe. Ces molécules agissent sur la synthèse protéique (4,16). Les thiopeptides auraient un rôle écologique dans le sol et le microbiote humain (4). Par exemple, la lactocilline, un thiopeptide identifié à partir d'un isolat vaginal de *Lactobacillus gasseri*, est impliqué dans la protection du microbiote en ayant une activité contre les pathogènes comme *S. aureus*, *E. faecalis*, *Gardnerella vaginalis* et *Corynebacterium aurimucosum* (4).

D'autres effets ont été découverts comme des activités antipaludiques et anticancéreuses. La thiostreptone A est à la fois capable d'inhiber l'homéostasie des protéines chez l'agent du paludisme *Plasmodium falciparum* et d'induire l'apoptose dans les lignées cellulaires cancéreuses. D'autres activités ont été décrites, comme l'utilisation des thiopeptides comme molécules de signalisation chez les streptomycètes (16).

Pearlines

Les pearlines sont des petites molécules comprenant notamment les alcaloïdes pyrroloquinolines, trouvés dans une diversité d'organismes (éponges, bactéries, champignons) (28), et le 3-thiaglutamate.

Les deux familles connues des alcaloïdes pyrroloquinolines sont les ammosamides et les lymphostines. Chez les bactéries, il existe une variété de dérivés d'ammosamides avec diverses activités biologiques. La cytotoxicité des ammosamides A et B contre plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines s'exerce en ciblant un membre de la famille de la myosine impliquée dans la structure du cytosquelette, mais aussi en inhibant la quinone réductase 2. Contrairement aux deux autres, l'ammosamide C possède à la fois une activité contre les cellules de mammifères et une activité antimicrobienne (28). La lymphostine, le deuxième alcaloïde pyrroloquinoléine présent chez les bactéries, a été identifiée comme inhibiteur de certaines kinases et a montré une certaine cytotoxicité contre les lignées cellulaires du cancer humain de la prostate et du sein (28).

Actuellement, deux autres pearlins ont été identifiées strictement chez les bactéries : la 3-thiahomoleucine produite par *Tistrella mobilis* et le 3-thiaglutamate produit par *Pseudomonas syringae*. Alors que la fonction de la 3-thiahomoleucine reste inconnue, le 3-thiaglutamate interférerait avec la réponse de défense systémique des plantes (28,41). La biosynthèse de ces deux pearlins fait intervenir une enzyme MNIO (6).

Les pearlins sont une classe de RiPP initialement repérée par des analyses bioinformatiques et définie par l'addition post-traductionnelle d'un acide aminé à l'extrémité C-terminale, qui dépend d'un aminoacyl-ARNt (6,28). Les pearlins ont été nommés d'après les enzymes permettant cette modification, les PEptide Aminoacyl-tRNA Ligases (PEARLs) (6).

Sactipeptides

A ce jour, seuls quelques sactipeptides, principalement produits par le genre *Bacillus* (16), ont été caractérisés et tous possèdent des activités antibactériennes contre les pathogènes *C. difficile*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus sp.* ou *Gardnerella vaginalis* (4,28). Les sactipeptides ciblent la membrane cytoplasmique (4–6,16,28), bien que les mécanismes détaillés de l'activité restent indéterminés (28).

Récemment, des sactipeptides ont été retrouvés chez des bactéries des genres *Ruminococcus* et *Staphylococcus*. Contrairement aux autres sactipeptides, la ruminococcine C, et la hycine produite par *Staphylococcus hycicus*, ne forme pas de pores mais inhibe la synthèse des acides nucléiques et des biofilms (4,28).

La subtilosine A et le facteur de destruction de la sporulation (sporulation killing factor SKF) produits par *B. subtilis* sont les sactipeptides les mieux caractérisés. En interagissant avec un récepteur de surface, la subtilosine A formerait des pores transitoires dans la membrane

bactérienne et induirait un défaut de perméabilisation (16,28). Elle aurait aussi un rôle dans l'inhibition de la formation de biofilms dépendant du QS, une activité spermicide (16) et une activité contre le virus de l'herpès HSV-1 (28). SKF est activé chez *B. subtilis* dans des conditions de limitation des nutriments et induit la lyse de ses congénères, afin de libérer des nutriments et ainsi retarder la sporulation (6,28). C'est un exemple de cannibalisme par un RiPP (section Introduction. I. 3. d. ii).

Les sactipeptides sont caractérisés par une structure en épingle à cheveux (4) résultant de liaisons entre le soufre d'un résidu Cys et le carbone α d'un autre résidu (16). Ces liaisons, sont installées par une enzyme à radical S-adénosylméthionine (rSAM), deuxième déterminant de la classe (5,6,28).

e. RiPPs chez les archées

Les antimicrobiens du domaine Archea sont appelées archéocines et étudiées depuis les années 1980 (42). Ce sont des protéines ou des peptides qui incluent les halocines produites par les archées de l'ordre des *Halobacteriales*, les sulfolobocines produites par les archées de l'ordre des *Sulfolobales* et des RiPPs (43). Alors que les métabolites secondaires impliqués dans les systèmes d'attaque et de défense sont relativement bien étudiés chez les bactéries et les eucaryotes, les données sur ces systèmes sont rares chez les archées (43,44).

RiPPs chez les archées : des classes retrouvées chez les bactéries

Une étude métagénomique globale de 2022 a permis d'identifier chez les archées des clusters de gènes codant pour des RiPPs comme des lanthipeptides, des peptides-lasso, des sactipeptides, des thiopeptides et des LAPs mais aussi pour des RiPPs non classifiés (43,44).

Grâce à cette étude, trois nouveaux lanthipeptides de classe II appelés archalanes α , β et γ ont été découverts dans la classe des Haloarchaea. Les lanthipeptides archéens se distinguent des lanthipeptides bactériens par des peptides cores plus courts et divers en acides aminés, et des séquences de leader peptide plus diversifiées. L'archalane α purifiée a montré une activité inhibitrice puissante contre des espèces d'Haloarchaea phylogénétiquement proches des archées productrices (43).

Microhalocines : des RiPPs ?

Les halocines sont réparties en fonction de leur masse moléculaire et de leurs principales propriétés, notamment leur résistance à la chaleur et à la concentration en sel. On distingue

les halocines de masse moléculaire élevée de celles de faible masse moléculaire appelées microhalocines (45). Ces dernières sont généralement plus stables, plus résistantes et plus hydrophobes que les halocines (16,45). Elles sont maturées de façon post-traductionnelle par des peptidases inconnues (44,45). Bien qu'aujourd'hui, rien ne prouve que les microhalocines possèdent des modifications post-traductionnelles sur certains acides aminés, on ne peut pas exclure cette possibilité, ce qui en ferait des RiPPs (42).

L'halocine S8 (HalS8) est produite par des haloarchées isolées du Grand Lac Salé dans l'Utah aux États-Unis. C'est un polypeptide de 36 acides aminés provenant d'une pro-protéine de 311 résidus. Les maturations de cette pro-protéine libèrent aussi une protéine N-terminale de 230 acides aminés et un peptide C-terminal de 45 acides aminés potentiellement actifs dans la régulation, l'exportation ou l'immunité.

Les cibles des microhalocines ne sont toujours pas connues à ce jour. Alors que les antibiotiques peptidiques inhibent les bactéries et les eucaryotes par rupture de la membrane, les microhalocines, de par leur hydrophobicité, semblent avoir des mécanismes d'action nouveaux. Elles sont actives sur les Haloarchaea et certaines espèces de *Sulfolobus*. Il est possible qu'elles ciblent un élément commun spécifique aux archées (42).

2. Biosynthèse des RiPPs

Depuis quelques années, l'identification de nouvelles familles a augmenté grandement grâce aux efforts d'exploration du génome (1) et aux progrès réalisés dans l'identification et la caractérisation des voies de biosynthèse. En effet, les processus de maturation de ces peptides, les enzymes de modification impliquées ainsi que leurs activités biologiques sont fortement étudiés (5,46).

Les RiPPs partagent trois caractéristiques « universelles » de biosynthèse : ils sont dérivés de séquences précurseurs courtes qui sont traduites, modifiées et clivées ; les gènes impliqués dans la biosynthèse et les gènes associés sont regroupés en clusters chez les bactéries ; et certains précurseurs contiennent une séquence de reconnaissance nécessaire au recrutement des enzymes de modification (46).

Les familles de RiPPs sont caractérisées sur la base de leur structure et de leur biosynthèse. Il n'existe pas d'enzyme de modification commune à tous les clusters de gènes, même si certaines familles d'enzymes interviennent sur plusieurs classes de RiPPs. Ces particularités de biosynthèse font des RiPPs des cibles attrayantes pour la bio-ingénierie (2).

a. Peptide précurseur

Les RiPPs sont synthétisés par les ribosomes sous forme de précurseurs soumis à des modifications post-traductionnelles, puis protéolysés afin de libérer les peptides matures (1).

Dans la plupart des RiPPs, le précurseur, d'une longueur typique de 20 à 110 résidus (16) est composé de plusieurs régions. La région centrale ou « peptide core » est une séquence hypervariable où ont lieu des modifications post-traductionnelles. Certaines de ces modifications post-traductionnelles sont guidées par une deuxième région, une séquence de reconnaissance conservée (1,6). De manière générale, le peptide de reconnaissance est en position N-terminale du précurseur, et appelé « leader peptide » (1), mais certains exemples rares comme la classe des botromycines présentent une région de reconnaissance C-terminale, dite « follower peptide » (5,16) (Fig. 8A). Cette région de reconnaissance est importante pour diriger le peptide vers les enzymes de modification dans les compartiments cellulaires spécifiques chez les eucaryotes, mais aussi pour l'excision et la cyclisation (16). En plus de permettre la reconnaissance, cette région maintient le RiPP inactif pendant la biosynthèse (6). Lors de la maturation du précurseur, cette région de reconnaissance est éliminée par une ou plusieurs étapes de protéolyse (1,16).

Chez certains RiPPs comme les amatoxines, les cyanobactines, et d'autres, le peptide précurseur est constitué de plusieurs peptides leaders et de plusieurs peptides cores, permettant la maturation de plusieurs produits RiPPs (Fig. 8B) (6). Des études ont montré une plasticité dans la biosynthèse des RiPPs. En effet, les enzymes de modification reconnaissent les séquences de reconnaissance, qui sont bien conservées entre elles, mais elles sont permissives au niveau du peptide core, permettant de générer plusieurs RiPPs différents à partir du même précurseur (1,16).

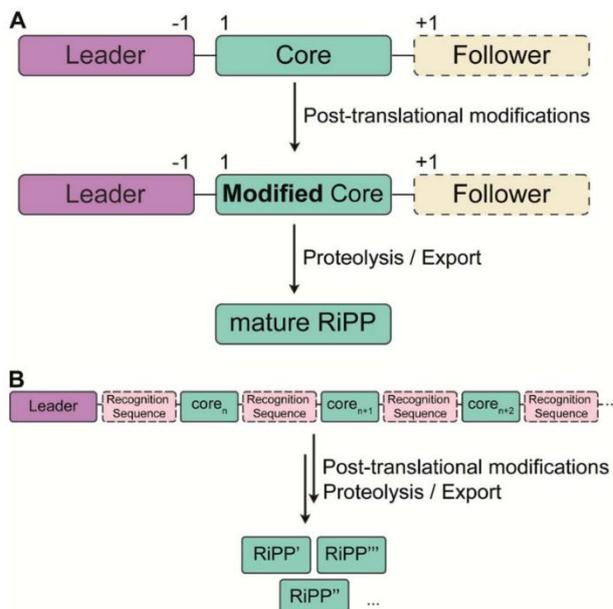


Figure 8. Voie de biosynthèse générale des RiPPs (6). A. De manière générale, le peptide de reconnaissance est en position N-terminale du précurseur appelé « leader peptide » (1), mais certains exemples le peptide de reconnaissance est en position C-terminale du précurseur, appelé « follower peptide ». B. Pour certains RiPPs, le peptide précurseur est constitué de plusieurs peptides leaders et de plusieurs peptides cores, permettant la maturation de plusieurs produits RiPPs.

Enfin, la définition des RiPPs est limitée aux peptides de moins de 10 kDa afin d'exclure les protéines modifiées post-traductionnellement (16). Cependant, la séparation entre protéine et peptide reste imprécise car certains petits composés, comme l'insuline à 5,8 kDa, sont qualifiés de protéines (42).

b. Modifications et enzymes de modification

i. Des modifications communes à plusieurs familles de RiPPs

Malgré des voies de biosynthèse et des structures finales très différentes, les RiPPs partagent diverses modifications post-traductionnelles qui permettent d'augmenter la stabilité, de diminuer la flexibilité conformationnelle et d'améliorer l'activité biologique des molécules (16,46). Ces modifications peuvent se produire sur un seul résidu comme les déshydratations, les phosphorylations, les hydroxylations, les carboxylations, les méthylations, les acétylations, la formation d'acide pyroglutamique, les glycosylations et les épimérisations. Elles peuvent aussi impliquer une liaison entre deux résidus comme les ponts disulfures, les lanthionines (Lan), les liaisons entre carbones, les liaisons entre carbone et soufre, les (methyl)oxazol(in)es, les thiazol(in)es et les cyclisations head-to-tail (16).

Beaucoup de mécanismes de biosynthèse font intervenir la chimie du soufre. Dans les conopeptides, lanthipeptides et peptides-lasso notamment, les thiols des résidus Cys sont convertis en ponts disulfures. Dans les lanthipeptides, les phallotoxines et les sactipeptides, les cystéines sont impliqués dans la formation de liaisons thioéthers, et dans les cyanobactines, les LAPs et les thiopeptides elles sont converties en thiazol(in)es (16).

Ponts disulfures

Les ponts disulfures sont une des modifications les plus fréquentes et sont impliqués dans la rigidité de la conformation et/ou dans l'activité et la sélectivité du composé. Ainsi, l'absence des ponts disulfures conduit à la réduction de la bioactivité chez les conopeptides, contrairement aux bactériocines et aux cyanobactines, où la liaison confère seulement une rigidité (46).

La formation de ponts disulfures est souvent dépendante d'enzymes : c'est l'exemple des RiPPs eucaryotes dépendants de protéines disulfure-isoméras (PDI) ou de certains RiPPs bactériens dépendants de l'activité de thiol-disulphide oxidoreductases (TDOR). Les TDOR cytoplasmiques sont des réductases catalysant la rupture des liaisons, et les TDOR périplasmiques sont des oxydases catalysant la formation des liaisons ou des isoméras catalysant la réorganisation des liaisons disulfures (46,47).

La formation des ponts disulfures peut être indépendante d'enzymes si elle se fait dans les conditions d'oxydation du périplasme, où ils sont alors générés sur la base de la proximité chimique entre les groupements thiols de façon très lente et non spécifique (46,47).

Macrocyclisation

La macrocyclisation est une modification très courante qui permet d'obtenir des structures très rigides, importantes pour la fonction de la molécule et pour sa résistance aux protéases. Chez les eucaryotes il s'agit de cyclisation head-to-tail, et chez les bactéries, de cyclisation head-to-tail ou de cyclisation impliquant des chaînes latérales. Ces macrocycles présentent une grande diversité de taille pour les boucles ainsi générées, allant de 6 à 12 acides aminés pour les cyanobactines jusqu'à environ 70 acides aminés pour les bactériocines cycliques. Bien que les mécanismes de biosynthèse de certains macrocycles restent peu détaillés, la majorité des peptides cyclisés partagent un événement de protéolyse N-terminale entraînant le clivage de la séquence leader du peptide précurseur, et la liaison entre l'amine N-terminale nouvellement formée et un carboxyle (46).

Pour les cyclisations head-to-tail le groupe carboxyle provient du résidu C-terminal. De manière courante, le clivage protéolytique N-terminal et la cyclisation requièrent l'utilisation de deux enzymes distinctes, mais dans certains cas, les deux réactions peuvent être réalisées par une seule enzyme. Par exemples, les sérine-protéases, PatA et PatG chez les cyanobactines catalysent respectivement la protéolyse et la cyclisation, alors que la prolyl-oligopeptidase (POP) chez les amatoxines catalyse les deux réactions. L'étape de macrocyclisation head-to-tail reste mal comprise pour les bactériocines circulaires (6,46).

Pour les cyclisations retrouvées chez des lasso-peptides, le groupe carboxyle provient d'une chaîne latérale d'un résidu non C-terminal (46). La biosynthèse de la microcine J25 fait intervenir deux enzymes : la protéase à Cys ATP-dépendante McjB clive le peptide leader, et la lactame synthétase McjC catalyse la cyclisation entre le résidu Gly en position 1 généré lors du clivage et le carboxylate de la chaîne latérale d'un résidu Glu (6).

L'exemple de la cyclisation head-to-tail montre l'évolution convergente d'enzymes de modification post-traductionnelles vers la production de structures similaires. A l'inverse, certaines enzymes de modification semblent avoir évolué de manière divergente pour produire de nouvelles structures (16).

ii. Des enzymes de modification communes aux voies de biosynthèse de plusieurs familles de RiPPs

Cyclodéshydratases YcaO

Diverses voies de biosynthèse utilisent des enzymes de modifications communes (16). Les cyclodéshydratases de TOMMs sont retrouvées dans plus de 1000 clusters de gènes de biosynthèse (BCG : biosynthesis gene cluster). Trois classes de RiPPs, les cyanobactines, les LAPs, et les thiopeptides sont modifiés par ces cyclodéshydratases (2,16). Ces enzymes catalysent l'attaque nucléophile intra ou intermoléculaire sur le carbonyle d'un amide pour générer un oxyanion. Cet oxyanion est ensuite O-phosphorylé de manière ATP-dépendante, l'utilisation d'ATP étant une caractéristique universelle des YcaOs. La nature de la modification dépend de l'identité du nucléophile (6,28,48).

Les enzymes YcaO impliquées dans l'installation d'hétérocycles azolines (Fig. 9) sont « orphelines » ou en association avec un activateur de l'ubiquitine de type E1-like sous forme de deux protéines séparées ou de deux domaines d'une même protéine (2,16), et le terme cyclodéshydratase désigne leurs actions collectives. Le domaine E1-like sert de potentialisateur et de régulateur d'YcaO (6). Les hétérocycles azolines peuvent subir une oxydation en azole par une déshydrogénase Flavine MonoNucléotide-dépendante (28,48).

Concernant les enzymes YcaO impliquées dans l'installation des thioamides (Fig. 9), seules des études biochimiques ou structurales sur des YcaOs non associées à des RiPPs provenant d'archées méthanogènes sont disponibles. Ces YcaOs sont connues pour installer un résidu thioglycine dans la sous-unité A de la méthyl-coenzyme M réductase (McrA). Elles sont fréquemment retrouvées associées à une protéine TfuA dont le rôle reste inconnu malgré son importance dans la thioamidation (6)(48).

Les enzymes YcaO impliquées dans l'installation des macrolactamidines (Fig. 9) sont autonomes vis-à-vis de la protéine E1-like. L'alignement structural des enzymes montre que les YcaO formant des azolines se différencient de celles formant des thioamides et des macrolactamidines par la présence d'une extension de l'extrémité C-terminale dans le site actif (6,48).

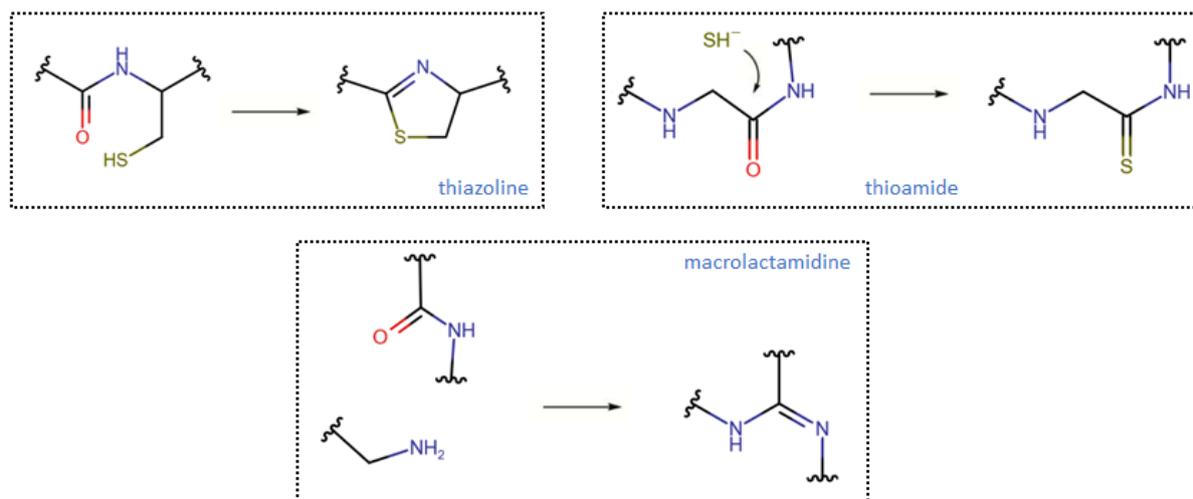


Figure 9. Diverses modifications post-traductionnelles réalisées par les membres de la famille YcaO (6,48). Figure adaptée de Montalbán-López et al. (2021) et de Schwalen et al. (2017).

Maturases à radical S-adénosyl-méthionine (rSAM)

Ces enzymes sont les déterminants de nombreuses classes (sactipeptides, ranthipeptides, streptides) et produisent de nombreuses transformations par la formation de liaisons C-H, C-C, C-S et C-O (6,49). Malgré la diversité des réactions catalysées, les enzymes à rSAM sont unies par un mécanisme commun. Ces enzymes présentent dans leur site actif, un cluster fer-soufre [4Fe-4S] coordonné par trois Cys dans un motif CxxxCxxC qui permet le clivage de la S-adénosyl méthionine (Met), générant un L-Met et un radical 5'-désoxyadénosyl (5'-dA). Le transfert d'un hydrogène du substrat précurseur vers ce radical 5'-désoxyadénosyl initie les transformations chimiques vers les modifications adéquates. En plus du cluster [4Fe-4S] dans le site actif, de nombreuses enzymes à rSAM contiennent des clusters [4Fe-4S] auxiliaires dans un domaine C-terminal appelé domaine AISC (Auxiliary Iron-Sulfur Clusters) (Fig. 10A et 7D) (6,28,49).

Les enzymes rSAM impliquées dans l'installation de sactionines (Fig. 10A et 10B) sont les plus courantes (49). Elles interviennent dans la biosynthèse des sactipeptides et permettent des liaisons α thioéther entre le soufre d'une Cys et le carbone α (C α) d'un autre résidu. Les enzymes rSAM impliquées dans l'installation de liaisons non- α -thioéther (Fig. 10C) interviennent dans la synthèse des ranthipeptides et permettent des liaisons entre le soufre d'une Cys et le carbone β (C β) d'un autre résidu. Les enzymes rSAM impliquées dans l'installation de liaisons carbone-carbone entre un résidu Lys et un résidu Trp (Fig. 10D et 10E) sont présentes dans la voie de biosynthèse des streptides (49). Pour ces trois groupes d'enzymes, le mécanisme réactionnel n'est pas déterminé de façon univoque, mais dans tous

les cas il y a formation d'un ou plusieurs radicaux. Certains mécanismes proposés font intervenir le domaine AISC (6).

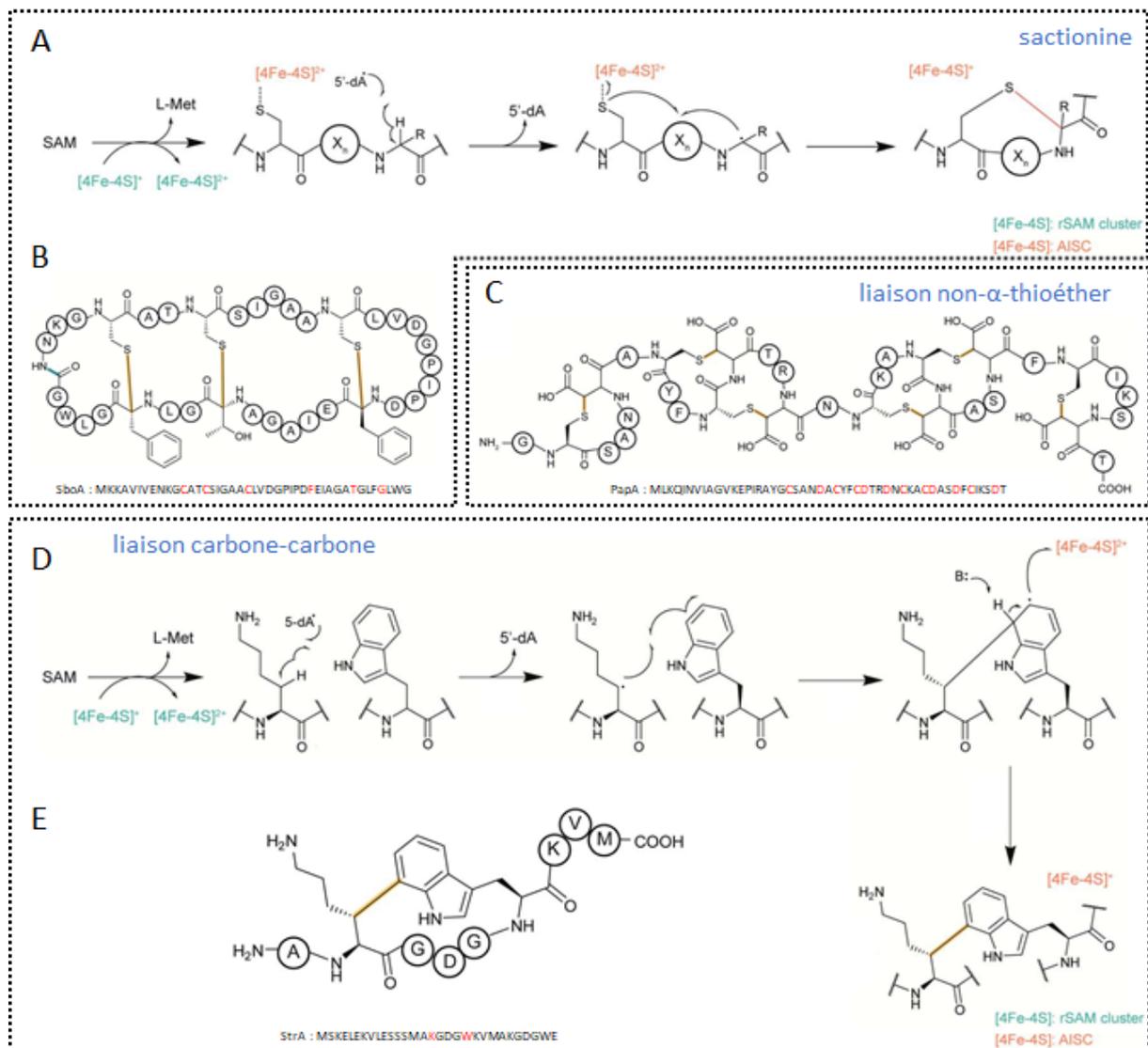


Figure 10. Diverses modifications post-traductionnelles réalisées par les membres de la famille rSAM (6). A. Schéma proposé pour la liaison sactionine médiée par l'enzyme rSAM chez les sactipeptides. B. Structure de la subtilosine A, un sactipeptide. C. Structure de la freyrasine, un ranthipeptide. D. Schéma proposé pour la liaison C – C médiée par l'enzyme rSAM chez les streptides. E. Structure du streptide. Les différentes liaisons (sactionines, non-α-thioéther et carbone-carbone) sont en jaune. Figure adaptée de Montalbán-López et al. (2021).

Enfin, les enzymes rSAM sont aussi impliquées dans l'installation d'hétérocycles thio(sélén)oxazoles, c'est-à-dire la cyclisation d'un résidu Cys/sélénocystéine (SeCys), et dans des épimérisations, c'est-à-dire le clivage de la liaison carbone-carbone du squelette et l'excision d'une tyramine, permettant la production d'acides aminés β (6,49).

Les enzymes oxydatives non hémiques dépendantes d'un cofacteur Fe multinucléaire (MNIO, anciennement DUF692)

Les enzymes MNIO interviennent dans la biogénèse de différentes familles de RiPPs comme les méthanobactines (section Introduction. I. 1. d. méthanobactines), certaines pearlins (section Introduction. I.1.d. pearlins) et des RiPPs nouvellement découverts, la chryséobasine et les aminopyruvatides. Ces enzymes sont capables d'installer au moins cinq modifications différentes : une oxazolone thioamide, un 3-thiaglutamate, un hétérocycle imidazolidinedione, une amide C-terminale et un acide (S)-3-amino-2-oxobutanoïque (Fig. 11). Les enzymes MNIO sont structurellement apparentées aux triose-phosphate isomérases et présentent dans leur site actif un cofacteur multinucléaire contenant deux ou trois atomes de Fe. Un ion Fe^{3+} est important dans la liaison et le positionnement du précurseur, et un ion Fe^{2+} catalyse la modification sur une Cys ou un résidu Asp. L'ion Fe^{2+} , en présence d'oxygène, forme un radical superoxo- Fe^{3+} qui retire un H du carbone β ($\text{C}\beta$) d'un résidu Cys ou d'un résidu Asp, initiant ainsi la réaction. Les enzymes MNIO catalysent des oxydations à quatre électrons (6,50–52).

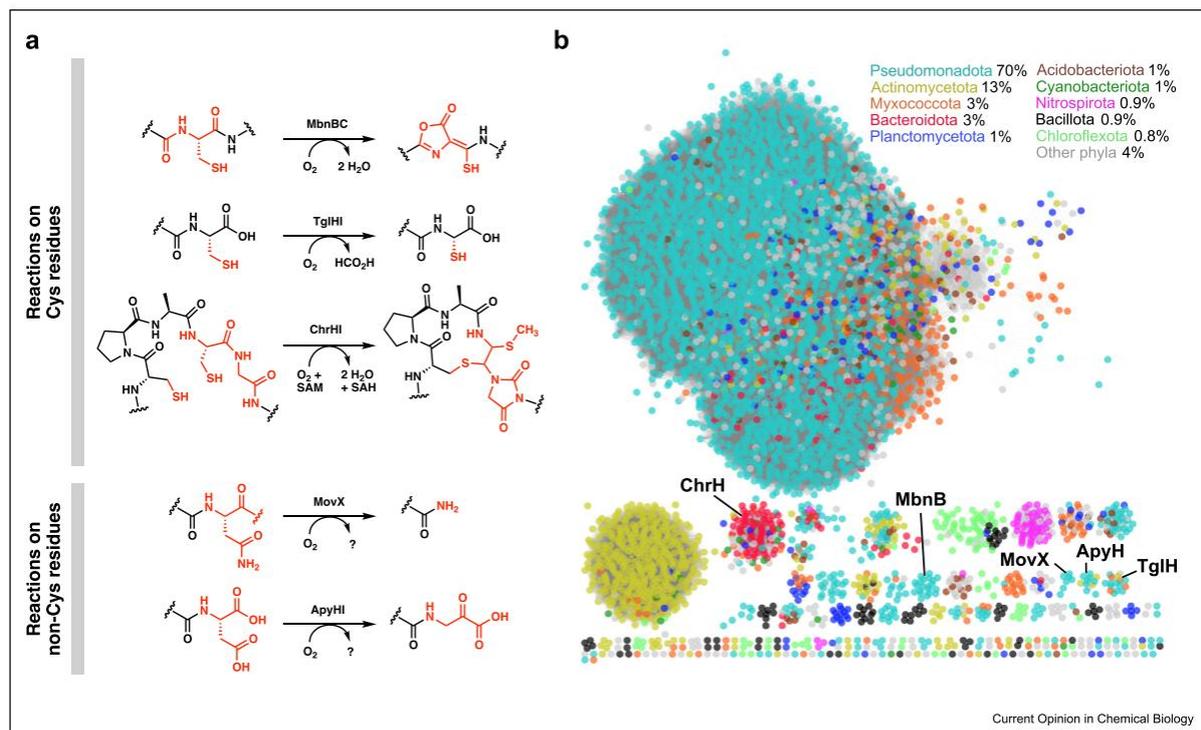


Figure 11. Diverses modifications post-traductionnelles réalisées par les membres de la famille MNIO (DUF692) (52). a. Schéma proposé pour les réactions catalysées par MbnBC, TglHI, ChrHI, MovX et ApyHI. **b.** Réseau de similarité de séquence (Sequence similarity network SSN) des MNIO (DUF692). Le SSN est coloré selon les dix principaux phyla dans lesquels les MNIO sont le plus fréquemment trouvés et les pourcentages représentent la répartition des espèces contenant des MNIO à travers les phyla.

Une enzyme MNIO impliquée dans la biosynthèse des méthanobactines, MbnB, a été bien caractérisée. Elle catalyse la formation d'une oxazolone avec un groupe thioamide adjacent. MbnB nécessite la présence de MbnC, une protéine impliquée dans la reconnaissance du précurseur MbnA, formant un complexe hétérotrimérique MbnABC. L'atome de soufre d'une Cys du précurseur MbnA se lie à l'ion Fe^{3+} de la protéine MbnB. Après abstraction du H par un intermédiaire superoxyo- Fe^{3+} , MbnBC permet le clivage des trois liaisons C-H sur les C α et C β d'une Cys du précurseur, déclenchant une oxydation à quatre électrons et formant le groupe oxazolone thioamide (6,31,50,53) (Fig. 11).

L'enzyme MNIO TglH impliquée dans la biosynthèse d'une pearlène permet, avec d'autres enzymes, la formation d'un 3-thiaglutamate. TglH nécessite la présence de TglI, une protéine impliquée dans la reconnaissance du précurseur TglA. La première étape est l'addition d'un résidu Cys à l'extrémité C du précurseur TglA, de manière dépendante d'un ARN de transfert (ARNt) à Cys et d'ATP. TglHI catalyse ensuite une oxydation à quatre électrons de cette Cys terminale, entraînant l'excision du C β et générant un résidu 2-mercaptoglycine. Le thiol est ensuite carboxyméthylé par la méthyltransférase SAM-dépendante TglF, et un clivage protéolytique médié par TglG libère le 3- thiaglutamate (6,50) (Fig. 11).

L'enzyme MNIO ChrH impliquée dans la biosynthèse de la chryséobasine permet la formation d'un macrocycle, d'un hétérocycle imidazolidinedione et d'une thiométhylation. ChrH nécessite la présence de ChrI, une protéine membranaire contenant un domaine DUF1772 impliquée dans la reconnaissance du précurseur ChrA (50) Contrairement à MbnB et TglH, ChrH est dépendante d'une SAM pour une réaction de méthylation permettant d'obtenir la structure finale de ChrA (50).

L'enzyme MNIO impliquée dans la biosynthèse des aminopyruvatides, ApyH, permet avec la méthyltransférase ApyS la formation d'un acide (S)-3-amino-2-oxobutanoïque. ApyH nécessite la présence d'ApyI pour la reconnaissance du précurseur ApyA et constitue le premier exemple d'enzyme MNIO à agir sur un autre résidu que la Cys. ApyHI catalyse donc l'oxydation à quatre électrons du C β de cette Asp C-terminale. Cette étape est suivie d'une méthylation par ApyS (51).

L'enzyme MNIO MovX impliquée dans la biosynthèse des méthanobactines du groupe V (section Introduction. I. 3. c. iii), permet la formation d'un amide C-terminal. De par une extension C-terminale probablement impliquée dans la reconnaissance du précurseur, MovX ne nécessite pas de protéine supplémentaire. MovX permet le clivage de la liaison N-C α d'une Asp C-terminale et constitue le deuxième exemple d'enzyme MNIO à agir sur un autre résidu que la Cys (52).

c. Autres protéines présentes dans les clusters génétiques des RiPPs

En plus d'être dépendante des enzymes de modification, la production des RiPPs dépend de protéines de transport et d'immunité, ainsi que de systèmes de régulation. Les protéines d'immunité sont retrouvées uniquement dans la biosynthèse de RiPPs antimicrobiens (3).

i. Exemple d'un AIP chez *S. aureus*

Un exemple intéressant de biosynthèse de RiPPs nécessitant des protéines associées sont les AIPs. Ces RiPPs, codés par des gènes du système Agr (Accessory Gene Regulator), contrôlent la formation de biofilms et la production de facteurs de virulence chez différents pathogènes. Chez *S. aureus*, la biosynthèse de ces peptides du QS est organisée en opérons comprenant *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA*, codant respectivement une endopeptidase membranaire, le précurseur de RiPP, et un système à deux composants (TCS) (4,16,24).

Les peptides AgrD possèdent une région N-terminale amphipathique localisant le peptide au niveau de la membrane plasmique, une région centrale qui formera l'AIP mature et une région de reconnaissance C-terminale (16,24). L'endopeptidase membranaire AgrB reconnaît le segment C-terminal d'AgrD et catalyse son clivage protéolytique puis la cyclisation du nouveau résidu C-terminal avec un résidu Cys conservé dans le domaine central, formant une thiolactone (24,46). AgrD est ensuite transporté vers le milieu extérieur et le domaine N-terminal est éliminé par une peptidase signal, libérant à l'extérieur de la cellule un peptide AIP avec un anneau thiolactone de 5 acides aminés du côté C-terminal (16). AgrD est reconnu par le TCS AgrCA permettant la régulation de l'expression de l'opéron *agrABCD* et de facteurs de virulence (4,23) comme les hémolysines, les entérotoxines et les protéases (28).

ii. Exemple de la nisine chez *L. lactis*, un lanthipeptide de classe I

La biosynthèse de la nisine à partir du précurseur NisA est organisée en opérons et fait intervenir plusieurs protéines accessoires : une déshydratase, NisB, une cyclase NisC, un transporteur NisT, une sérine-protéase extracytoplasmique NisP, le TCS NisKR (3,5,6), une lipoprotéine immunitaire NisI et un transporteur de type ABC impliqué dans l'auto-résistance (ou immunité) NisFEG (16) (Fig. 12).

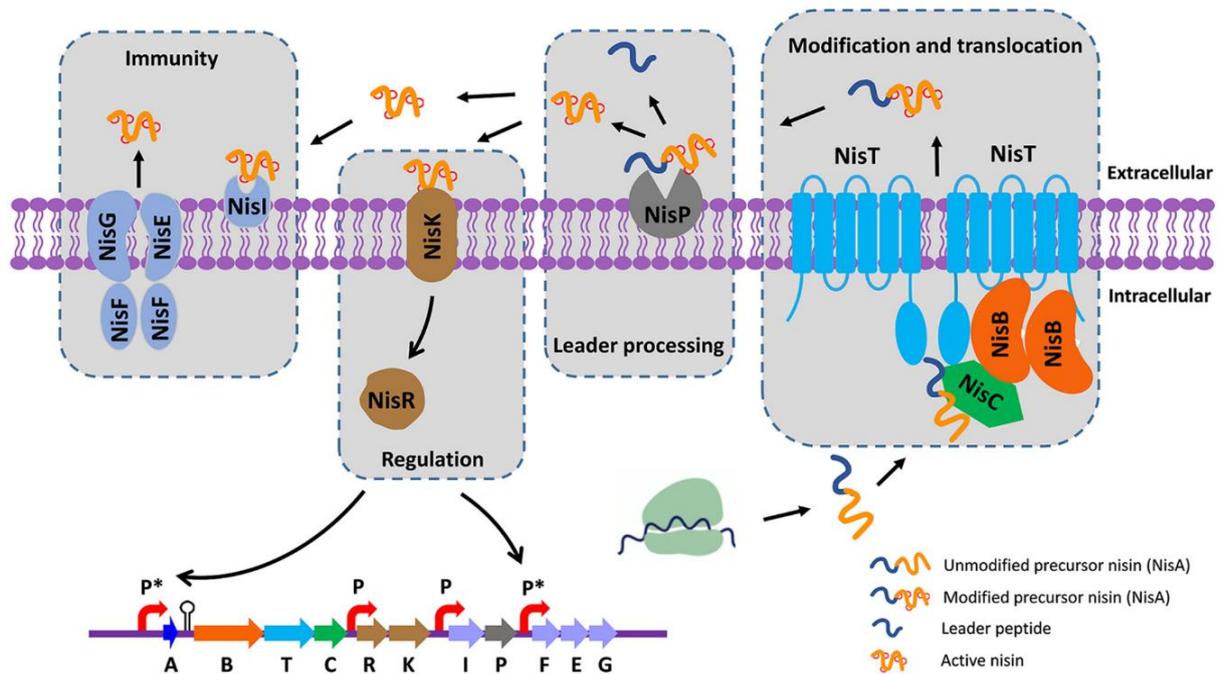


Figure 12. Biosynthèse, régulation et immunité de la nisine chez *L. lactis* (54). Le précurseur NisA est pris en charge par un complexe composé de la déshydratase NisB, de la cyclase NisC et du transporteur ABC NisT. NisA est modifié par NisB et NisC, exporté à l'extérieur des cellules par NisT, puis clivé au niveau du peptide leader par la protéase extracellulaire NisP, libérant la nisine active. La nisine permet la régulation de l'expression des opérons *nisABTCIP* et *nisFEG* via le système à deux composants *NisRK*. L'immunité est conférée par deux systèmes différents, la lipoprotéine NisI et le transporteur ABC NisFEG.

Un complexe transitoire est formé comprenant un dimère de NisB, un monomère de NisC et un monomère de NisA. NisA est d'abord glutamylé par le premier domaine de NisB, puis le précurseur glutamylé est transféré au deuxième domaine qui permet l'élimination du glutamate pour former un groupement déhydroalanine ou déhydrobutyrate (Dha/Dhb). Le précurseur est ensuite transféré à NisC qui catalyse la cyclisation entre le résidu déshydraté et un résidu Cys, formant une lanthionine. Lorsque l'anneau de lanthionine est formé, NisA est retransféré à NisB pour la modification du prochain résidu et ce jusqu'à ce que NisA soit entièrement modifié. Cette alternance répétée des actions de NisB et NisC s'expliquerait par un nombre croissant d'anneaux de lanthionine qui diminue l'affinité de NisA pour NisC (3) (Fig. 12).

Dans un deuxième temps, les protéines NisB, NisC et NisT forment un complexe transitoire associé à la membrane cytoplasmique. NisA associé à NisBC est livré à NisT pour être transporté à l'extérieur de la membrane plasmique, puis clivé au niveau du peptide leader par NisP, libérant la nisine active (3,6).

En plus de son activité antibiotique, la nisine est associée à la communication bactérienne interspécifique via le QS, ce qui permet l'auto-induction de sa biosynthèse (4,5). Les gènes *nisRK* sont exprimés de façon constitutive et lorsque la population s'accroît, la nisine s'accumule dans l'environnement et se lie au senseur histidine-kinase NisK. NisR phosphorylé

permet la régulation de l'expression des opérons *nisABTCIP* et *nisFEG* amplifiant la production de la nisine et celle de son système d'immunité. L'inducteur initial de la nisine serait un composant de la voie de dégradation du galactose (5,55) (Fig. 12).

Afin de se protéger contre l'action de son propre antibiotique, *L. lactis* produit le transporteur NisFEG et la lipoprotéine NisI, qui sont nécessaires pour obtenir une immunité totale. Le complexe NisF₂EG (54) expulse la nisine de la membrane cytoplasmique vers l'environnement alors que NisI séquestre la nisine du côté extracytoplasmique de la membrane. Ensemble, NisFEG et NisI empêchent la nisine de s'insérer dans la membrane et/ou de former un pore (56) (Fig. 12).

iii. Exemple des méthanobactines

Sur la base d'une analyse phylogénétique, les opérons des Mbn ont été divisés en cinq groupes en fonction des enzymes de biosynthèse impliquées, où les Mbn des méthanotrophes sont classées dans les groupes I et II (IIa et IIb) et celles des non-méthanotrophes sont classées dans les groupes III, IV et V (33,34,53) (Fig. 13A et Fig. 13B). Tous les opérons Mbn codent pour un précurseur RiPP MbnA et un complexe enzymatique hétérodimérique fer-dépendant MbnBC générant des groupes oxazolones thioamides.

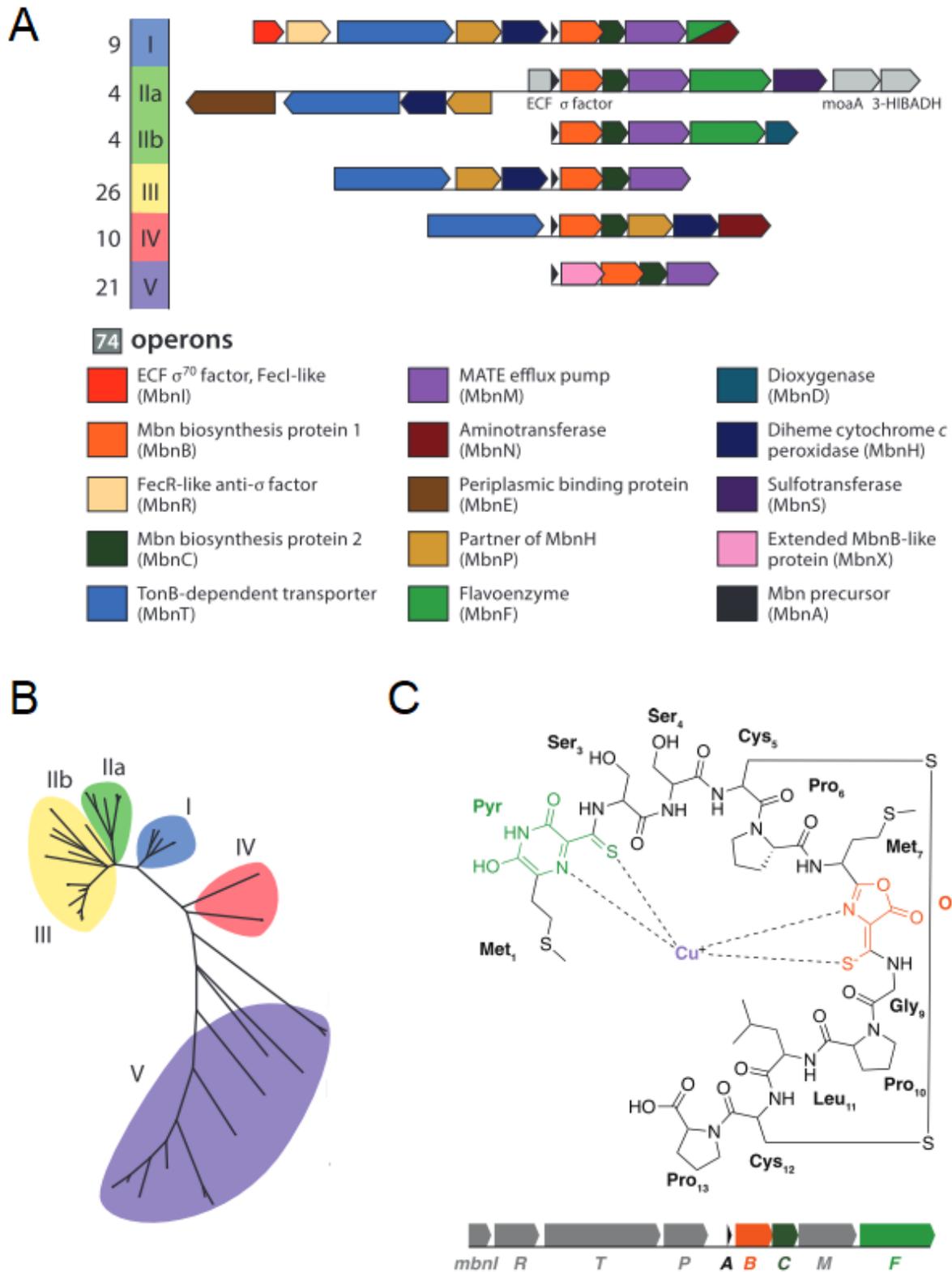


Figure 13. Opérons méthanobactines (Mbn) (35,53). (A) Schémas des opérons Mbn pour les 5 groupes. (B) Arbre phylogénétique des séquences de MbnB définissant les groupes d'opérons Mbn. (C) Exemple de structure prédite pour la Mbn du groupe I de *Methylosinus* sp. LW3. Les gènes biosynthétiques et les modifications correspondantes sont représentés en couleur : MbnB est impliqué dans la formation d'oxazolone thioamide (orange) et MbnF le serait dans la formation de pyrazinedione thioamide (vert). Illustration adaptée de Park et al. (2021) et de Kenney et al. (2018).

Selon les groupes de méthanobactines, des enzymes supplémentaires sont impliqués dans d'autres modifications (Fig. 13C), comme des aminotransférases (MbnN), oxido-réductases (MbnF), sulfotransférases (MbnS) et dioxygénases prédites. Enfin, MbnX est une enzyme MNIO lointainement apparentée à MbnB (section Introduction. I. 2. b. ii. MNIO).

En prime de la diversité apportée par les différentes enzymes de biosynthèses, le peptide core de MbnA possède une hétérogénéité de séquence d'acides aminés, au sein des groupes et entre les groupes. Bien que les acides aminés suivant les Cys modifiables sont généralement conservés (Gly/Alanine(Ala)/Ser et Ser/Thr), le nombre et l'espacement entre les Cys modifiables et la composition globale en acides aminés sont très variables (35,53). En plus des modifications apportées à certaines Cys, d'autres restent non modifiées et sont disponibles pour former des liaisons disulfures (53).

Certains groupes de Mbn partagent d'autres gènes codant pour des protéines liées au transport, à la régulation et à d'autres fonctions. Le gène *mbnT* code pour un TBDT impliqué dans l'internalisation de Mbn-Cu, les gènes *mbnIR* pour un système de régulation sigma/anti-sigma (σ /anti- σ), le gène *mbnE* pour une protéine de liaison périplasmique (PBP), et le gène *mbnM* pour une pompe à efflux MATE potentiellement impliqué dans la sécrétion de la méthanobactine (33,35,53). Après que la méthanobactine soit importée dans le périplasma par MbnT, elle est prise en charge par la protéine de liaison MbnE, associée à un transporteur ABC. Bien que seuls les opérons Mbn du groupe IIa codent *mbnE*, des homologues sont retrouvés ailleurs dans les génomes d'autres producteurs de Mbn (34,53). Enfin, MbnH est un membre de la famille des cytochromes *c* peroxydases dihèmes. Elle oxyde un résidu Trp en résidu kynurénine dans la protéine MbnP, rendant cette dernière capable de lier le Cu. MbnP aurait un rôle dans l'homéostasie du Cu, le libérant à partir de la Mbn et régulant sa disponibilité (53,57). En plus du système σ /anti- σ MbnIR impliqué dans la régulation de la Mbn, les opérons Mbn et sMMO chez *M. trichosporium* OB3b sont corégulés par le « copper switch » (section Introduction. I.1.d. méthanobactines) (Fig. 13A).

Les Mbn des bactéries non méthanotrophes restent encore peu étudiées (4). Les opérons Mbn des groupes III et IV se trouvent à proximité de gènes impliqués dans l'homéostasie du Cu : des protéines de liaison au Cu périplasmiques CopC, des importateurs de Cu de la membrane interne CopD, des protéines impliquées dans l'assemblage du site CuA de la cytochrome *c* oxydase. Chez certaines espèces de *Pseudomonas*, une ATPase de type P qui serait impliquée dans l'importation de Cu a été identifiée malgré l'absence de besoin spécifique chez les non-méthanotrophes (53). En revanche les précurseurs des Mbn du groupe V n'ont qu'une Cys. Leur fonction est inconnue.

d. Reconnaissance du précurseur

Chez la plupart des RiPPs, le précurseur est constitué d'un peptide core hypervariable et d'un peptide de reconnaissance leader ou follower qui est éliminé après l'introduction des modifications post-traductionnelles (2). Un motif conservé nécessaire pour la reconnaissance du peptide leader permet aux enzymes de modification d'être spécifiques à un précurseur tout en restant actives sur des séquences cores plus variables. Par exemple, chez les lanthipeptides, les cyanobactines ou les peptides-lasso, il existe plusieurs précurseurs partageant des peptides leader conservés mais se différenciant par des peptides centraux distincts modifiés par un même ensemble d'enzymes pour donner des structures diverses (58).

i. RiPP precursor peptide recognition element (RRE)

Dans plus de 50% des classes RiPP procaryotes, les séquences leader peuvent être reconnues par des domaines nommés « élément de reconnaissance des peptides précurseurs de RiPP » (RRE), qui sont soit sous forme d'une protéine autonome appelée « RRE discret » (6) ou sous forme fusionnée avec le domaine catalytique d'une des enzymes de modification (58). Ces domaines sont structurellement similaires entre des voies de biosynthèse de RiPPs non apparentés (2,6).

Le domaine RRE se compose de trois hélices α ($\alpha 1$ à $\alpha 3$) et de trois brins β ($\beta 1$ à $\beta 3$) dans un motif ailé hélice-coude-hélice (winged helix-turn-helix wHTH) qui en liant le peptide leader guiderait le peptide core jusqu'au site actif (2,6) (Fig. 14). Les RRE sont seulement retrouvés associés aux enzymes de modification des RiPPs et sont absents chez des homologues non impliqués dans leur biosynthèse : c'est le cas des enzymes rSAMs et les enzymes de type E1. De plus, les domaines RRE sont absents des enzymes de modification qui interviennent après le clivage du peptide leader (2).

Le peptide leader des précurseurs des lanthipeptides de classe I contient un motif F-D/N-L-N/D hautement conservé. Dans la biosynthèse de la nisine, ce motif de NisA est reconnu par un domaine wHTH de NisB via la formation d'un feuillet β antiparallèle avec le brin $\beta 3$, et l'insertion des résidus Phénylalanine (Phe) et Leu du motif FNLD dans une poche hydrophobe formée par des résidus de l'hélice $\alpha 3$ du domaine RRE de NisB. Ces contacts hydrophobes sont observées de façon assez générale pour les peptides leader (6).

Pour les RRE sous forme discrète, le modèle de contacts hydrophobes est le même. Des résidus Tyr, Proline (Pro) et Leu conservés dans un motif YxxPxL du leader sont importants pour la reconnaissance du précurseur en se plaçant dans les poches hydrophobes formées entre le brin $\beta 3$ et les hélices α (6). C'est l'exemple de la cyclodéshydratase YcaO BalhD

impliquée dans l'installation d'hétérocycles azolines chez un RiPP de *Bacillus* sp. Al Hakam, où *balhC* code pour une protéine E1-like portant un domaine RRE discret.

Etant donné la diversité des protéines et des voies de biosynthèse, les mécanismes d'interaction entre les précurseurs et les enzymes de modification peuvent aussi varier. Chez la microcine C (section Introduction. I. 1. Microcine C), le peptide précurseur de 7 acides aminés MccA, l'un des plus courts connus, est dépourvu de peptide leader et utilise un mécanisme de reconnaissance alternatif. L'adénylyltransférase MccB interagit via son domaine RRE avec les acides aminés N-terminaux de MccA comme une « pince peptidique » et est plus affine pour la forme N-formylée du précurseur (2,6).

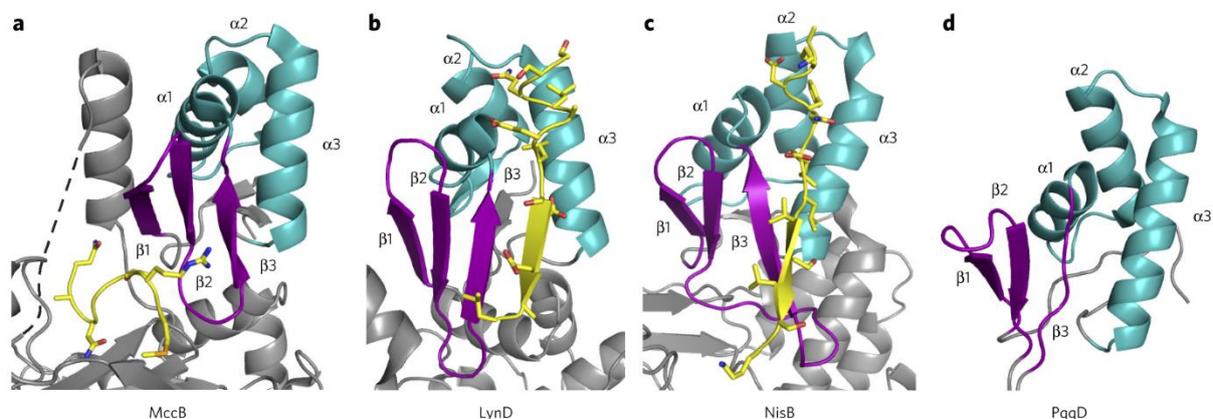


Figure 14. Comparaison structurelle de quatre enzymes modifiant les RiPPs (2). Pour la biosynthèse de la microcine C7, le RRE (hélices α en cyan et feuillets β en violet) est fusionné avec l'enzyme adénylante MccB. Pour la biosynthèse des cyanobactines, le RRE est fusionné avec une cyclodéhydratase LynD. Pour la biosynthèse de la nisine, le RRE est fusionné avec la déshydratase NisB. Pour la biosynthèse de la pyrroloquinoline quinone (PQQ), le RRE est sous forme discrète : il s'agit de PqqD, un cofacteur de la déshydrogénase PqqE. Le peptide précurseur est représenté en jaune.

Chez les streptides, l'enzyme rSAM catalysant la liaison croisée Lysine(Lys)-Trp, SuiB, ne se lie pas au précurseur SuiA par le RRE mais par son site catalytique. Cependant, le peptide leader de SuiA possède un motif L-E-S-S conservé dont le résidu Glu forme une liaison H avec une Arg du RRE de SuiB, afin d'orienter le peptide core dans le site actif pour la catalyse (6) (Fig. 15).

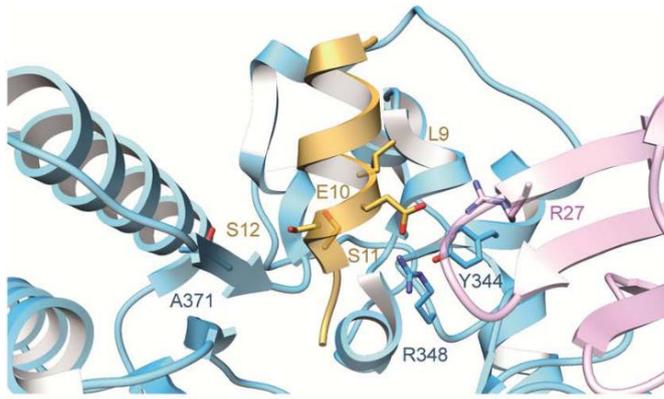


Figure 15. Structure cocrystalline des interactions qui médient la liaison entre SuiA et SuiB (6). SuiA (orange) n'interagit pas de façon antiparallèle avec le RRE de SuiB (rose) mais avec une autre région de SuiB (bleu).

Un exemple assez différent des deux premiers est la biosynthèse de la microcine B17 où le précurseur McbA est reconnu par un complexe McbB₂CD. Les monomères de McbB sont en conformation tête-à-queue où la disposition permet à chaque sous-unité d'avoir des fonctions différentes. Le RRE du premier monomère McbB interagit de façon classique avec les résidus Phe et Leu du peptide leader en formant un feuillet β antiparallèle, et le deuxième monomère interagit avec les résidus Asp et Lys du peptide leader par des ponts salins (6).

ii. Autres systèmes de reconnaissance

Le mécanisme de reconnaissance des peptides leader de nombreuses classes de RiPPs reste inconnu, car certains systèmes n'ont pas de RRE détectable. Aucun autre mécanisme de reconnaissance commun n'a été trouvé (6).

Chez la haloduracine (lanthipeptide de classe II), les boucles non structurées de l'enzyme HalM2 se lient directement au peptide leader du précurseur HalA2. Chez la globisporine (lanthipeptide de classe IV), le domaine kinase de SgbL, une lanthipeptide synthétase trifonctionnelle, se lie à une hélice α amphipathique du peptide leader du précurseur SgbA.

Chez la microviridine J le motif conservé PFFARFL du leader peptide du précurseur MdnA s'associe sous forme d'hélice α à la région hélicoïdale du domaine central de l'enzyme MdnC par des interactions électrostatiques (6).

Chez certaines classes de RiPPs, notamment les cyclotides, les amatoxines et les cyanobactines, le précurseur présente plusieurs peptides cores et plusieurs séquences de reconnaissance. L'amatoxine cyclase interagit avec six acides aminés C-terminaux conservés du peptide follower, empêchant l'hydrolyse ou l'entrée d'un autre peptide dans le site actif et permettant d'obtenir plusieurs produits RiPPs cyclisés (6).

Même si la reconnaissance du précurseur par les enzymes de modification nécessite dans la plupart des cas une reconnaissance du peptide leader, ce n'est pas une règle absolue. Par exemple, chez les lasso-peptides, les enzymes sont guidées par la complémentarité stérique avec leur substrat (58). La reconnaissance précurseur-enzyme peut être totalement indépendante d'un peptide leader, comme chez les thiopeptides où la séquence de reconnaissance est formée lors d'étapes de biosynthèse précédentes. Enfin, le RRE, en plus d'un rôle de reconnaissance, pourrait avoir un rôle de livraison du précurseur vers une peptidase. De plus, dans les voies de biosynthèse où plusieurs enzymes de modification agissent successivement sur le précurseur, le RRE pourrait soit servir à retenir le précurseur pour toutes les autres enzymes, soit être un système de reconnaissance mis en place pour une seule enzyme parmi d'autres systèmes (6).

3. Fonctions des RiPPs

En plus de la diversité de leurs structures et de leur biosynthèse, les RiPPs présentent une diversité de fonctions, en particulier chez les bactéries (4). Leurs interactions sociales et environnementales, qu'elles soient antagonistes ou coopératives, sont très répandues et jouent un rôle majeur dans l'évolution. Certaines de ces interactions impliquent la production des RiPPs et leur utilisation dans la compétition, la communication, les interactions avec un hôte et la physiologie comme le développement de la vie multicellulaire, le cannibalisme et l'acquisition de métaux (4).

a. Fonction dans la compétition

Parmi les différents rôles des RiPPs, la fonction la plus étudiée est la compétition microbienne. Il existe deux catégories principales de compétition : la compétition d'exploitation et la compétition d'interférence. La compétition d'exploitation est une compétition indirecte qui implique l'appauvrissement d'un environnement où les organismes sont en concurrence pour une ressource. La concurrence pour le Fe est un exemple de compétition d'exploitation. La compétition d'interférence est une compétition directe où les organismes s'attaquent directement par la production de molécules antimicrobiennes. Elle fait intervenir des peptides antimicrobiens ciblant des processus cellulaires clés comme la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction, ou en interagissant avec l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (4) (Fig. 16). La production de bactériocines et de microcines est un exemple de compétition d'interférence (1).

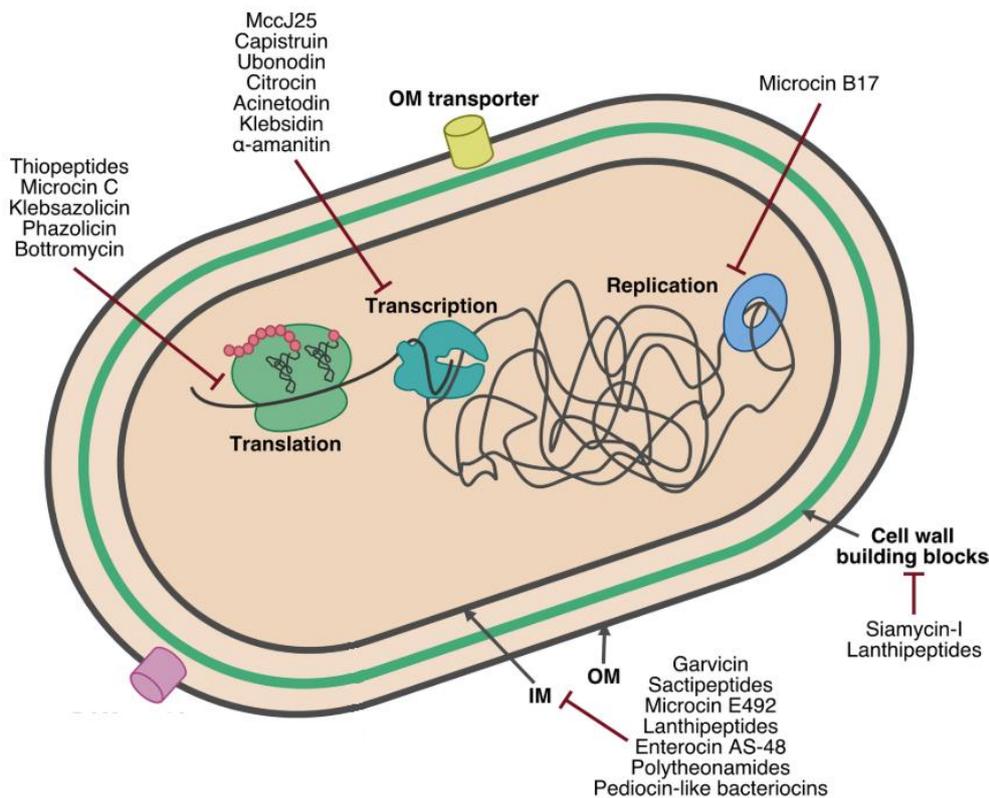


Figure 16. Les différentes cibles des RiPPs impliqués dans la compétition (10). De nombreux RiPPs sont actifs sur la membrane chez les bactéries Gram – et Gram +. D'autres RiPP ciblent les processus centraux comme la transcription et la traduction de l'ADN. Abréviations : OM, outer membrane ; IM, inner membrane. Schéma adapté de Cao et al. (2021).

i. Compétition d'exploitation et d'interférence, l'exemple des peptides sidérophores

Dans de nombreux environnements, la concentration en Fe libre est très faible. C'est pourquoi certaines bactéries sécrètent des sidérophores, des petites molécules chélatrices de Fe, qui permettent à la fois son acquisition et une limitation de sa disponibilité pour les concurrents (4,59).

Les peptides sidérophores (60) sont composés d'un peptide linéaire et d'un sidérophore attachés par l'intermédiaire d'un β -D-glucose. Ces peptides, dont les modifications post-traductionnelles sont nécessaires pour une activité in vivo efficace, imitent certains sidérophores comme l'entérobactine et la salmochéline (28).

Les microcines M et H47 et la microcine E492 permettent de limiter les concentrations en Fe en concurrençant les sidérophores produits par les organismes antagonistes (4,59). En plus, elles sont utilisées pour la compétition d'interférence et ont notamment une activité antimicrobienne contre *Salmonella* et *Escherichia* (4,28). Elles pénètrent les bactéries via le système de récepteur de sidérophore de la membrane externe et le système de transport de la membrane interne (16). Ces peptides sidérophores provoquent la mort cellulaire en s'insérant dans la membrane interne, induisant la formation d'un pore et perturbant la force proton-motrice (28).

ii. Compétition d'interférence : les RiPPs ciblant l'enveloppe cellulaire

L'enveloppe cellulaire, plus particulièrement certains intermédiaires de la biosynthèse du peptidoglycane sont les principales cibles des RiPPs. L'exemple le plus connu et le plus étudié est le cas de la nisine, qui agit par deux mécanismes : elle se lie au lipide II et le séquestre, mais elle forme aussi des pores entraînant la mort cellulaire. L'interaction entre la nisine et le lipide II est facilitée par la présence des cinq anneaux de (méthyl)lanthionine caractéristiques des lanthipeptides (10,28). Divers autres lanthipeptides ciblent le lipide II (10,28,61), ainsi que certains peptides-lasso (10,62).

Les composants des membranes peuvent également servir de cible. Comme les membranes bactériennes sont riches en phospholipides anioniques, les interactions électrostatiques jouent un rôle important dans l'interaction et la formation des pores médiées par les RiPPs (4). Certains RiPPs ont pour cible les têtes polaires des phospholipides. C'est le cas de l'entérocyne AS-48 (bactériocines cycliques), une molécule amphipathique composée de deux hélices α hydrophiles et trois hélices α hydrophobes. Des études cristallographiques ont montré que les monomères du peptide s'alignent afin d'exposer leur surface hydrophile cationique aux têtes phospholipidiques anioniques, et ces interactions électrostatiques sont à l'origine de la désorganisation de la membrane (3, 6). Les monomères sont ensuite réarrangés afin d'exposer leur surface hydrophobe facilitant l'insertion dans la membrane (10). De plus, l'entérocyne AS-48 agirait par un mécanisme d'électroporation moléculaire : lorsque le peptide se lie à une membrane, sa densité de charge créerait un champ électrique local induisant l'effondrement du potentiel de membrane et la formation de pores (4,63).

La subtilosine A (sactipeptides) est une molécule en épingle à cheveux comportant des résidus hydrophobes concentrés à l'extrémité de la boucle et des résidus hydrophiles à l'extrémité opposée. Elle se lie à la surface de la membrane sans traverser toute la bicouche phospholipidique, induit une modification de l'orientation du groupe de têtes polaires et crée un défaut de perméabilisation local (10,64). Contrairement à l'entérocyne AS-48, la subtilosine A pourrait dépendre de l'interaction avec un récepteur de surface (28,64). L'insertion partielle de la subtilosine A dans les bicouches lipidiques formerait des pores transitoires dans la membrane bactérienne, conduisant à l'efflux d'ATP et à l'épuisement du gradient ionique (pH) transmembranaire (10,16,28).

Un groupe distinct de lanthipeptides est capable de se lier spécifiquement aux phosphatidylethanolamines (PE) dans des complexes 1 :1. Par exemple, l'interaction entre la PE et la cinnamycine va induire un mouvement de « flip-flop » des phospholipides qui implique l'échange de lipides entre le feuillet interne et le feuillet externe, conduisant à la perméabilisation de la membrane (10,28). En plus d'avoir une activité contre les bactéries

Gram-positives, un large éventail d'activités biologiques a été signalé pour ces lanthipeptides de classe II, dont des activités antivirales : par exemple la duramycine inhibe l'entrée cellulaire de certains flavivirus comme les virus du Nil occidental (flavivirus) et de la dengue, et du filovirus d'Ebola. La duramycine pourrait être utilisée comme traitement potentiel de la mucoviscidose car elle induit un efflux de chlorure des cellules de l'épithélium des voies respiratoires par sa liaison aux PE (28).

Enfin, un dernier mécanisme d'attaque de l'enveloppe cellulaire est la formation de canaux membranaires. Les polythéonamides, produits par les bactéries symbiotiques *Entotheonella factor* de l'éponge japonaise *Theonella swinhoei* sont de puissants agents cytotoxiques perturbant l'homéostasie ionique cellulaire et le potentiel membranaire (6). Leur structure en hélice β ressemblant à un ressort et leurs acides aminés inhabituels de nature hydrophobe permettent aux polythéonamides une localisation membranaire et une insertion efficace par l'extrémité N-terminale. Des résultats de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré qu'une seule hélice de polythéonamide est capable de traverser toute la bicouche phospholipidique afin de former un canal ionique à travers lequel différents cations monovalents (H^+ , Cs^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+) peuvent passer (10,65) (Fig. 17).

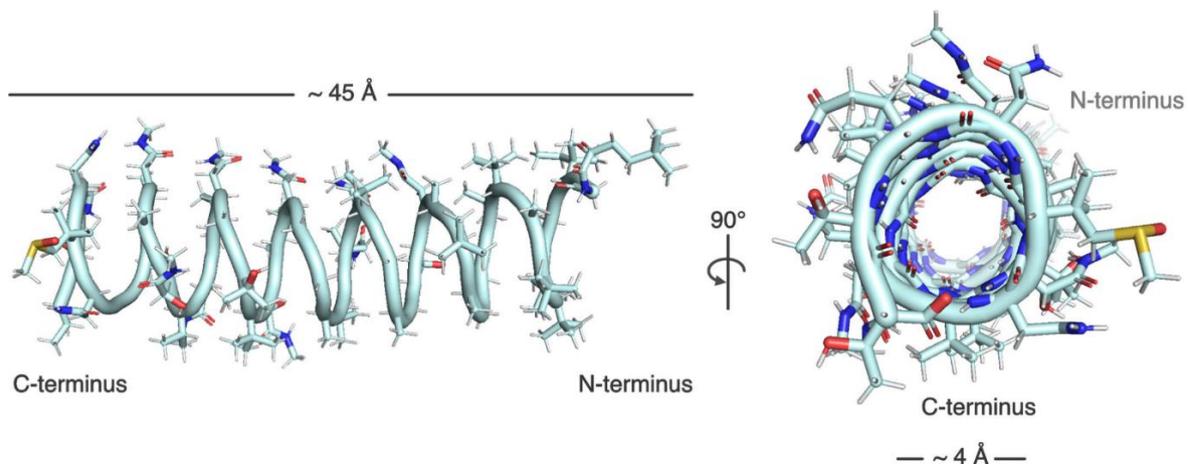


Figure 17. Structure en spirale β du polythéonamide B (présent dans un solvant organique pour imiter l'environnement membranaire) (10). La longueur du polythéonamide B présente une épaisseur similaire à celle d'une membrane plasmique. L'intérieur du polythéonamide B est polaire, permettant le passage de cations tels que le potassium à travers le canal ionique.

iii. Compétition d'interférence : les RiPPs inhibant la transcription

Les procaryotes ne possèdent qu'un seul type d'ARNP, un complexe protéique $\alpha 2\beta\beta'\omega$ qui représente le core de l'ARNP. Pour former une holoenzyme catalytiquement active, le facteur σ s'associe au core pour amorcer la synthèse de l'ARNm en reconnaissant les séquences d'initiation de la transcription, puis il est dissocié du core de l'ARNP pour l'élongation (66). L'ARNP est constitué d'un canal principal, qui permet le passage et la liaison de l'ADN et

contient le site actif d'un canal secondaire qui amène les ribonucléotides triphosphate (rNTP) jusqu'au site catalytique, et d'un canal de sortie de l'ARNm (66,67).

La transcription est ciblée par divers RiPPs, dont des peptides-lasso isolés de protéobactéries à Gram négatif, notamment la microcine J25, la capistruine et la klebsidine (10) (Fig. 16).

Les structures de complexes de la microcine J25 et de la capistruine liées à l'ARNP d'*E. coli* ont été rapportées (4,10,68). La microcine J25 se fixe dans le canal secondaire de l'ARNP et obstrue le passage des rNTP vers le site actif, maintenant l'ARNP dans une conformation inactive (10,28,61,68). La capistruine se lie plus loin du site actif de l'ARNP et bloque stériquement le repliement d'un domaine du canal principal sans interférer avec la liaison du rNTP : on parle de mécanisme d'inhibition partiellement non compétitive (10,68). Ces deux peptides inhibent l'élongation de la transcription en augmentant les pauses (69).

Un exemple de RiPP non bactérien ciblant la transcription est l' α -amanitine produite par les champignons du genre *Amanita*, qui est spécifique de l'ARN polymérase II chez les eucaryotes. En interagissant avec le canal central, elle empêche la translocation de l'ADN et de l'ARN sans obstruer le passage des rNTP vers le site actif. Ce RiPP provoque ainsi la cytolysse des hépatocytes (10,68,70).

iv. Compétition d'interférence : les RiPPs inhibant de la traduction

Dans les ribosomes bactériens la sous-unité 30S assure la reconnaissance des codons de l'ARNm par les anticodons des ARNt complémentaires, et la sous-unité 50S permet la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés apportés par les ARNt chargés (ARNt^{aa}). Le ribosome complet 70S a trois principaux sites actifs : le site A ou de liaison de l'ARNt-aa, le site P ou de liaison du peptidyl-ARNt, et le site E ou de sortie (exit) des ARNt.

Divers intervenants de la traduction sont ciblés par différentes classes de RiPPs. Des structures de deux LAPs liés au ribosome, la klebsazolicine et la phazolicine montrent que ces deux peptides bloquent le tunnel de sortie du ribosome, mais avec des interactions peptide/ribosome différentes. Dans les deux cas, des anneaux thiazoles et/ou oxazoles, forment un empilement π - π avec certaines bases de l'ARN 23S. En obstruant le tunnel de sortie, ces deux peptides arrêtent ainsi la traduction (10,28).

Plusieurs thiopeptides se lient au centre GTPase du ribosome responsable de la liaison et de l'activité des facteurs de traduction lors de l'élongation (16,28). Les structures de complexes entre ces RiPPs et la grande sous-unité ribosomique 50S de *Deinococcus radiodurans* ont été décrits (10,40). La thiostreptone de *Streptomyces azureus* se lie en bloquant stériquement l'accès du facteur d'élongation EF-G, empêchant la translocation le long de la matrice de

l'ARNm (16,28). Alors que la thiostreptone augmente le taux de dissociation du GTP, ralentissant ainsi son hydrolyse, la micrococcine P1 facilite la dissociation du GDP de l'EF-G, augmentant par la suite le taux d'hydrolyse du GTP. Dans les deux cas, la translocation et la synthèse des protéines sont inhibées (10,28).

Un autre déterminant de la traduction qui constitue une cible pour les RiPPs sont les 20 aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS), qui catalysent la liaison des acides aminés aux ARNt correspondants. La liaison de l'acide aminé à l'ARNt est catalysée en deux étapes : l'acide aminé est activé pour former un aminoacyl-adénylate avec l'ATP, libérant du pyrophosphate, et l'ARNt subit une attaque nucléophile libérant l'AMP et générant l'ARNt-aa (39). L'aspartyl tRNA synthétase (AspRS) est ciblée par la micrococcine C, un heptapeptide dit « cheval de Troie » de par son activation dépendante d'un clivage protéolytique dans la cellule cible (10,39). Une fois à l'intérieur de la bactérie cible, la micrococcine C est progressivement digérée dans le sens N vers C-terminal jusqu'à la liaison peptidique reliant l'Ala et l'Asp, puis libérée sous sa forme toxique, un analogue non hydrolysable de l'intermédiaire aspartyl-adénylate qui perturbe la charge de l'ARNt et conduit à l'inhibition de la synthèse des protéines (10,39).

b. Fonction dans la communication

Bien que la plupart des RiPPs décrits sont utilisés dans la compétition, certains sont impliqués dans la communication. Afin de coordonner leurs traits sociaux, les bactéries Gram-positives utilisent une stratégie de QS qui implique la production, la diffusion et la perception de RiPPs. Il existe trois catégories de RiPPs en relation avec le QS : les RiPPs produits sous forme de peptides auto-inducteurs qui ne régulent que leur propre production, ceux produits sous forme de peptides phéromones qui régulent des aspects physiologiques et ceux qui sont régulés par d'autres molécules du QS (4).

i. Les RiPPs ne régulant que leur propre production

Les lanthipeptides sont une classe où est fréquemment observé le phénomène d'auto-induction, afin de coordonner leur production et d'obtenir une concentration efficace dans l'environnement. L'inducteur initial, quand il est connu, diffère : la production initiale de la cytolysine est déclenchée par la présence de cellules eucaryotes, et celle de la microbisporicine et de la planosporicine par la limitation des nutriments (4,55,71).

L'auto-induction est hautement spécifique du lantibiotique. Ainsi, la subtiline est capable d'activer le système à deux composants SpaRK mais incapable d'activer NisRK et à l'inverse, la nisine est capable d'activer NisRK mais incapable d'activer SpaRK (28,71). Chez ces RiPPs,

les résidus impliqués dans l'activité antibactérienne diffèrent de ceux impliqués dans la signalisation.

À l'heure actuelle, les détails moléculaires de l'induction de la mersacidine, de la microbisporicine et de la planosporicine sur leur propre biosynthèse ne sont pas connus (4,28).

ii. Les RiPPs régulant des aspects physiologiques

Les AIP (section Introduction. I.1.d. AIP) dérivés du système agrABCD (section Introduction. I.2.c.i), les phéromones GBAP (gelatinase biosynthesis-activating pheromone) et ComX sont tous trois impliqués dans le contrôle de la production de facteurs de virulence et la formation de biofilms chez plusieurs pathogènes (4,28).

Chez *E. faecalis*, le système Fsr (Fig. 18A) régule l'expression de son propre opéron codant la biosynthèse des phéromones GBAP en amplifiant le signal QS, ainsi que l'expression des gènes de la gélatinase GelE et de la sérine protéase SprE. GelE hydrolyse des protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte et est impliquée dans la formation de biofilms en activant l'autolysine, et SprE est aussi impliquée dans la pathogénèse chez l'animal, la plante et l'insecte. Le système QS Fsr est aussi impliqué dans la régulation négative et indirecte d'environ 75 autres gènes, codant des protéines de surface, des protéines jouant un rôle dans le développement du biofilm, dans l'autolyse et dans l'adhésion au collagène, et des gènes liés aux voies métaboliques (72).

Chez *B. subtilis*, la biosynthèse des phéromones ComX est organisée en opéron *comQXPA* (Fig. 18B), codant respectivement une isoprényltransférase, le précurseur RiPP, un senseur histidine-kinase et un régulateur de réponse (4,16,28). Le système ComX régule l'expression de son propre opéron et l'expression de gènes présents dans les opérons *sfrA* et *degQ*, impliqués dans la compétence, le développement de biofilms et la sporulation. Des mécanismes complexes favorisent la sporulation dans une sous-population de bactéries au cours des premiers stades de la croissance du biofilm. Dans ce contexte, les phéromones ComX agissent comme un signal positif pour la sporulation précoce, coordonnant la différenciation en différentes sous-populations ainsi que l'entrée dans des états de compétence naturelle, importants pour l'établissement dans une niche et la survie (28,73).

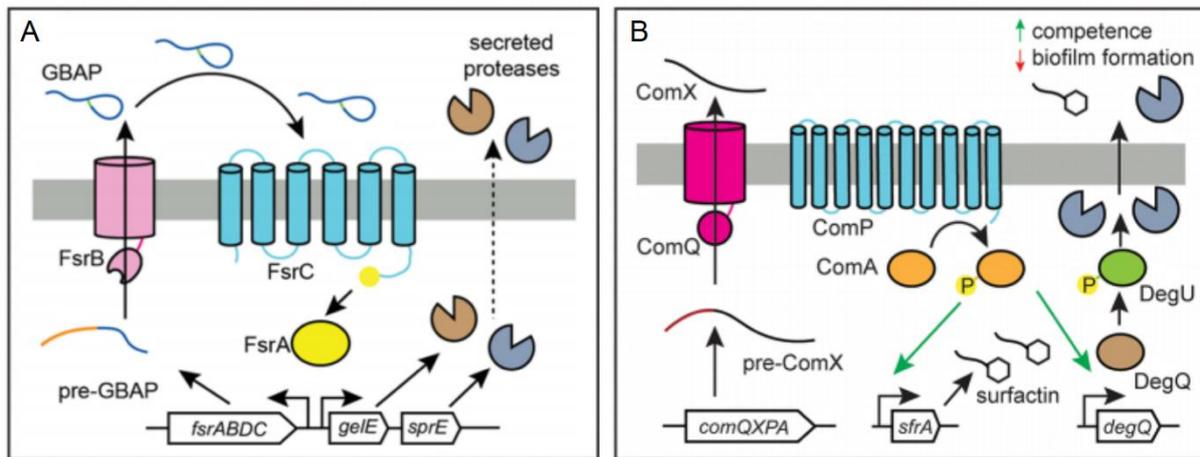


Figure 18. Représentation schématique des voies de signalisation de (A) FsrA et de (B) ComX (28). Les peptides précurseurs sont synthétisés avec le peptide leader (orange/rouge), modifiés et exportés dans l'environnement. Les phéromones GBAP activent la phosphorylation de FsrA médiée par le récepteur FsrC, activant l'expression de la biosynthèse de protéases. Les phéromones ComX activent la phosphorylation de ComA médiée par le récepteur ComP, activant l'expression de la biosynthèse de la surfactine et de protéases.

iii. Les RiPPs régulés par d'autres molécules du QS

Les RiPPs régulés par le QS les plus connus sont un lanthibiotique produit par *S. pneumoniae* et un streptide produit par *S. thermophilus* (4). L'exemple développé est celui du lanthibiotique de *S. pneumoniae*, dont la biosynthèse est régulée par le système de QS TprA/PhrA (4,74). En présence de galactose, le sucre principal du nasopharynx humain, le peptide Phr mature est sécrété, puis transporté dans la bactérie cible par une perméase oligopeptidique (Opp) lorsqu'il atteint une concentration seuil. Il inactive alors la protéine inhibitrice TprA, ce qui induit l'expression des gènes de la biosynthèse du lanthibiotique. Celle-ci est ainsi contrôlée à la fois par des signaux de densité cellulaire et des signaux nutritionnels, permettant la compétition de *S. pneumoniae* pour l'espace et les ressources lors de la colonisation du nasopharynx.

c. Fonctions dans les interactions avec un hôte

Peu de choses sont décrites sur le rôle des RiPPs dans les interactions bactéries-hôte. Actuellement, le seul exemple est le peptide RaxX appartenant aux sulfatyrotides, produit par le phytopathogène du riz, *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (4,6,28). RaxX fait partie d'une grande famille de RiPPs bactériens et végétaux avec une Tyr sulfatée, tels que le facteur Nod fixateur d'azote chez *Sinorhizobium meliloti*, le sulfolipide de *Mycobacterium tuberculosis* et l'hormone PSY1 chez *Arabidopsis* (4,28). Ces molécules sulfonées sont impliquées dans les communications entre les hôtes eucaryotes et les bactéries, symbiotes ou pathogènes (4). La structure de RaxX imite l'hormone peptidique végétale PSY1, induisant la croissance chez *Arabidopsis* et le riz. *X. oryzae* utilise donc cette stratégie de promotion de la croissance

(bactériose), reprogrammant les processus cellulaires de l'hôte pour obtenir les nutriments nécessaires à sa survie (6,28). Cependant, des résistances à la bactériose induite par ce pathogène ont été recensées chez des souches de riz. Le récepteur histidine kinase XA21 des cellules végétales est capable de reconnaître RaxX et pas PSY1, et déclenche alors la réponse immunitaire, supprimant l'infection chez le riz (4,6,28).

Bien qu'aucune étude n'ait montré leur rôle dans les interactions hôte-bactérie, les polythéonamides (section Introduction. I.1.d. protéusines) produits par un symbiote d'éponge, et les cyanobactines (section Introduction. I.1.d. cyanobactines) produites par des symbiotes de tuniciers, pourraient jouer un rôle dans la symbiose (4).

d. Fonctions dans la physiologie

i. Rôle dans le développement de la vie multicellulaire

Le développement du mode de vie multicellulaire peut se manifester par la formation de biofilms, de corps fructifères ou de différences morphologiques. Plusieurs familles de RiPPs, antimicrobiennes ou non, sont impliquées dans la formation de biofilms en étant des molécules de signalisation (4).

Les bactéries du genre *Streptomyces* présentent un cycle de vie complexe. A partir d'un mycélium végétatif, ces bactéries se différencient en formant des hyphes aériens dont dépend la capacité de sporulation (Fig. 19). L'émergence des hyphes aériens implique la perception et la transduction de signaux intracellulaires et environnementaux par une cascade de signalisation qui inclut notamment un lanthipeptide, SapB (75,76).

Chez *S. coelicolor*, SapB est amphiphile et s'auto-assemble à la surface des bactéries, permettant la réduction de la tension superficielle (activité biosurfactante) à l'interface entre la colonie et l'air, et favorisant ainsi l'émergence des hyphes aériens nouvellement formés (28,75).

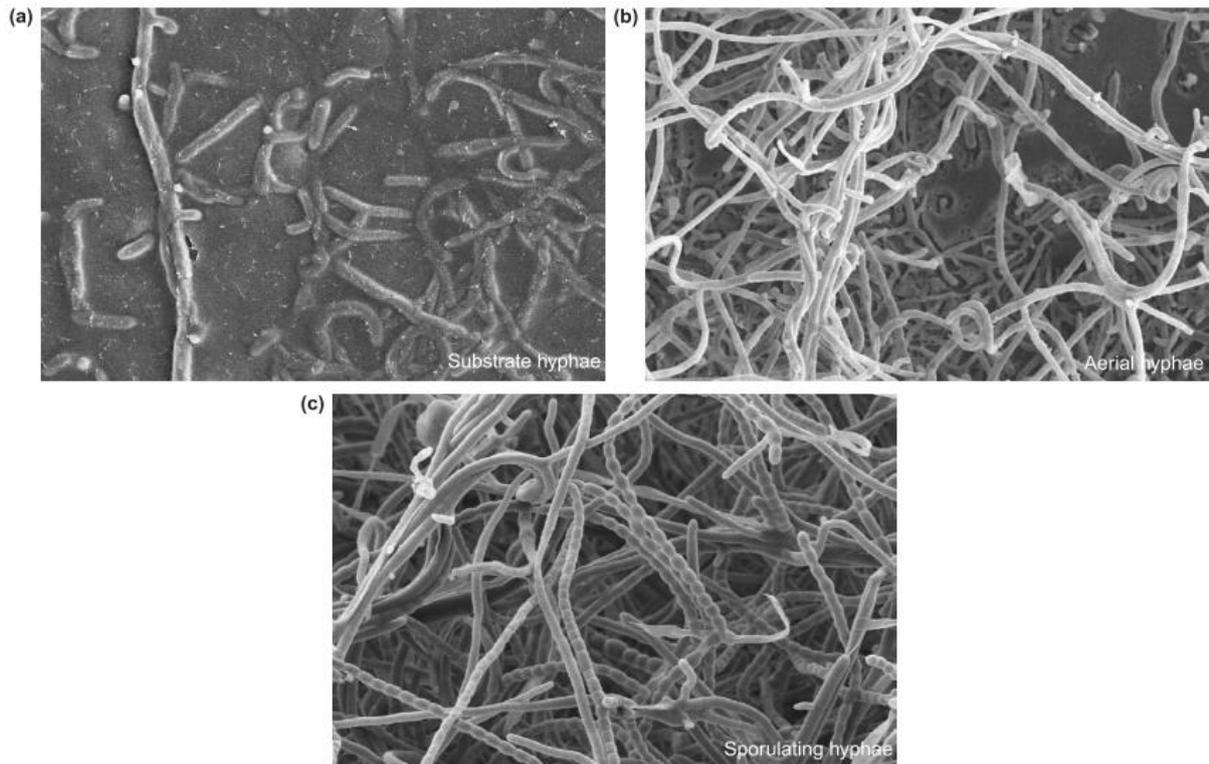


Figure 19. Cycle de vie des streptomycètes cultivés sur milieu solide (76). Dans un premier temps, le mycélium filamenteux colonise son substrat (a) puis se différencie en formant des hyphes aériens (b) avant de former des spores (c). Figure adaptée de Claessen et al. (2006)

Ce type de lanthipeptides pourrait même déclencher l'initiation des signaux nécessaires à la morphogénèse, encore inconnus. En effet, les hyphes se retrouvent émergés du milieu aqueux que forme la colonie et détectent les changements de conditions environnementales locales (eau, pression, molécules) qui pourraient être à l'origine de la signalisation morphogénétique.

ii. Rôle dans le cannibalisme

Le cannibalisme chez les bactéries consiste à produire et à utiliser un peptide antimicrobien contre une sous-population distincte dans la même espèce, au profit de l'ensemble de la communauté (4,10,28). De manière générale, la présence de sous-populations caractérisées par des profils d'expression génétique différents est utile pour deux stratégies évolutives distinctes. La première stratégie, appelée « division du travail », se base sur la production d'un composé par une petite partie de la population et sa mise à disposition à toute la communauté, afin de réduire les coûts énergétiques de production. La deuxième stratégie, appelée « couverture des paris », se base sur la division de la population afin de maximiser les chances qu'au moins une sous-population soit adaptée à un environnement changeant et donc de minimiser les risques d'extinction (77).

Le seul exemple connu de RiPP impliqué dans le cannibalisme est le facteur SKF, un sactipeptide produit par *B. subtilis* (4,10,28). Dans des conditions limitantes en nutriments, *B. subtilis* lance un programme de différenciation afin d'obtenir deux sous-populations distinctes, une sporulante et une non-sporulante (4,77). En réponse à de nombreux signaux extra- et intracellulaires, le régulateur Spo0A est activé par phosphorylation (28). Le régulon Spo0A présente environ 120 gènes activés de façon dépendante du taux de phosphorylation de Spo0A (Spo0A-P). Lors de la division en sous-populations initiée par le manque de nutriments, la distribution des niveaux de Spo0A-P se fait de manière hétérogène. Lorsque le niveau de Spo0A-P atteint un premier seuil dans une des sous-populations, celui-ci active l'expression des opéron *skf* et *sdp*, entraînant respectivement la production de la toxine cannibale SKF et d'une protéine sécrétée retardant la sporulation (SDP), ainsi que des gènes précoces de la sporulation : ce sont les sporulantes (10,28,77). Les opérons *skfABCEFGH* et *sdpABCRI* codent la biosynthèse de 2 RiPPs et des protéines d'immunité (77) (Fig. 20).

Alors que la sous-population sporulante ou « cannibale » qui produit les facteurs extracellulaires SKF et SDP est protégée par les mécanismes de résistance correspondants, les bactéries non-sporulantes et non-productrices sont tuées par lyse. Cette lyse libère des nutriments qui vont retarder le processus de sporulation, car il est énergivore et rend plus difficile la reprise de la croissance lorsque les nutriments redeviennent disponibles (4,10,28,77) (Fig.20).

Bien que le terme « cannibalisme » désigne un mécanisme d'interaction intra-espèce, les facteurs SKF et SDP chez *B. subtilis* pourraient également avoir une implication plus large dans des interactions inter-espèces (4,77). Par exemple, la toxine SDP inhibe aussi la croissance d'autres Firmicutes. Cette toxine est aussi impliquée dans la survie de *B. subtilis* dans des communautés de biofilms car elle est capable d'inhiber, en coopération avec la surfactine, la formation de biofilm de *Bacillus simplex* à des concentrations tolérées par les biofilms de *B. subtilis* (77).

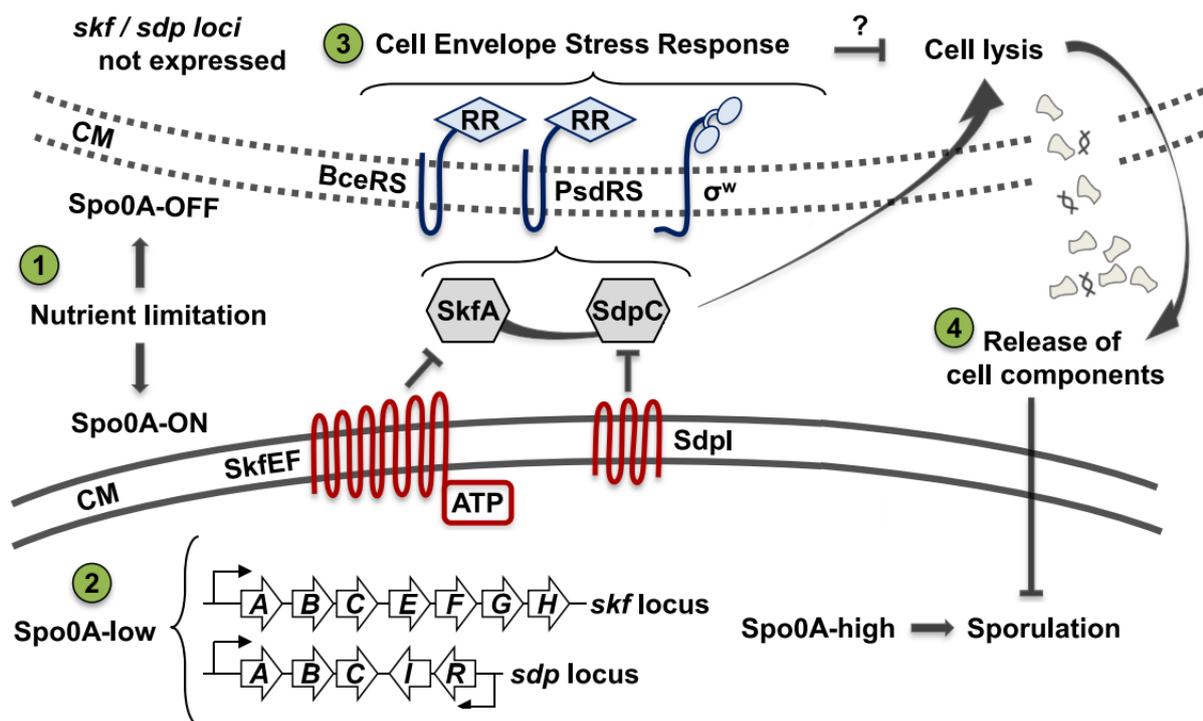


Figure 20. Schéma du concept du cannibalisme chez *B. subtilis* (77). Dans des conditions limitantes en nutriments (1), *B. subtilis* se divise en deux sous-populations distinctes : Spo0A-ON et Spo0A-OFF. Les bactéries Spo0A-ON sporulantes produisent à des faibles niveaux de Spo0A (2), des toxines cannibales SKF, SDP et les systèmes d'immunité associés (SkfEF et Sdpl). Les bactéries Spo0A-OFF non sporulantes qui ne produisent pas ces systèmes perçoivent SkfA et SdpC par les systèmes à deux composants Bce et Psd, déclenchant une réponse au stress d'enveloppe (3). Les bactéries Spo0A-OFF sont lysées, libérant des nutriments pour les bactéries Spo0A-ON et empêchant la sporulation des bactéries Spo0A-ON (4). Abréviations : CM, membrane cytoplasmique. Schéma adapté de Popp et al. (2019).

iii. Rôle dans l'acquisition du cuivre

Le maintien de l'homéostasie physiologique des métaux, que ce soit pour l'acquisition ou pour la tolérance, est essentiel à la survie des bactéries. Le Cu est utilisé comme cofacteur par plusieurs enzymes essentielles (cytochrome oxydases, superoxyde dismutase, NADH déshydrogenase-2 (ND2) etc.). Diverses protéines homéostatiques sont impliquées dans la chélation et l'élimination de l'excès de Cu (les métallochaperones, les protéines métallo-régulatrices, les ATPases de type P1B et les antiporteurs proton/substrat) (33).

Peu de choses sont connues concernant l'acquisition du Cu par les bactéries (33). Contrairement à l'acquisition du Fe par les sidérophores qui semble uniquement faite par des produits peptidiques non ribosomiques, des RiPPs (méthanobactines, sections Introduction I.1.d. I.2.b.ii et I.2.c.iii) sont connus pour être impliqués dans l'acquisition du Cu (4,10). Bien que les Mbn soient retrouvées chez des bactéries méthanotrophes et des bactéries non méthanotrophes, ce sont chez les premières que ces systèmes d'acquisition de Cu sont les

mieux compris (33,53). La production des Mbn par les méthanotrophes est particulièrement importante pour répondre aux besoins élevés en Cu de la pMMO nécessaire à l'oxydation enzymatique du méthane (4,33). La chélation du Cu par les Mbn, qui confère à la Mbn une grande stabilité et une rigidité conformationnelle, se fait via deux groupes oxazolone thioamides ou via un groupe pyrazinedione thioamide et un groupe oxazolone thioamide (section Introduction. 1.2.c.iii) (4,35). Des études de spectrométrie photoélectronique X (X-ray photoelectron, XPS), d'absorption des rayons X (X-ray absorption, XAS) et de résonance paramagnétique électronique (Electron paramagnetic resonance, EPR) ont montré que les Mbn coordonnaient un seul ion de Cu^+ par deux atomes d'azote et deux atomes de soufre (33). Etant donné que les Mbn des groupes IIb et V sont respectivement dépourvues d'un deuxième motif de modification de Cys ou d'une Cys, le Cu ne peut pas se lier via les modifications dérivées de ce résidu. Cependant, d'autres acides aminés pourraient être modifiés et fournir un ou plusieurs site de liaison au Cu (53). Ces variations structurelles dans la composition en acides aminés et en modifications post-traductionnelles vont donc influencer l'affinité des Mbn pour le Cu (4,33) (Fig. 21).

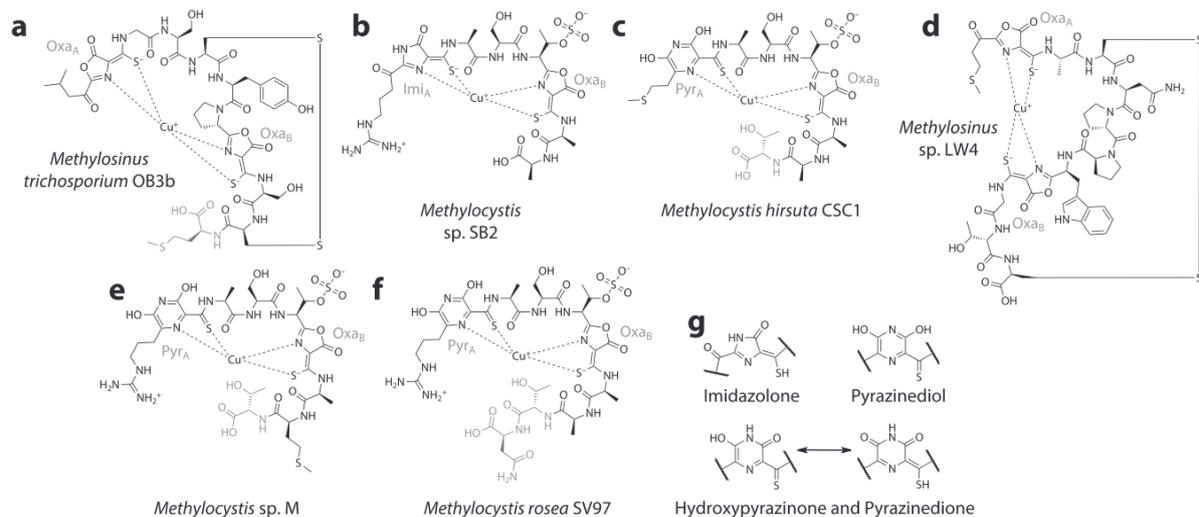


Figure 21. Structures de méthanobactines (Mbn) chélatées au cuivre (CuMbn) (52). (a) Structure de la Mbn de *Ms. trichosporium* OB3b. (b) Structure de la Mbn de *Méthylocystis* (Mc.) sp. SB2. (c) Structure de la Mbn de *Mc. hirsuta* CSC1. Les résidus C-terminaux (gris clair) sont parfois absents. (d) Structure de la Mbn de *Ms. sp. LW4*. (e) Structure de la Mbn de *Mc. sp. M*. (f) Structure de la Mbn de *Mc. rosea* SV97. (g) Identités potentielles de l'hétérocycle N-proximal dans les Mbn de *Méthylocystis*.

En plus d'une fonction principale dans l'acquisition et l'absorption de Cu, des fonctions auxiliaires ont également été proposées pour les Mbn (33,53). En effet, certaines peuvent lier d'autres métaux avec une affinité moindre et les détoxifier. Par exemple, chez *M. trichosporium* OB3b, la Mbn peut lier le mercure et le réduire sous forme Hg^{2+} suggérant un rôle dans la

protection contre la toxicité du Hg (53). L'activité antibiotique des Mbn reste hypothétique. En effet, les Mbn du groupe V des Mbn ne possèdent pas de deuxième Cys modifiable, et leurs opérons ne codent pas de TBDT impliqué dans l'importation de la Mbn. Ces systèmes sont présents chez les espèces de *Streptomyces*, de gros producteurs d'antibiotiques. Des recherches supplémentaires sont notamment nécessaires pour déterminer leur rôle (53).

Enfin, de la même manière que le sidérophore desferrioxamine pour l'hémochromatose, les Mbn pourraient être utilisées comme traitement contre la maladie de Wilson, une maladie génétique induisant une accumulation excessive de Cu dans l'organisme. Il a été montré que la Mbn pouvait inverser l'insuffisance hépatique aiguë dans un modèle de maladie de Wilson chez le rat (53).

Récemment, un nouveau lanthipeptide (section Introduction. I.1.d. lanthipeptides) tricyclique, la nousine, a été découverte chez *Streptomyces noursei* et représente le premier lanthipeptide liant le Cu (78). La nousine présente deux cycles formés par des anneaux labionine et un troisième cycle formé par une liaison transversale histidine-butyrine inédite, appelée histidinobutyryne (Hbt) (78). Bien que les lanthibiotiques soient connus pour leurs propriétés antibactériennes, l'évaluation préliminaire de l'activité de la nousine n'a révélé aucune activité antimicrobienne. Des études en spectrométrie de masse (mass spectrometry, MS) ont montré que la nousine liait le Cu parmi différents métaux (Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+}), formant un complexe sous forme nousine- Cu^{2+} , et que le motif Hbt y était essentiel. Même si son rôle physiologique, compétition ou homéostasie du Cu, n'a pas encore été déterminé, il est intéressant de voir que d'autres RiPPs que les Mbn lient aussi le Cu (78).

4. Découverte d'une nouvelle famille de RiPP en lien avec les métaux

a. Description

Dans un contexte d'étude de la pathogénicité de l'agent de la coqueluche *Bordetella pertussis*, le laboratoire « Research on Mycobacteria and Bordetella » a identifié un opéron RiPP où le précurseur faisant partie des facteurs de virulence les plus fortement exprimés (79). Grâce à des analyses d'exploration de génomes (« genome mining »), des centaines d'opérons RiPP homologues et partiellement homologues ont été identifiés dans différents taxons bactériens, incluant des bactéries environnementales (*Caulobacter*, *Cupriavidus*), pathogènes (*Burkholderia*, *Legionella*, *Francisella*) et commensales. La plupart de ces opérons, dont fait partie celui de *B. pertussis*, sont constitués de quatre gènes, codant respectivement pour un précurseur RiPP de la famille DUF2282, une enzyme cytoplasmique MNIO (DUF692 ; section Introduction I.2.b.ii), une protéine cytoplasmique contenant un domaine DUF2063 et un domaine RRE (section Introduction I.2.d.i), et une protéine de la membrane interne de la

famille DoxX (Fig. 22). Contrairement aux autres classes de RiPP, les opérons de cette nouvelle famille ne présentent aucun gène de protéase ou de transporteur, mais le précurseur porte un peptide signal N-terminal Sec-dépendant. Les peptides-sigaux sont composés d'une vingtaine d'acides aminés : la région N comporte un ou plusieurs résidus sont chargés positivement (Lys ou Arg), suivie d'une région H d'une quinzaine d'acides aminés hydrophobes puis d'un site de clivage par une signal-peptidase, avec une séquence de type Ala-X-Ala ou Ser-X-Ala. Cela suggère que la maturation protéolytique de ces RiPPs pourrait être limitée au clivage du peptide signal lors de leur transport vers le périplasma par la machinerie Sec (80).

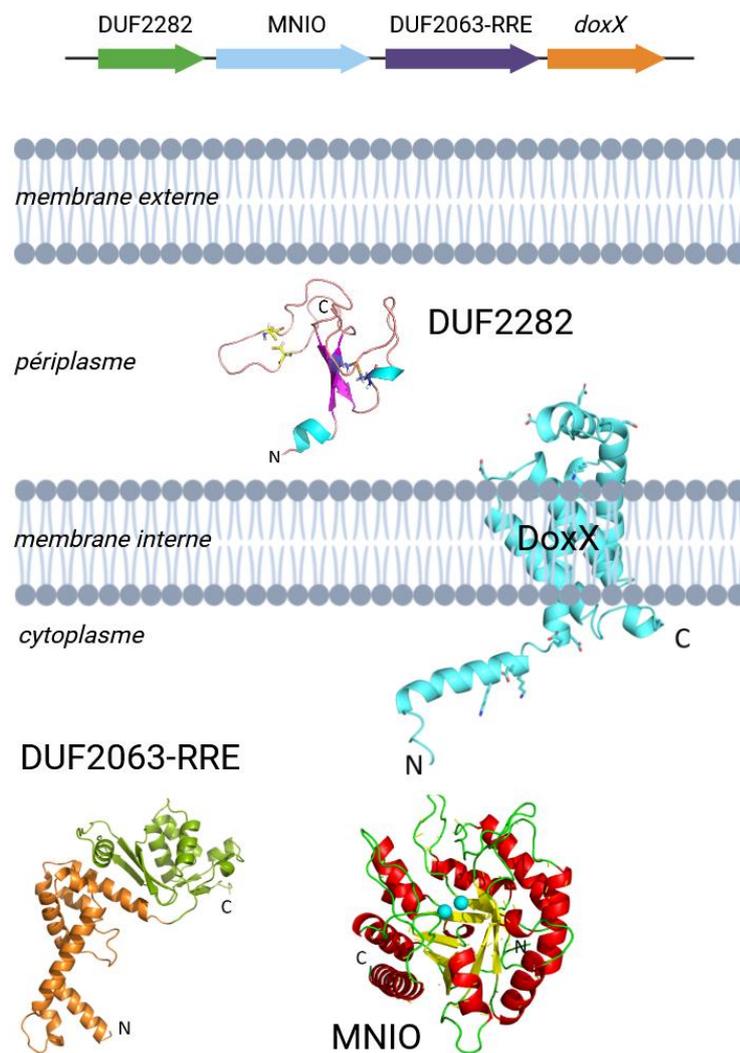


Figure 22. Représentation schématique de l'opéron, modèles structuraux et localisation des quatre produits de gènes de cette nouvelle famille d'opérons chez *C. vibrioides*. Modèles AlphaFold2 de la forme mature de DUF2282, après clivage du peptide signal, de la protéine B, de la protéine C et de DoxX. La protéine C contient deux domaines, un domaine DUF2063 tout en hélices alpha (orange) et un domaine de type RRE (vert).

Des analyses in silico au laboratoire ont indiqué que de nombreux opérons de cette nouvelle famille étaient dépourvus de DoxX et présentaient, au lieu du gène DUF2282, des gènes codant pour des précurseurs putatifs de RiPP de plusieurs familles non caractérisées. Une nouvelle et vaste classe de RiPP a donc été identifiée, dont les opérons sont définis par 3 gènes codant respectivement le précurseur de RiPP et les protéines MNIO (protéine B) et DUF2063 (protéine C). Cette nouvelle famille de RiPP présente plusieurs originalités.

Leurs précurseurs contiennent des motifs riches en Cys (de 4 à 12 Cys) conservés et répétés qui caractérisent les trois sous-groupes de cette famille : les précurseurs DUF2282 caractérisés par quatre Cys, les précurseurs RiPP_6/12 Cys caractérisés par six ou douze Cys et les précurseurs EGKC caractérisés par la répétition du motif « EGKC » (Fig. 23). Ces précurseurs sont de tailles très variables, pouvant aller jusqu'à des centaines de résidus pour les plus grands, ce qui est bien supérieur aux classes RiPP connues.

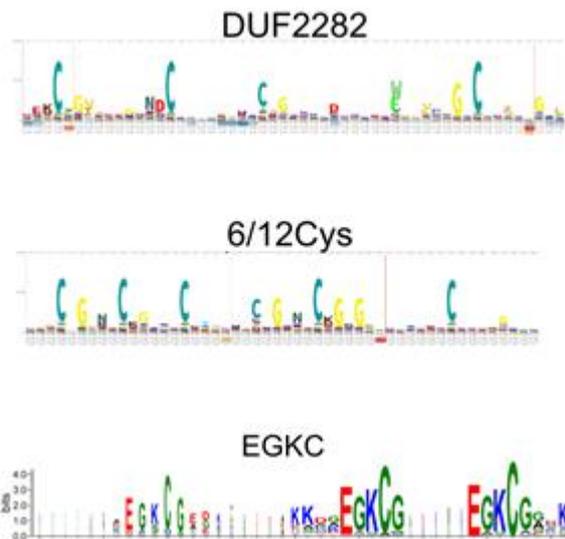


Figure 23. Weblogos des séquences des différents peptides précurseurs montrant les motifs conservés (Rudy Antoine).

Des analyses *in silico* au laboratoire ont montré que la plupart des génomes bactériens contiennent une ou plusieurs copies d'homologues de *doxX*. Des analyses de similarité de séquence (SSN) montrent qu'il existe plusieurs sous-familles de protéines DoxX, et les protéines DoxX codées dans les opérons RiPP forment deux sous-familles bien distinctes. Les gènes *doxX* d'une de ces sous-famille sont systématiquement présents dans les opérons hébergeant un précurseur RiPP de la famille DUF2282, et les gènes *doxX* de 2^{ème} sous-famille se trouvent dans les opérons avec d'autres types de précurseurs RiPP. Peu de choses sont connues sur les protéines DoxX en général, mais la littérature peu abondante sur ces protéines indique une fonction rédox impliquant des quinones, liée au métabolisme du soufre (81) ou à l'homéostasie des thiols (82).

Les protéines DoxX présentent une similarité de séquence avec la sous-unité DoxD de la thiosulfate quinone oxydoréductase membranaire (TQO) d'*Acidianus ambivalens*, une Archéobactérie thermophile de l'ordre des Sulfolobales, qui se développe de manière optimale à 80°C et à pH 2,5 et oxyde le soufre dans des conditions aérobies (81,83). La TQO, composée de DoxD et DoxA, est couplée à la cytochrome *aa*₃ oxydase. Elle permet l'oxydation du thiosulfate, l'un des produits de l'étape initiale de la voie d'oxydation du soufre élémentaire, en tétrathionate avec des quinones comme accepteurs d'électrons. La cytochrome *aa*₃ oxydase permet la réduction du dioxygène utilisant les quinones comme donneurs d'électrons (81).

Afin de résister au stress oxydant au sein des macrophages, *M. tuberculosis* possède un complexe d'oxydoréduction associé à la membrane, composé d'une superoxyde dismutase (SodA(Mn)), d'une protéine DoxX et d'une thiol-oxydoréductase prédite (SseA), qui relierait

physiquement la détoxification de radicaux à l'homéostasie des thiols cytosoliques. Ce système, analogue au système canonique du glutathion (GSH), implique une partie SseA/DoxX responsable du recyclage des radicaux thiyls formés lors de l'oxydation de thiols cytosoliques par des peroxydes ou des diamides, et une partie SodA(Mn) responsable de la détoxification des radicaux générés lors de la réaction par SseA (82).

a. Opérons du sous-groupe DUF2282 : bactéries productrices et régulation

Des opérons RiPP du sous-groupe DUF2282 homologues à celui de *B. pertussis* sont retrouvés chez *Cupriavidus metallidurans* (Rmet_4682-4685) et *Legionella pneumophila* (lpg2105-2108) sous forme d'opérons GIG (« gold induced genes »), et chez *Caulobacter vibrioides* (anciennement *crescentus*) (CCNA_3363-3366) sous forme d'un opéron apparenté (Fig. 24). A l'exception de celui de *B. pertussis*, ces opérons sont régulés positivement lors d'une exposition à des métaux de transition, notamment le Cu (84–86). Le rôle des bactéries est primordial dans le cycle des métaux et la formation de minéraux dans l'environnement, car certains ions métalliques sont essentiels à la nutrition microbienne et à l'énergie métabolique. Cependant, certains métaux, en particulier les ions de métaux lourds, comme le mercure (Hg^{2+}), le cadmium (Cd^{2+}), l'argent (Ag^+), le cobalt (Co^{2+}), le chromate (CrO_4^{2-}), le cuivre (Cu^{2+}), le nickel (Ni^{2+}), le plomb (Pb^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}), provoquent également des effets toxiques (87).

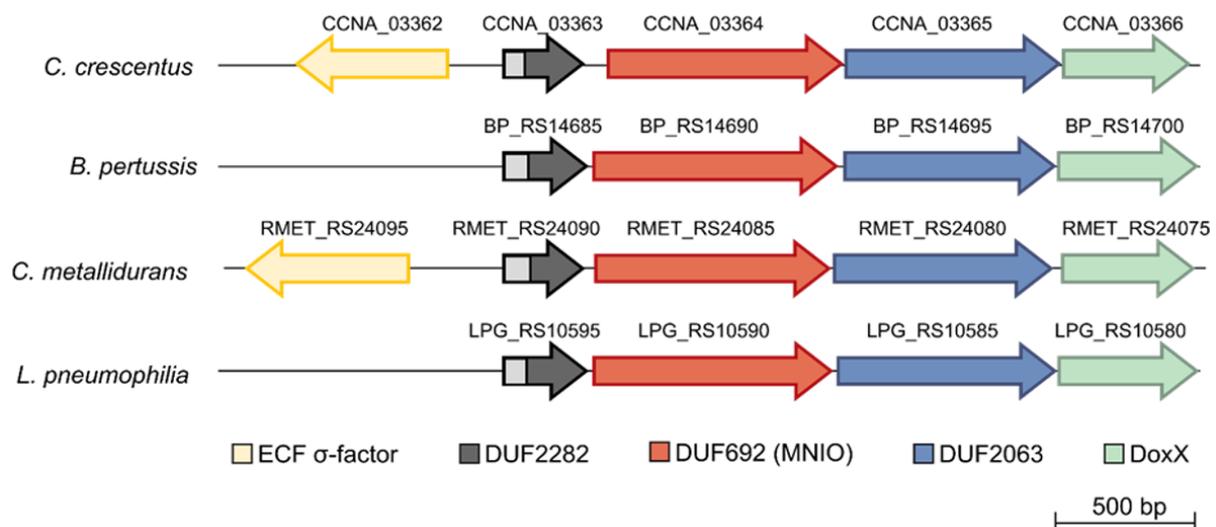


Figure 24. Organisation génétique des opérons de type GIG trouvés dans les génomes de *C. crescentus* (NC_011916.1), *B. pertussis* (NC_002929.2), *C. metallidurans* (NC_007974.2) et *L. pneumophila* (NC_002942.5). Les peptides signaux sont représentés en gris en N-terminal des protéines contenant le domaine DUF2282.

C. metallidurans est une β -protéobactérie à Gram négatif environnementale et métallophile (84,87). Cette bactérie est capable de former des biofilms sur les grains d'oxyde d'Au et d'en biominéraliser les nanoparticules. Chez *C. metallidurans*, l'Au est absorbé sous forme de complexes auriques Au^{3+} qui sont réduits en Au^+ dans le cytoplasme. Les complexes Au^+ exportés vers le périplasma s'associent facilement aux sulfures présents dans les protéines membranaires et périplasmiques, conduisant à la formation rapide de l'espèce intermédiaire Au^+-S . La formation de ces complexes est ensuite suivie par une lente réduction et un dépôt intra- et extracellulaire de particules métalliques Au. Semblables aux ions métalliques libres, les ions Au sont toxiques pour les bactéries car ils génèrent du stress oxydant et inhibent la fonction de certaines enzymes chez *C. metallidurans* (84,87).

Afin de se protéger contre l'accumulation toxique des complexes Au^{3+} et Au^+-S , *C. metallidurans* régule positivement plusieurs groupes de gènes de stress oxydant (*ohr*, *oxyR*, *ahpC*, *katA* et *sodB*) et de résistance aux métaux (clusters *cup*, *cop*, *mer*, *ars*). Ces systèmes de défense impliquent des mécanismes d'efflux, de complexation, et de détoxification par précipitation réductrice ou par méthylation (87). Parmi les gènes régulés positivement par les complexes Au^{3+} , la plus forte régulation observée était celle de la région génomique Rmet_4682–4687 nommée GIG (87), qui est un divergon : un opéron code pour un opéron RiPP du sous-groupe DUF2282 homologue à celui de *B. pertussis* (Rmet_4285–4282), et en sens opposé, un deuxième opéron code pour le facteur σ de fonction extracytoplasmique (ECF) RpoQ (Rmet_4286) et son facteur anti- σ putatif (Rmet_4287) (84,87). L'opéron *gig* est sous le contrôle de RpoQ et régulé positivement par le Cu, l'Au et l'Ag (84). Bien que ces systèmes soient induits par ces trois métaux, les GIG à eux seuls ne sont pas essentiels à la résistance à l'Au, à l'Ag ou au Cu chez *C. metallidurans* (84).

L'Au peut donc induire certains acteurs qui ne concernent pas forcément ce métal noble chez *C. metallidurans*. Cette régulation non spécifique peut s'expliquer par la présence de résidus Cys dans l'activateur transcriptionnel CupR, pouvant lier à la fois Cu^+ et Au^+ vu les similitudes chimiques de ces ions (84,87). La régulation positive des gènes *cup/cop* par Au^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} ou Co^{2+} chez *C. metallidurans*, suggère un système de réponse métallique général facilement inductible (87). En effet, de par la concentration moyenne dans les sols (environ 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour Cu contre quelques ng/kg pour Au), la solubilité chimique, la mobilité environnementale et la biodisponibilité plus élevées du Cu que de l'Au, les organismes vivant dans des environnements riches en métaux sont plus susceptibles de subir les effets toxiques du Cu que ceux des complexes d'Au. Il serait donc énergétiquement défavorable de produire des systèmes spécifiques de résistance à l'Au si d'autres systèmes de résistance aux métaux peuvent être utilisés pour la détoxification des complexes d'Au (84).

L. pneumophila est une δ -protéobactérie à Gram négatif pathogène, responsable de la maladie du légionnaire. Elle est la principale cause des épidémies de maladies bactériennes transmises par l'eau aux États-Unis. *L. pneumophila* est retrouvée dans les environnements aquatiques naturels et les systèmes d'eau artificiels, comme les tours de refroidissement, les chauffe-eaux, les fontaines et les climatiseurs, sous forme de biofilms ou de parasites intracellulaires de protozoaires. Afin de lutter contre *L. pneumophila*, plusieurs techniques sont utilisées comme diverses molécules chlorées, les rayons UV, le brome, et l'ionisation Cu/Ag (85).

Malgré leur efficacité contre d'autres bactéries ces systèmes sont moins efficaces pour éliminer *L. pneumophila* à cause de la formation de biofilms résistants. Afin de se protéger contre les ions Cu et Ag, celle-ci régule positivement des gènes de mécanismes de réponse aux métaux (efflux, complexation, réduction) dont l'ATPase de type P1B CopA impliquée dans la résistance au Cu, le locus *helABC* codant pour trois protéines impliquées dans la résistance aux métaux lourds, et un opéron GIG (*lpg2105-lpg2108*) (85). Cet opéron GIG est situé sur l'élément conjugatif intégratif ICE- β ox présent dans environ 18 % des souches étudiées, qui est associé à une virulence accrue et à une tolérance au stress oxydant. Trois homologues totaux et partiels de l'opéron existent sur le chromosome: l'opéron *lpg0665-lpg0669* structurellement similaire à l'opéron GIG, l'opéron *lpg2253-lpg2255* ne contenant que trois des quatre gènes GIG (dépourvu du *DoxX*), et l'opéron *lpg0671-lpg0676* contenant les homologues des quatre gènes GIG dans un ordre différent, avec *DoxX* qui fait partie d'une NADH déshydrogénase (85).

Dans les conditions de biofilm, l'opéron *lpg2105-lpg2108* est exprimé en réponse au Cu à 26°C et à 37°C. Cependant lorsque les bactéries sont planctoniques, cet opéron exprimé en réponse au Cu à 37°C, mais seulement en réponse à la phase de croissance à 26°C. Il est aussi exprimé lors d'une infection d'amibes, suggérant un rôle potentiel dans la virulence. Ces résultats soutiennent la possibilité de plusieurs régulateurs pour cet opéron, l'un pour l'expression basale, et un second pour la réponse à l'Au et au Cu. Le facteur σ de phase stationnaire RpoS et le régulateur principal CrsT présent au sein de l'unité ICE- β ox pourraient réguler l'opéron GIG (85). Ces deux régulateurs contrôlent aussi de nombreux gènes de virulence chez *L. pneumophila*. Chez *C. metallidurans* les acteurs impliqués dans la résistance aux métaux sont contrôlés par des régulateurs de type MerR, en réponse à l'Au et au Cu. Bien qu'ils n'aient pas encore été caractérisés, des homologues de ces régulateurs se trouvent dans le génome de *L. pneumophila* (85).

C. vibrioides est une α -protéobactérie à Gram négatif environnementale capable de vivre dans des sites pauvres en nutriments et contaminés par des métaux lourds (Cr, Cd). Bien que ces deux métaux lourds ne lui soient pas utiles, leurs similitudes structurales et de valence avec les autres métaux font qu'ils sont transportés dans le cytoplasme par des systèmes de transport non spécifiques exprimés de manière constitutive. Une fois à l'intérieur de la bactérie, le Cd peuvent former des complexes intracellulaires non spécifiques avec des groupes sulfhydryls et le Cr peut se faire réduire, entraînant une réduction de l'activité des enzymes sensibles et la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) (86).

Afin de se protéger contre la toxicité des métaux lourds, *C. vibrioides* régule positivement plusieurs groupes de gènes de réponse au stress oxydant, de réparation de l'ADN et de résistance aux métaux (mécanismes d'efflux, détoxification, complexation et précipitation). Parmi ces systèmes, sont retrouvés la superoxyde dismutase SodA(Mn), la glutathion S-transférase, la thiorédoxine, la glutaredoxine, un opéron RiPP du sous-groupe DUF2282 (CCNA_3254-CCNA_3255-CCNA_3256-CCNA_3257) et un opéron RiPP du sous-groupe RiPP_6/12Cys (CCNA_02999-CCNA_03000-CCNA_03001) respectivement homologue et partiellement homologue (88) à celui de *B. pertussis* et à l'opéron GIG de *C. metallidurans* (86). Les paires de gènes CCNA_03254 et CCNA_03001, CCNA_03255 et CCNA_03000, ainsi que CCNA_03256 et CCNA_02999 sont des gènes paralogues, présentant des identités de séquence d'acides aminés, respectivement de 36 %, 43 % et 23 % (88).

Comme chez *C. metallidurans*, en amont et dans la direction opposée de l'opéron CCNA_3254-CCNA_3257, un deuxième opéron code pour un facteur σ de fonction extracytoplasmique (ECF) RpoF (CCNA_03362) et deux facteurs anti- σ putatifs (CCNA_03273 et CCNA_03905) (86,88). σ F est impliqué dans la réponse transcriptionnelle au Cr et au Cd de manière indépendante du stress oxydant (88), au Cu (89), à la phase stationnaire et même à un stress thermique extrême (90) et régule notamment les opérons CCNA_3254-CCNA_3257 et CCNA_02999-CCNA_03001. Cependant ces opérons RiPPs ne sont pas essentiels à la résistance à ces métaux chez *C. vibrioides* (88).

Bien que ces données suggèrent un rôle des opérons GIG et apparentés dans la réponse au stress du Cu, la fonction et la nature des biomolécules dérivées restent inconnues (84,85,89). Afin d'étudier cette nouvelle famille de RiPP, notamment le sous-groupe DUF2282, nous avons choisi la bactérie environnementale *C. vibrioides* comme organisme modèle.

II. *Caulobacter vibrioides*, une bactérie environnementale

Caulobacter vibrioides (ou *Caulobacter crescentus*) est une α -protéobactérie à Gram négatif vivant sous forme libre dans les milieux aquatiques comme les lacs, les rivières ou les ruisseaux. Cet organisme, particulièrement original, présente un cycle asymétrique et atypique donnant deux types cellulaires distincts : une forme non répliquative mobile avec un flagelle (swarmer) et une forme répliquative fixée avec un pédoncule (stalked) (91,92).

1. Une bactérie modèle

a. Origine et histoire

En 1935, Arthur Henrici et Delia Johnson décrivent pour la première fois l'ordre des *Caulobacterales*, dont fait partie *C. vibrioides*, après avoir récolté plusieurs espèces bactériennes en immergeant des lames de microscope dans un lac d'eau douce. Grâce à un adhésif polysaccharidique présent sur une fine extension du corps cellulaire appelée pédoncule, caractéristique des *Caulobacterales*, ces bactéries se sont simplement collées aux lames. C'est en 1964 que *C. vibrioides*, ou nommé *C. crescentus* en raison de sa forme caractéristique de croissant, est isolé d'un étang en Californie (93). À partir des années 1970, Bert Ely, Austin Newton, Lucy Shapiro et leurs collègues ont réalisé des avancées majeures sur les connaissances du cycle de vie de cet organisme en identifiant les acteurs spécifiques, leur fonction et leur régulation. Ils ont également mis en place des outils génétiques (91).

Depuis, *C. vibrioides* a joué un rôle déterminant dans l'étude de la biologie et de la différenciation des cellules bactériennes. Les études sur *C. vibrioides* ont permis d'acquérir une compréhension de l'organisation intracellulaire, de la régulation du cycle cellulaire, du développement et de l'asymétrie cellulaire et d'approfondir d'autres sujets comme la mécano-détection cellulaire, la motilité, le vieillissement bactérien, l'évolution de la diversité morphologique et la biophysique bactérienne (91).

b. De l'environnement au laboratoire

Depuis ses premières utilisations dans les années 1970 et sous l'effet des cultures répétées en laboratoire, la bactérie dimorphique *C. vibrioides* a connu des changements phénotypiques marqués. Lorsque des organismes modèles de recherche, animaux, végétaux et microbiens, sont isolés et introduits dans un laboratoire, ils subissent des pressions de sélection dépendantes des changements environnementaux et certaines caractéristiques deviennent communes aux organismes cultivés ou élevés par l'Homme (94).

C. vibrioïdes est représenté par six souches, CB1, CB2, CB13, CB15, KA2 et KA3 isolées soit d'eau de robinet ou d'eau d'étang. Ces souches forment de colonies incolores et sont les seules souches de morphologie vibrioïde qui ne nécessitent pas de facteurs de croissance organiques. Après son isolement en 1964, la souche CB15 a été maintenue en culture avant d'être déposée en tant que souche ATCC19089, et constitue l'ancêtre commun des souches utilisées en laboratoire aujourd'hui (93,94).

La souche ancestrale CB15 était adhérente, présentait une croissance lente, et les deux types cellulaires (swarmer et stalked) pouvaient être physiquement synchronisées par centrifugation (93). Après des années supplémentaires de cultures, la souche CB15 a perdu spontanément la capacité d'être synchronisée et un nouveau dérivé synchronisable, nommé NA1000, a été ré-isolé à partir de la souche CB15 et maintenu en culture. Au cours des années qui ont suivi son isolement, NA1000 a perdu spontanément son adhérence aux surfaces et aux autres cellules et a acquis un temps de génération plus rapide. C'est en raison de sa capacité de synchronisation et de sa croissance plus rapide, que la souche NA1000 est devenue la souche expérimentale prédominante de *C. vibrioïdes* dans les laboratoires du monde entier (94).

Au cours des décennies de culture en laboratoire, les deux lignées (CB15 et NA1000) ont évolué et ont divergé l'une de l'autre. L'apparition indépendamment de trois mutations dans le même récepteur dépendant de TonB (TBDR) chez les souches CB15 et NA1000 montrent que les bactéries cultivées en laboratoire sont soumises à des pressions sélectives similaires et que ces mutations confèrent un avantage adaptatif à *C. vibrioïdes*. Seule la souche NA1000 présente une grande insertion, provenant d'un élément mobile de 26 kbp acquis à partir d'une source étrangère et contenant une intégrase, une excisionase, des protéines de conjugaison et de transfert d'ADN, et plusieurs gènes prédits de biosynthèse de polysaccharides membranaires. Ces polymorphismes contribuent à des effets phénotypiques importants (94).

Ainsi, les lignées CB15 et NA1000 se distinguent par des différences phénotypiques dans la mucoïdie, la sédimentation, la sensibilité aux phages, l'adhésion, la survie en phase stationnaire et le taux de croissance. Concernant la perte d'adhésion chez la souche NA1000, l'insertion d'une seule base dans le gène *hfsA*, codant pour l'adhésine présente à l'extrémité du pédoncule et appelée « le holdfast », provoque un décalage de phase induisant l'inactivation du gène et donc un défaut d'attachement. Afin de maintenir les souches, un taux élevé de survie pendant la phase stationnaire a été sélectionné chez les souches CB15 et NA1000. Celui-ci est déterminé par l'effet additif de mutations distinctes dans deux gènes codant pour des TBDR apparentés. L'augmentation du taux de croissance est aussi un phénotype fortement sélectionné au cours de la culture en laboratoire. Enfin, deux souches NA1000 portent deux mutations indépendantes d'une seule base qui altèrent l'expression de

la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), entraînant une augmentation de l'isomérisation du G6P en fructose-6-phosphate (F6P), un précurseur du peptidoglycane et du lipide A inutilisable comme substrat pour la glycolyse. Ces résultats montrent que lorsqu'elle est cultivée dans des conditions de laboratoire, le taux de croissance de *C. vibrioides* n'est pas limité par la production d'énergie mais plutôt par la disponibilité en F6P (94).

Enfin, que ce soit des espèces procaryotes ou eucaryotes, des organismes de recherche domestiqués ou de populations zoologiques menacées, l'adaptation à la vie en captivité est caractérisée par une croissance rapide et une résistance accrue au stress (94).

2. Un cycle de division atypique

C. vibrioides se divise de manière asymétrique donnant deux cellules filles génétiquement identiques mais morphologiquement distinctes. La forme mobile permet la dissémination, l'exploration et la recherche de nutriments dans l'environnement. Lorsque les conditions sont favorables, la forme flagellée perd son flagelle, rétracte ses pili et se différencie vers la forme pédonculée, synthétisant le holdfast pour favoriser l'attachement à la surface. Ainsi, la forme pédonculée et fixée pourra se diviser de manière polarisée, initier la réplication de l'ADN et poursuivre le cycle cellulaire jusqu'à la division ultérieure, assurant la prolifération bactérienne et la génération de nouvelles formes mobiles (91,92).

Chez *C. vibrioides*, la génération de cette descendance polarisée nécessite la différenciation des deux pôles cellulaires en amont de la division, dépendante de l'organisation intracellulaire spatiale et temporelle d'effecteurs clés. Ces effecteurs clés comprennent des protéines de transduction de signal, des régulateurs de transcription, des enzymes, des protéases, des chimiorécepteurs mais aussi des protéines formant des filaments, comme la crescentine, les bactofilines et les homologues bien connus de la tubuline et de l'actine, respectivement FtsZ et FtsA (92) (91).

a. Organisation intracellulaire

L'organisation intracellulaire et les gradients protéiques jouent un rôle dans différents processus essentiels comme la localisation des sites de division et la ségrégation et l'organisation des chromosomes, elle-même dépendante de l'activité transcriptionnelle (91).

La crescentine, première protéine de type filament intermédiaire découverte chez les bactéries, s'auto-assemble en une structure filamenteuse le long d'un côté de la cellule, modifiant la croissance de la paroi cellulaire et générant une morphologie incurvée, forme caractéristique de *C. vibrioides* (91).

Les bactofilines sont une autre classe de protéines du cytosquelette, découverte pour la première fois chez *C. vibrioides*. Elles sont largement conservées parmi les bactéries et ont une fonction qui diffère selon les espèces : morphogénèse cellulaire, motilité, division cellulaire ou organisation des chromosomes. Chez *C. vibrioides*, les bactofilines BacA et BacB fonctionnent comme des protéines d'échafaudage pour l'assemblage d'une enzyme de la paroi cellulaire impliquée dans la biogénèse des pédoncules. Leur localisation est régulée par le cycle cellulaire : lorsque les bactéries sont mobiles, BacA et BacB sont présents de manière diffuse mais lors de leur transition de mobile à fixée, elles s'accumulent au niveau de l'ancien pôle cellulaire (91).

Enfin, le chimiorécepteur McpA se trouve toujours près du pôle cellulaire flagellé et est impliqué dans la protection contre la prédation et les stress environnementaux (91).

Après une transition de mobile à fixée, les bactéries initient la réplication, la distribution du chromosome original et de sa copie dans les deux cellules filles (ségrégation) ainsi que l'étape de division en deux cellules filles (cytokinèse) (91,92).

La ségrégation des chromosomes est régulée par le système de partition ParABS, un système de transport actif largement conservé chez les bactéries et constitué des protéines ParA et ParB et de la séquence d'ADN parS (91,92) (Fig. 25).

La cytokinèse est ensuite orchestrée par un complexe multiprotéique appelé diviseur, qui s'assemble au centre de la cellule. La première protéine qui migre au site de division est FtsZ, une GTPase qui s'auto-assemble en protofilaments formant une structure en forme d'anneau, appelé anneau Z qui joue le rôle de plate-forme pour le recrutement de plus d'une douzaine de protéines différentes et nécessaires à la synthèse et le remodelage du peptidoglycane, à la stabilité des interactions et à la septation et la séparation des deux cellules filles. La localisation des anneaux Z va dépendre de gradients de concentration de certaines protéines, comme MipZ et ParB, qui permettent aussi de retarder leur assemblage jusqu'à l'initiation de la réplication du chromosome (91,92) (Fig. 25).

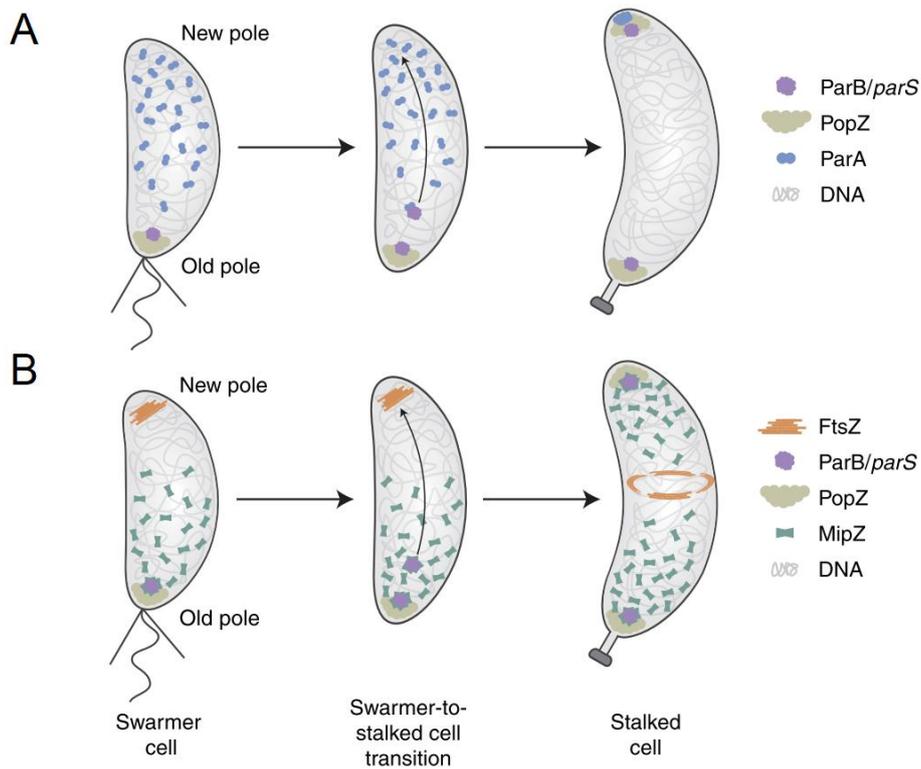


Figure 25. Organisation intracellulaire du cycle cellulaire chez *C. vibrioides* (91). (A) Localisation du système de partition ParBS en fonction du gradient de ParA pendant la ségrégation des chromosomes. (B) Positionnement de l'anneau FtsZ en fonction du gradient de protéine MipZ pendant la division cellulaire.

Afin d'établir la polarité cellulaire, *C. vibrioides* utilise des facteurs de polarité (TipN au nouveau pôle, SpmX à l'ancien) servant d'indices spatiaux qui orientent l'axe de polarité de la cellule (91) (Fig. 26).

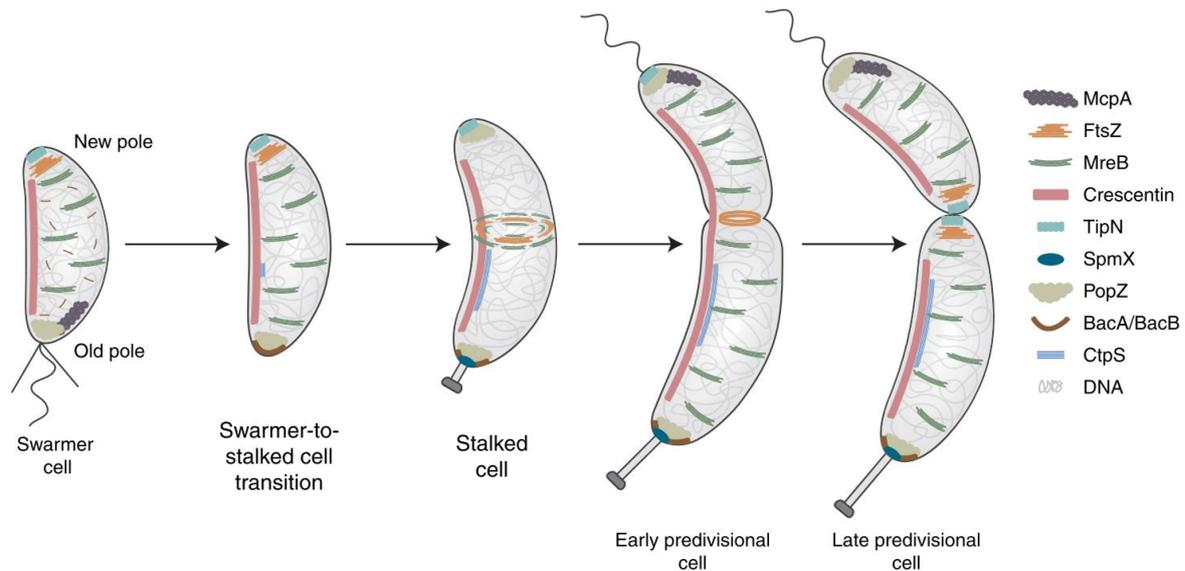


Figure 26. Organisation intracellulaire du cycle cellulaire chez *C. vibrioides* (91). Localisation intracellulaire spatiale et temporelle d'effecteurs clés pendant le cycle cellulaire. Le recrutement des facteurs de polarité est facilité par PopZ, qui s'auto-assemble en microdomaines aux poles.

De plus, la localisation des protéines de division cellulaire est aussi déterminée par l'intermédiaire de protéases (92).

b. Régulation du cycle cellulaire

Pour que *C. vibrioides* puisse garder un équilibre entre attachement/division cellulaire et dissémination, son cycle de vie dimorphique, qu'il partage avec d'autres membres du genre *Caulobacter*, est fortement régulé. Chez *C. vibrioides*, la variation de grandes fractions du transcriptome (environ 10 à 40 %), du protéome (environ 15 %) et du métabolome (environ 14 %) montre que la coordination du cycle cellulaire est étendue et dispose de plusieurs points de contrôle. Ce cycle cellulaire présente des mécanismes de contrôle combinant des régulateurs transcriptionnels principaux (DnaA, CtrA, GcrA), qui coordonnent l'expression des gènes de division cellulaire avec d'autres événements (91,92). La régulation de CtrA est elle-même contrôlée de manière post-traductionnelle notamment par sa dégradation protéolytique et fait intervenir plusieurs systèmes de signalisation interconnectés, ainsi que la concentration en di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP).

En plus de la régulation par les régulateurs principaux du cycle cellulaire, la transcription de plusieurs gènes de division cellulaire est modulée en réponse à des signaux environnementaux et au métabolisme, par l'utilisation de senseurs métaboliques (92). En effet, la bactérie prend en compte la disponibilité des ressources en azote et en carbone ainsi que des dangers potentiels avant de se diviser dans ses environnements oligotrophiques naturels.

Enfin, outre les systèmes de contrôle de la division cellulaire, il existe chez *C. vibrioides*, des mécanismes de blocage de la division cellulaire en réponse à des lésions de l'ADN, qui permettent de réparer l'ADN endommagé par recombinaison homologue entre les deux chromosomes filles et augmentent ainsi la survie (92).

c. Application à d'autres α -protéobactéries

La plupart des protéines essentielles et des réseaux de régulation impliquées dans la division cellulaire sont hautement conservés chez les bactéries Gram-négatives et parfois chez les bactéries Gram-positives, ce qui fait de *C. vibrioides* l'un des meilleurs modèles d'étude du cycle cellulaire bactérien (92). Les α -protéobactéries constituent une classe fascinante de bactéries ayant une diversité de morphologies cellulaires et de modes de vie. Cette classe regroupe des symbiotes et pathogènes végétaux (*Rhizobium*, *Agrobacterium*), des endosymbiontes arthropodes (*Wolbachia*), des pathogènes intracellulaires (*Rickettsia*, *Brucella*), des bactéries photosynthétiques (*Rhodobacter*), des bactéries magnétotactiques (*Magnetospirillum*) et de nombreux genres importants d'eau douce et marins (*Caulobacter*, *Maricaulis*, *Oceanicaulis*, *Roseobacter*) (91).

La présence d'une division asymétrique a notamment été montrée chez *Brucella*, *Agrobacterium* et d'autres, grâce à un examen détaillé des homologues de *C. vibrioides*. Chez l'agent pathogène animal *Brucella abortus*, le phospho-relais qui régule la division cellulaire et l'initiation de la réplication de l'ADN régule aussi plusieurs facteurs de virulence nécessaires à la survie intracellulaire dans les cellules hôtes (91).

3. Vers des applications fondamentales et technologiques

Bien que *C. vibrioides* soit connu pour être l'un des meilleurs modèles d'étude du développement cellulaire, de la polarité cellulaire et de la diversité morphologique, ses applications se sont étendues bien au-delà (91).

La première caractéristique remarquable est la motilité. Contrairement à *E. coli* qui présente plusieurs flagelles répartis de façon aléatoire autour du corps cellulaire, *C. vibrioides* ne possède qu'un seul flagelle à un endroit précis. Ce flagelle est un filament de forme hélicoïdale qui permet à la bactérie de se déplacer en avant lorsqu'il tourne dans le sens des aiguilles d'une montre ou en arrière lorsqu'il tourne dans le sens contraire. Le faible taux de consommation d'énergie du moteur flagellaire et la forme incurvée des cellules confèrent aux cellules une efficacité de nage élevée. En plus de faciliter la colonisation pour s'adapter aux environnements aquatiques et pauvres en nutriments, le moteur flagellaire est impliqué dans

la mécano-détection des surfaces pour la différenciation en cellules fixées. Peu de choses sont connues sur la mécano-détection chez les bactéries, et *C. vibrioides* apparaît comme un système modèle complémentaire à *E. coli* et *P. aeruginosa* pour étudier ce domaine relativement nouveau (91).

La deuxième caractéristique remarquable est le holdfast. En plus de son lien direct avec le cycle cellulaire, le holdfast est une adhésine à base d'un polysaccharide gélatineux, élastique, biodégradable et capable d'adhérer à une large gamme de substrats, faisant de lui un des adhésifs biologiques les plus puissants caractérisés à ce jour. Il est ainsi à l'origine des premières études de micro-fluidique impliquant des bactéries et des études sur le vieillissement réplcatif. Aujourd'hui, le holdfast représente aussi un modèle pour le développement d'adhésifs biologiques pour des applications industrielles et médicales (91).

III. Le cuivre

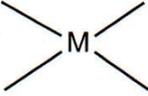
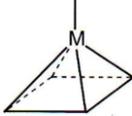
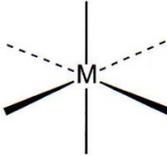
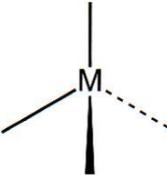
C. vibrioides et les espèces bactériennes apparentées sont connues pour leur capacité à vivre dans des environnements pauvres en nutriments et contaminés par des métaux lourds, dont le Cu (86). Le Cu est un micronutriment essentiel pour tous les organismes vivants car il est utilisé par une variété d'enzymes, comme des enzymes de la respiration telles que les cytochromes *c* oxydases, l'oxyde nitrique réductase, du métabolisme de l'azote telle que la nitrite réductase, ou de la défense contre le stress oxydant telles que les superoxydes dismutases et les multicopper oxidases (95). Cependant le Cu peut entraîner des effets toxiques lorsqu'il se retrouve à des concentrations intracellulaires élevées. Il est notamment utilisé par les phagocytes et les amibes comme système d'intoxication, et constitue un élément crucial du système immunitaire inné. C'est pourquoi il est important pour les bactéries de maintenir une homéostasie strictement contrôlée (89,95).

1. Toxicité du cuivre

Le Cu est très réactif et constitue une source potentielle de dommages cellulaires. En effet, il est retrouvé en tête de la série de Irving-Williams ($Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$), qui représente la stabilité thermodynamique des complexes formés par ces métaux avec d'autres molécules. C'est pourquoi, comparé aux autres métaux de transition biologiquement pertinents, le Cu présente une plus forte affinité pour les groupements avec des atomes d'azote, d'oxygène et de soufre présents chez la plupart des biomolécules, et dont certains sont des sites de liaison de métaux. Le Cu^{2+} est engagé dans des géométries de coordination

planaires carrées, pyramidales carrées ou octaédriques, et le Cu^+ dans des géométries de coordination tétraédrique (Tab. 2).

Tableau 2. Représentation des différentes géométries impliquées dans la liaison du Cu^{2+} et du Cu^+

Cu^{2+}	
Plan carré	
Pyramide à base carrée	
Octaèdre	
Cu^+	
Tétraèdre	

Le Cu^{2+} est naturellement réduit en Cu^+ en entrant dans le cytoplasme par des agents réducteurs tels que les quinones, certains composants de la chaîne de transport des électrons, ou la NADH déshydrogénase. Le Cu^+ est sensiblement plus toxique en raison de sa forte affinité pour les groupements sulfhydryls des protéines, les acides aminés et le GSH, et en raison de la perméabilité plus élevée de la membrane cytoplasmique pour cet ion. Le Cu^+ est toxique par ses capacités de déplacement des ions métalliques natifs dans les sites catalytiques et de liaison non spécifique aux protéines, aux lipides, à l'ADN et à certains métabolites, causant l'inactivation d'enzymes, l'altération structurelle de groupes exposés, la déplétion des thiols, et la production d'espèces réactives de ROS par la réaction de Fenton (37,95) (Fig. 27).

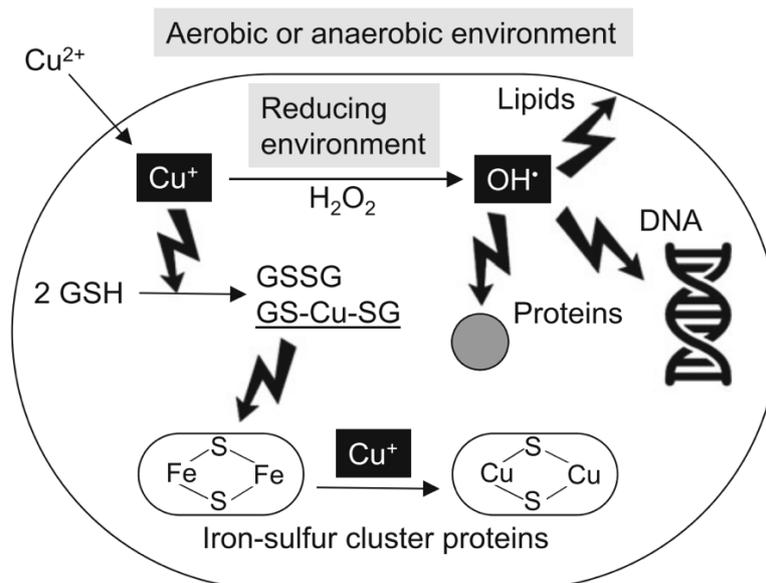


Figure 27. Mécanismes de toxicité du cuivre (37). Le Cu^{2+} pénètre dans la cellule et est naturellement réduit en Cu^+ dans le cytoplasme. La principale source de stress est le déplacement du fer des clusters $[\text{4Fe-4S}]$ des protéines. Le Fe^{2+} libéré et le Cu^+ participent aux réactions de Fenton produisant des ROS non détoxifiables qui vont réagir de manière non spécifique avec les lipides, les protéines et l'ADN. Le Cu^+ lui-même induit une déplétion en thiols des GSH, des protéines et des lipides. De plus, ce métal forme des complexes avec le GSH, un donneur de Fer dans les clusters $[\text{4Fe-4S}]$ habituellement, amenant le Cu^+ directement dans ces clusters.

a. Interactions avec les protéines

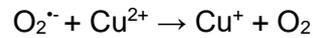
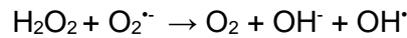
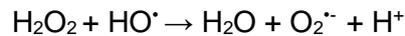
La principale action toxique du Cu^+ est le remplacement (ou mismétallation) du Fe dans les clusters $[\text{4Fe-4S}]$ des protéines, inactivant des fonctions enzymatiques essentielles comme la synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée. Il endommage aussi les clusters de SufU, une protéine d'échafaudage majeure pour l'assemblage et le transfert des clusters $[\text{4Fe-4S}]$ vers les protéines cibles (37).

Le déplacement du Fe par le Cu génère aussi du stress oxydant. Le Cu participe directement et indirectement à la génération des ROS par la réaction de Fenton, soit en catalysant lui-même la réaction soit en rendant le fer disponible pour la réaction de Fenton (37,95).



Le Cu^+ , comme le Fe^{2+} , va réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un sous-produit métabolique naturel de la croissance aérobie (95), et entraîner la formation du radical hydroxyle (OH^\bullet). Ce dernier, extrêmement réactif, réagit spontanément avec les molécules présentes dans son entourage direct, déclenche une réaction en chaîne formant des radicaux, conduisant à des radicaux secondaires et agissant par divers mécanismes, comme l'inhibition de la respiration, la peroxydation lipidique ou les dommages oxydatifs aux protéines ou à l'ADN. De plus, il est impliqué dans le cycle Haber-Weiss qui amplifie la production de ROS

(37,95), puisque la réaction du radical OH[•] avec l'H₂O₂ donne un anion superoxyde (O₂^{•-}), qui en réduisant le Cu²⁺ en Cu⁺ permet de redémarrer le cycle (37,95).



Le Cu²⁺ peut aussi être réduit en Cu⁺ par les thiols intracellulaires, générant ainsi des radicaux thiyls (RS[•]) (95).

Bien que la mismétallation des clusters [4Fe-4S] soit sa principale action, le Cu est capable d'induire aux protéines des dommages en dehors des sites actifs enzymatiques par la perturbation de la structure protéique (95). Le radical OH[•] entraîne la formation de groupements carbonyles sur certains acides aminés, marqueurs généraux des dommages oxydatifs des protéines (95).

Le Cu peut induire indirectement la formation de liaisons disulfure et thioéther, et est également capable d'inhiber la réduction des ponts disulfures (95).

L'accumulation de protéines anormales en réponse au stress lié au Cu est toxique pour les cellules et celles-ci doivent être réparées ou éliminées par la cellule. Ainsi le Cu peut induire l'expression de protéases et de chaperonnes impliquées dans le repliement (95).

b. Interactions avec les membranes

Les phospholipides membranaires possèdent des groupes fonctionnels connus pour coordonner les ions Cu. Les modèles actuels impliquent les groupes amines et/ou carboxyles des têtes polaires dans la liaison d'ions Cu, générant un complexe constitué de deux molécules lipidiques coordonnant un seul ion Cu. Ces liaisons du Cu aux phospholipides diminuent la fluidité de la membrane. Il a été montré chez *B. subtilis* que la liaison du Cu aux membranes, notamment aux PE avait un impact sur la division cellulaire. Alternativement, l'adsorption du Cu par les phospholipides pourrait diminuer les ions de Cu libres et donc atténuer la toxicité du Cu (95). Le Cu peut aussi interagir avec le pool de quinones, perturbant la chaîne de transport d'électrons.

La liaison du Cu aux phospholipides va augmenter la concentration en radicaux HO[•] à la surface de la membrane, potentialisant le stress oxydant sur les compartiments lipidiques. Bien que la toxicité des interactions du Cu avec les lipides membranaires soit bien décrite pour les acides gras polyinsaturés des eucaryotes, celle-ci reste peu connue chez les procaryotes

car contrairement aux eucaryotes, la plupart des bactéries utilisent uniquement des acides gras saturés et mono-insaturés. Il est cependant connu que le radical OH[•] peut extraire l'hydrogène de ces chaînes carbonées saturées, générant ainsi un radical alkyle, qui peut former un radical peroxyde lorsque l'oxygène est disponible (95).

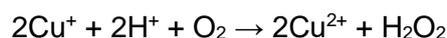
c. Interactions avec l'ADN

Peu de choses sont connues sur les interactions toxiques du Cu avec l'ADN chez les bactéries. Il a été démontré que l'ADN n'est pas la cible principale du stress lié au Cu, et au contraire, les interactions entre le Cu et l'ADN peuvent être bénéfiques pour les bactéries. En effet, le Cu présente une forte affinité pour l'ADN, qui est utilisé comme composant majeur de la matrice des biofilms bactériens. Par exemple, chez *P. aeruginosa* l'ADN de la matrice de biofilm protège les bactéries des ions Cu libres et contribue à sa tolérance (95).

d. Interactions avec d'autres biomolécules

Hormis les biomolécules évoquées précédemment, le Cu peut interagir avec de nombreux autres métabolites au sein de la bactérie (95). Certaines biomolécules comme les sidérophores et les quinones peuvent réduire le Cu²⁺ en Cu⁺, entraînant une toxicité liée au Cu⁺ (95).

Le Cu interagit directement et indirectement avec le GSH, une molécule impliquée dans le maintien du potentiel rédox cytoplasmique et dans la protection contre la toxicité des métaux lourds. En effet, le Cu induit la diminution du GSH réduit dans la cellule (37) :



Le Cu réagit avec le GSH pour produire du GSSG, la forme dimère oxydée du GSH, le rendant indisponible. De plus, il a été décrit que le GSH facilitait la métallation des enzymes en acheminant différents métaux. Par exemple, le GSH peut transporter le Fe vers les sites de liaison métalliques des enzymes, comme les clusters [4Fe-4S]. Cependant, le Cu interagit directement avec le GSH en le liant et est ainsi amené à la place du Fe vers ces clusters (37).

2. Protection contre le cuivre

Afin de maintenir le Cu intracellulaire à des concentrations non toxiques et ainsi de lutter contre le stress qu'il génère, les bactéries Gram-négatives possèdent des mécanismes de résistance

assez conservés. Cette partie constituera une liste non exhaustive de systèmes de défense, étant donné la diversité d'environnements et de modes de vie des bactéries (37).

a. Systèmes chez les bactéries Gram-négatives

Avant qu'il n'entre dans la bactérie, le Cu est avant tout confronté à des molécules sécrétées pouvant le chélater avant son interaction avec la bactérie. En effet, il a été montré que les voies de biosynthèse des sidérophores de *E. coli* et de *P. aeruginosa* étaient induites lors d'un stress au Cu, et que ces sidérophores, chélateurs de Fe initialement, étaient capables de former des complexes avec les ions Cu, empêchant son absorption par les bactéries (95). Les exopolysaccharides, sécrétés sous forme libre, de capsule ou présents sur la membrane externe, sont capables de protéger les bactéries, soit en formant une couche inerte résistante à la liaison du Cu soit en le séquestrant activement (95). Enfin, les membranes forment une dernière barrière physique contre le Cu avant son entrée dans la cellule. Une fois à l'intérieur, les bactéries mettent en place des systèmes spécifiques contre le Cu afin de l'expulser, le détoxifier et le séquestrer (37,95).

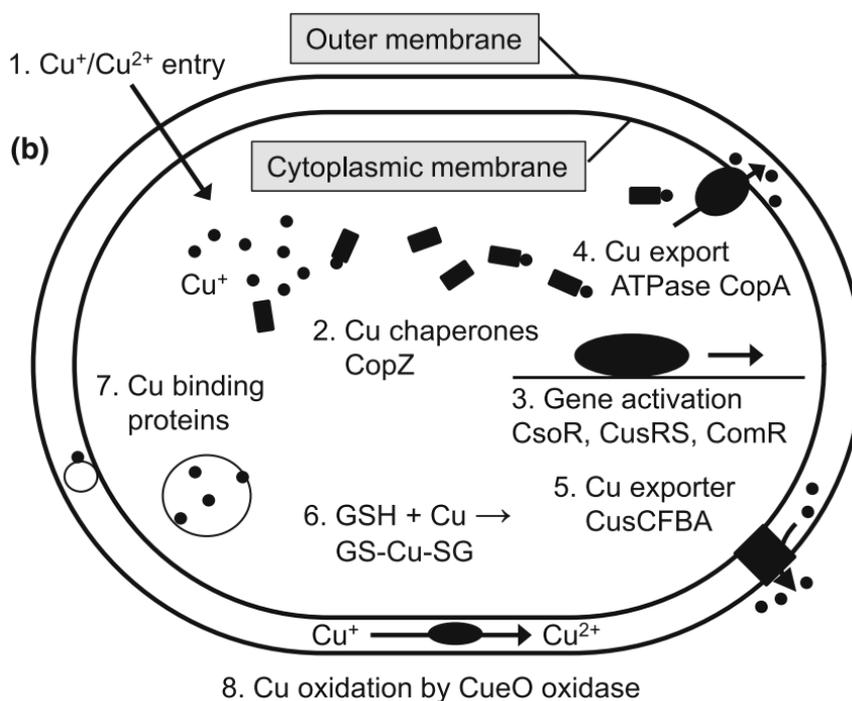


Figure 28. Systèmes de protection contre le cuivre chez les bactéries Gram négatives (37). Lorsque le Cu entre dans les bactéries (1), plusieurs systèmes de l'homéostasie du cuivre sont induits (3). Les chaperonnes à Cu (2) séquestrent le Cu cytoplasmique pour la détoxification et l'acheminement vers les systèmes d'exportation. Le Cu est transporté vers le périplasme par la Cu-ATPase (4) puis vers le milieu extracellulaire par le transporteur CusCFBA (5). Certaines protéines permettent de tamponner le Cu (7), incluant le glutathion (6).

i. Systèmes d'efflux

Deux types de pompes à efflux sont couramment utilisés chez les bactéries Gram-négatives : les ATPases de type P qui transportent le Cu (Cu-ATPases) du cytoplasme vers le périplasma, et les systèmes de la famille de transporteurs tripartites résistance-nodulation-division cellulaire (RND) qui transportent le Cu cytoplasmique ou périplasmique vers le milieu extracellulaire (89,95).

L'ATPase exportatrice de Cu CopA, qui fait partie des ATPases de type P1B, est un élément central de l'homéostasie du Cu et est présente chez presque toutes les bactéries. Ces enzymes sont des pompes ioniques ATP-dépendantes intégrées dans la membrane cytoplasmique. Les Cu-ATPases sont généralement composées de 8 hélices transmembranaires comprenant un motif CxP intra-membranaire sur l'hélice 6 servant de porte ionique, et un motif CxxC N-terminal dans le cytoplasme servant de site de liaison aux métaux (metal-binding domains, ou MBD) probablement pour une régulation encore inconnue. L'ATPase est phosphorylée par le transfert du γ -phosphate de l'ATP sur le groupe carboxyl d'un résidu Asp conservé. L'énergie libérée lorsque cette liaison covalente est brisée, permet le transport de l'ion Cu^+ . La plupart des bactéries Gram-négatives, *E. coli* étant une exception, possèdent deux Cu-ATPases de type P1B dont les rôles physiologiques sont différents. CopA1, avec un taux d'efflux élevé, est nécessaire pour maintenir un faible niveau de Cu cytoplasmique, alors que CopA2, avec un taux d'efflux faible, est nécessaire pour fournir du Cu au périplasma pour la métallation de la cytochrome *c* oxydase (37,95).

Le système RND transporteur de Cu le mieux caractérisé est le complexe CusABC de *E. coli*, qui permet le transport du Cu à travers la membrane externe. Le complexe est formé de 3 CusA, 6 CusB et 3 CusC : CusA permet l'ancrage dans la membrane cytoplasmique, CusB s'étend dans l'espace périplasmique et permet la liaison périplasmique, et CusC est ancrée dans la membrane externe et permet la libération du Cu vers l'extérieur. La protéine CusA prend en charge le Cu sous forme Cu^+ provenant principalement, voire exclusivement du périplasma, et le transporte à travers la membrane externe (37,95).

Un certain nombre de systèmes d'efflux fonctionnent avec des métallochaperonnes, qui permettent le transit des ions Cu dans le cytoplasme ou le périplasma vers les partenaires d'efflux. Dans le cytoplasme, les ions Cu^+ sont pris en charge par la chaperonne CopZ qui l'achemine vers CopA. CopA va ensuite les délivrer à la chaperonne périplasmique CusF, qui les transmet ensuite au complexe CusABC (37,89,95).

CopZ est un élément central de l'homéostasie du Cu. C'est une petite protéine de 7 à 8 kDa avec un motif CXXC conservé permettant la prise en charge de Cu^+ . En plus d'acheminer le Cu vers les systèmes d'efflux, CopZ permet de minimiser la toxicité du Cu en le chélatant et

en l'éliminant du cytoplasme, et aurait un rôle dans la métallation des protéines de la chaîne respiratoire (37,95).

La métallochaperonne CusF, qui permet de lier le Cu périplasmique et de le livrer au système CusABC, est une petite protéine possédant un motif avec deux résidus Met et un résidu His, permettant la prise en charge du Cu⁺ (37,95).

ii. Systèmes de détoxification

Lorsque les ions Cu⁺ ne peuvent pas être expulsés assez rapidement par les systèmes d'efflux, les bactéries peuvent les détoxifier. En effet, lorsque le Cu⁺ est exporté dans le périplasme par CopA, celui-ci peut soit, principalement dans des conditions anaérobies, être pris en charge par le système CusF - CusABC, soit principalement dans des conditions aérobies, être oxydé en Cu²⁺ moins toxique par la multicopper oxydase (MCO) CueO. En effet, étant donné que le Cu⁺ peut conduire à la génération de radicaux OH^{*}, une activité oxydase robuste contribue à la résistance au Cu. CueO est une petite protéine avec un motif riche en résidus Met permettant la prise en charge du Cu⁺, et qui nécessite de l'oxygène moléculaire pour son activité. CueO contribue également à la résistance au Cu en oxydant les sidérophores. En effet, les sidérophores dérivés de catéchol peuvent réduire le Cu²⁺ en Cu⁺ toxique, alimentant ainsi la production de ROS. En oxydant les catéchols, CueO entraîne la formation de pigments de type mélanine capable de lier le Cu²⁺, mais aussi d'oxyder le Cu⁺ en Cu²⁺ (37).

iii. Systèmes de passivation

Il s'agit d'un troisième volet de la tolérance au Cu. Différents systèmes de passivation existent chez les bactéries Gram-négatives, en particulier les métallothionéines, le polyphosphate et le glutathion. CopZ sert aussi de tampon à Cu dans le cytoplasme (37,89,95,96).

Les métallothionéines sont des petites protéines riches en résidus Cys qui lient principalement le Zn²⁺, le Cd²⁺ et le Cu⁺. Elles sont rares chez les procaryotes et les seules métallothionéines bien caractérisées sont SmtA de *Synechococcus* et MymT des mycobactéries pathogènes.

Bien que leur fonction principale soit le stockage de Cu mobilisable pour certaines protéines, les « Copper storage protein » (Csp) sont impliquées dans la tolérance au Cu. Les Csp, retrouvés notamment chez la bactérie méthanotrophe *M. trichosporium OB3b* et *B. subtilis*, sont

des tétramères en hélices α riches en résidus Cys qui permettent le stockage de quantité importante de Cu. Par exemple, *M. trichosporium OB3b* possède trois protéines de stockage du Cu : Csp1 et Csp2 périplasmiques, et Csp3 cytoplasmique, pouvant lier jusqu'à 80 atomes de Cu via des groupes thiolates (37).

Les polyphosphates sont des polymères linéaires formés d'une centaine de résidus orthophosphate. Ils sont impliqués dans la croissance cellulaire, le QS, la formation de biofilm, la réponse aux stress et la virulence chez les pathogènes. En présence de Cu ou de Cd, les polyphosphates sont dégradés sous forme d'orthophosphates par des exopolyphosphatases (PPX), libérant du phosphate inorganique qui forme ensuite des complexes métal-phosphate pouvant être exportés par un transporteur de phosphate inorganique (37).

Le GSH est à la fois une molécule impliquée dans la protection et dans l'amplification de la toxicité du Cu (section Introduction. III. 1. d). Etant donné le nombre de systèmes de protection contre les conditions de stress « quotidiennes », le GSH ne constitue qu'un système de secours (37).

iv. Régulation

Pour maintenir une homéostasie, il est nécessaire que ces systèmes soient régulés finement. Il existe donc plusieurs régulateurs détectant directement le Cu ou indirectement via les stress induits. Chez les protéobactéries, il existe deux systèmes majeurs de régulation de l'homéostasie du Cu : les systèmes à un composant de type CueR et à deux composants comme CusRS (37,95).

CueR est un régulateur de type MerR. Ces régulateurs possèdent un domaine de liaison à l'ADN N-terminal, un domaine de dimérisation au centre de la protéine, et un domaine C-terminal de liaison de métaux contenant deux résidus Cys très conservés. En présence de Cu, CueR induit l'expression de *copA* et de *cueO* chez *E. coli*, et de *copA1*, *cusABC*, et les deux *copZ* chez *P. aeruginosa* (37,95).

CusRS est retrouvé exclusivement chez les bactéries Gram-négatives, constitué d'un senseur-kinase transmembranaire (CusS) et d'un régulateur transcriptionnel (CusR). La liaison du Cu périplasmique à CusS induit son autophosphorylation, suivie d'un phosphotransfert vers un résidu Asp conservé sur CusR. CusRS induit la transcription des opérons *cusCFBA* et *cusRS* chez *E. coli*.

Ces deux systèmes diffèrent dans leur réponse au Cu car CueR est induit par des concentrations cytoplasmiques faibles de Cu, alors que CusRS est induit par des concentrations extracellulaires élevées de Cu et est plus important dans des conditions anaérobies (37).

Il existe également d'autres régulateurs qui ne réagissent pas directement au Cu mais aux stress induits par celui-ci, tel que des senseurs du stress oxydant OxyR et SoxR qui sont souvent déclenchés lors des stress métalliques et sont impliqués dans leur tolérance (37).

Tous les systèmes de protection qui jouent un rôle dans l'homéostasie du Cu chez la plupart des bactéries Gram-négatives ne sont pas nécessairement présents chez *C. vibrioides* (89).

b. Systèmes d'homéostasie du cuivre chez C. vibrioides

Etant donné que les espèces de *Caulobacter* sont retrouvées dans des sites contaminés par des métaux comme les eaux les sédiments souterrains profonds et les mines d'Au, des mécanismes de résistance contre le Cd²⁺, le Cr⁶⁺, l'U⁶⁺ et le Cu²⁺ sont présents chez ces souches, y compris chez la souche de laboratoire *C. vibrioides* NA1000 (89).

Chez *C. vibrioides*, les systèmes impliqués dans la réponse au stress cuivrique et leurs niveaux d'expression sont différents en fonction du morphotype. Tandis que les bactéries mobiles flagellées utilisent la chimiotaxie négative pour échapper aux concentrations toxiques de Cu, les bactéries fixées pédonculées se retrouvent maintenues dans un environnement défavorable (89). Ainsi, les cellules fixées montrent une très forte réponse transcriptionnelle au stress aigu du Cu. Afin de se protéger contre ses effets toxiques, *C. vibrioides* régule positivement plusieurs gènes dont la plupart le sont par le facteur σ F (section Introduction. I. 4. b.) (89).

i. Système PcoAB

Le système Pco est retrouvé chez *E. coli* (95) et *P. aeruginosa* (97) sous forme d'opéron *pcoABCDRSE*, codant respectivement pour une MCO PcoA, un système d'extrusion PcoB, une chaperonne périplasmique PcoC (84), un importateur de Cu PcoD (84), un TCS PcoRS et une deuxième chaperonne périplasmique PcoE (97). Cependant chez *C. vibrioides*, le système Pco ne comprend que PcoA et PcoB. Ensemble, ce système permet d'oxyder le Cu⁺ toxique en Cu²⁺ moins toxique, et de le transporter à l'extérieur de la cellule, maintenant une

homéostasie du Cu appropriée (Fig. 29). Bien que chez *C. vibrioïdes*, les systèmes Cue (CueR et CopA) et Cus (CusABC et CusR) soient conservés, le système PcoAB prédomine (98).

Il a été observé que les cellules mobiles présentait une concentration intracellulaire de Cu plus importante que les cellules fixées, suggérant une régulation de l'homéostasie spécifique au morphotype. Contrairement aux autres systèmes impliqués dans la protection contre le Cu, l'opéron *pcoAB* est exprimé de manière indépendante du Cu, mais il est exprimé lors de la différenciation des cellules mobiles à fixées en absence de Cu. Ainsi, la différence de concentration intracellulaire de Cu observée s'expliquerait par cette expression spécifique de PcoA et PcoB dans les cellules fixées, prêt à l'emploi pour la détoxification du Cu (98).

Cette réponse binomiale serait liée aux propriétés intrinsèques des deux morphotypes. En effet, alors que les cellules mobiles seraient capables de fuir vers un environnement plus propice par chimiotaxie négative grâce à leur flagelle, les cellules fixées sont incapables de se détacher des surfaces. Cette stratégie qui s'apparente à celle de la « couverture des paris » déjà discutée plus haut (section Introduction I. 3. D. ii), évite la reprogrammation génétique induite par les stress environnementaux et permet de s'y adapter rapidement (98). L'accumulation de Cu intracellulaire chez les bactéries mobiles servirait de signal interne pour déclencher une réponse chimiotactique négative.

Une fois un environnement plus approprié atteint, les cellules mobiles chargées en Cu se différencient en cellules fixées et expriment le système PcoAB, conduisant à la diminution de la concentration intracellulaire de Cu. Cette diminution chez les bactéries fixées est importante car le stress cuivrique impacte sur la progression du cycle cellulaire en altérant la fonction de protéines clés impliquées (98).

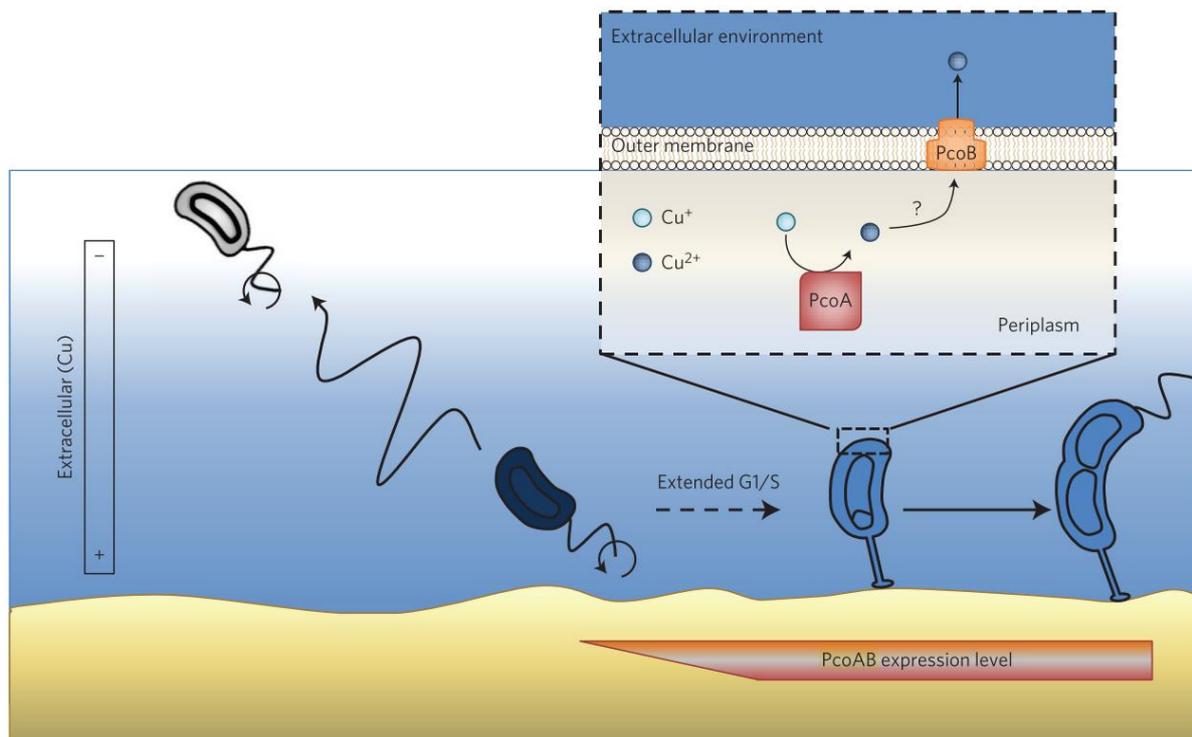


Figure 29. Modèle de la réponse bimodale de *C. vibrioides* (98). Lorsque le Cu est présent en forte concentration dans l'environnement, les cellules fixées expriment fortement le système de défense PcoAB impliqué dans la détoxification et l'efflux du Cu. Les cellules mobiles accumulent du Cu dans leur cytoplasme, agissant comme un signal interne pour échapper aux concentrations toxiques de Cu (chimiotaxie négative). Lorsqu'elles se retrouvent dans un environnement plus favorable, les cellules mobiles se différencient en cellules fixées ce qui active la détoxification du Cu intracellulaire.

ii. Régulon sigF

Le facteur σF est l'une des protéines régulatrices impliquées dans le contrôle de la réponse transcriptionnelle au Cr et au Cd de manière indépendante du stress oxydant (88), au Cu (89), à la phase stationnaire et même à un stress thermique extrême (90). Cependant, il a été montré que le facteur σF n'est pas essentiel à la résistance vis-à-vis du Cr, du Cd et du stress thermique mais qu'il est essentiel à la résistance contre le stress oxydant pendant la phase stationnaire (88).

Les gènes CCNA_03273 et CCNA_03905 de l'opéron σF (section Introduction I. 4. b) codent pour des régulateurs négatifs du facteur σF , nommés NrsF (Negative regulator of sigma F). En absence de stress, σF est séquestré par NrsF, et en présence de stress, il est libéré de la membrane pour compléter l'ARN polymérase et transcrire son régulon. NrsF est composée de six segments transmembranaires. Deux résidus Cys conservés dirigés vers le périplasm suggèrent un rôle putatif dans le processus de perception du Cu et transduction du signal conduisant à la libération de σF . En effet, des substitutions de ces résidus en Ser provoquent une accumulation de σF dans la fraction soluble des cellules. Cependant, les détails de la détection moléculaire des métaux restent inconnus (88). Bien que la transcription du facteur

σF ne soit pas fortement autorégulée, la stabilité de son produit joue un rôle dans la réponse au stress, notamment le stress lors de la phase stationnaire. FtsH est une protéase de la membrane interne dont le niveau diminue à mesure que les cellules entrent dans la phase stationnaire, conduisant à l'accumulation de σF (90).

Le régulon σF comprend le cluster CCNA_03273, CCNA_03905, CCNA_03362, CCNA_03363-CCNA_03366 codant respectivement pour deux NrsF, le facteur σF , un opéron homologue aux opérons GIG, le cluster CCNA_02999-03001 codant un opéron partiellement homologue (88), le cluster CCNA_02834-02833 codant pour un système de méthionine sulfoxyde réductase MsrPQ (89), le gène *msrA* codant pour une méthionine sulfoxyde réductase (MsrA), le gène *sodA* codant pour une superoxyde dismutase à manganèse SodA(Mn), et un gène codant pour une anhydrase carbonique putative. La plupart de ces protéines sont impliquées dans la protection contre le stress oxydant (90).

iii. Autres systèmes d'homéostasie chez *C. vibrioides*

L'exposition des bactéries fixées au Cu induit aussi l'expression de gènes de résistance aux métaux comme l'arsenic (As) et le tellure (Te). Des opérons *czc* (cobalt, zinc, and cadmium) et *czr* (cadmium and zinc resistance), impliqués dans la résistance au Ni et au Co, au Zn et au Cd sont également induits par le stress au Cu. De plus, divers systèmes de résistance aux antimicrobiens comme des transporteurs ABC, sont induits par le Cu (89).

Le Cu induit aussi l'expression de gènes impliqués dans la réponse au mauvais repliement des protéines, comme les chaperonnes DnaK, DnaJ et leurs homologues, les chaperonnes GroEL et GroES, la thiorédoxine oxydoréductase CnoX qui transfère les protéines dépliées vers DnaK/J et GroEL/ES, et les protéases générales Clp, Hsl et Lon (89).

Outre les systèmes présents dans le régulon σF , *C. vibrioides* régule positivement d'autres systèmes en lien avec le stress oxydant. Le régulateur majeur de la réponse au stress oxydant OxyR est régulé positivement dans les cellules fixées et les cellules mobiles, et induit l'expression de la catalase KatG et du système alkyl hydroperoxydase AhpCF. KatG catalyse la dismutation du H₂O₂ généré par SodA en O₂ et en H₂O, et AhpCF réduit les peroxydes et le peroxy-nitrite. D'autres systèmes comme des thiorédoxines, des glutarédoxines et la synthèse de glutathion sont régulés positivement pendant un stress cuivrique (89).

Bien que certains de ces systèmes, comme GroES/EL DnaK/J, et KatG soient surexprimées en présence de Cu dans les cellules fixées, ils sont exprimés de manière constitutive dans les cellules mobiles. Chez les cellules mobiles, ces systèmes de protection cellulaire produits à un niveau d'expression basal permettraient à la fois de maintenir un état rédox intracellulaire plus réducteur, et de rendre ces cellules moins sensibles au Cu malgré son accumulation, pour maintenir une chimiotaxie négative (89).

3. Lien entre le cuivre, le stress oxydant et cette nouvelle famille de RiPP

Ainsi cette nouvelle famille de RiPP, par le biais du Cu et de sa toxicité, est liée indirectement au stress oxydant. Néanmoins, les opérons codant pour cette nouvelle famille de RiPP présentent un lien plus direct avec le stress oxydant chez *C. vibrioides* (90), *Shewanella algae* (83) et *Haemophilus influenzae* (99).

Chez *C. vibrioides*, bien que le régulon σF ne soit pas induit directement par les stress oxydants tels que le H_2O_2 , l'hydroperoxyde de tert-butyle tBOOH, le paraquat ou le diamide (88), il est essentiel pour la survie au stress oxydant en phase stationnaire de croissance (89,90). En effet, Alvarez-Martinez *et al.* (2006) ont montré que le mutant $\Delta\sigma F$ était plus sensible à l'exposition à des concentrations élevées d' H_2O_2 en phase stationnaire qu'en phase exponentielle. Lorsqu'elles sont en phase stationnaire, les bactéries sont confrontées à des lésions oxydatives, ce qui induit des systèmes impliqués dans la défense contre le stress oxydant. MrsA et SodA sont impliqués dans la défense contre le stress oxydant et font partie du régulon σF , d'où l'importance de ce régulon dans l'adaptation à la phase stationnaire (90).

Chez la bactérie environnementale Gram-négative *S. algae*, un opéron RiPP du sous-groupe EGKC partiellement homologue à celui de *B. pertussis* est transcrit en présence de chlorate. Les bactéries réductrices de chlorate telles que *S. algae* jouent un rôle dans le cycle biogéochimique du chlore. Ces bactéries peuvent réduire le chlorate ClO_3^- périplasmique en chlorite ClO_2^- et dismuter ce dernier en oxygène et en chlorure Cl^- . Cependant, ClO_2^- , qui est précurseur de l'hypochlorite ClO^- et de l'acide hypochloreux HOCl, constitue une espèce réactive du chlore (reactive chlorine species ou RCS), générant du stress oxydant. Comme le Cu, l'HOCl a une forte affinité pour les thiols, induisant des liaisons disulfures non natives, un mauvais repliement et inactivant des fonctions enzymatiques. L'HOCl interagit aussi avec certains acides aminés pour former du formaldéhyde, ce qui modifie de manière covalente les

protéines. Ainsi, la réponse transcriptionnelle spécifique au chlorate implique des systèmes de défense contre le stress oxydant comprenant MsrPQ, une catalase, le glutathion, une glutathion réductase, une protéine disulfure isomérase, un système de détoxification du formaldéhyde et l'opéron RiPP du sous-groupe EGKC. Cet opéron est composé du gène ACDC_00008870 codant pour le précurseur, ACDC_00008880 pour B1, ACDC_00008890 pour C1 et est dépourvu de gène *doxX*. Un gène *doxX* est présent ailleurs dans le génome et son expression est aussi induite lors d'une exposition au chlorate. De la même manière que pour *C. vibrioides*, cet opéron, *doxX* et *msrPQ* sont régulés par un système σ de type ECF/anti- σ , mais répondent aux produits de réduction du chlorate (83).

Chez *H. influenzae*, un opéron RiPP du sous-groupe EGKC partiellement homologue à celui de *B. pertussis* a été retrouvé transcrit en présence d'acide hypochloreux HOCl et de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (99) ainsi que lors d'une infection des cellules épithéliales respiratoires humaines et murines (100).

Les bactéries pathogènes telles que *H. influenzae* sont soumises au stress oxydant induit par l'hôte par la libération de ROS et de RCS comme le ClO⁻, l'O₂⁻ et l'H₂O₂. La réponse transcriptionnelle associée à ce stress implique la régulation par un système σ /anti- σ composé du facteur σ de stress de l'enveloppe RpoE2 et de l'anti- σ HrsE répondant à l'HOCl, l'H₂O₂ et au paraquat chez *H. influenzae*. Le facteur RpoE2 contrôle l'expression de plusieurs systèmes de défense contre le stress oxydant comprenant MsrAB, un transporteur DMT (médicament/métabolite), une autre méthionine sulfoxyde réductase périplasmique MtsZ, SodA, des protéines de réparation des dommages périplasmiques, et même certains gènes contrôlés par OxyR comme ceux de la catalase (*hktE*), de la peroxirédoxine (*pgdX*) et de la protéine DPS de type ferritine (*dps*). Le facteur RpoE2 contrôle aussi l'expression d'un opéron RiPP du sous-groupe EGKC composé du gène RS07455 codant pour DoxX, RS07460 pour le précurseur, RS07465 pour B1 et RS07470 pour C1. Chez *H. influenzae*, Nasreen et al. (2021) ont montré que le mutant Δ RpoE2 n'était pas plus sensible que son parent au stress oxydant *in vitro* mais qu'il présentait des niveaux d'infection pulmonaire en modèle murin altérés (99).

Ahearn *et al.* (2019) avaient identifié ce RiPP comme un facteur de virulence exprimé à la surface des cellules bactériennes. Son inactivation avait entraîné une diminution de 76 % de la capacité de *H. influenzae* à entrer dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, indépendamment de la survie intracellulaire ou de l'adhésion aux cellules, soutenant son implication dans l'infection de l'hôte (100). Plus récemment, Manley *et al.* (2024) ont démontré que ce facteur de virulence présentait six Cys modifiées en oxazolone thioamide, capables de

coordonner trois ions Cu^+ dans une géométrie tétraédrique, de la même manière que les méthanobactines. Le Cu est important dans les relations hôte-pathogène car il est à la fois nécessaire aux bactéries et utilisé par l'hôte comme défense, soutenant l'implication de ce RiPP dans l'infection de l'hôte. Malgré cela, son rôle exact reste inconnu (101).

Objectifs de la thèse

L'utilisation des RiPPs dans le monde microbien est très variée : ils sont retrouvés dans la compétition, la communication, les interactions avec un hôte et dans des fonctions physiologiques (4). Cependant, des fonctions dans la protection contre les métaux de transition, notamment le Cu, n'ont pas encore été décrites et caractérisées.

Au travers de cette introduction, nous avons pu voir qu'une nouvelle famille de RiPP pourrait être impliquée dans la protection contre les métaux comme l'Au ou le Cu car, à l'exception de celui de *B. pertussis*, ces opérons sont régulés positivement lors d'une exposition à ces métaux de transition. Le Cu, contrairement à l'Au, présente une biodisponibilité élevée dans l'environnement et est un acteur important à l'interface hôte-pathogène.

Dans le but de caractériser la fonction et la biogenèse d'une nouvelle famille de RiPP, nous avons utilisé comme modèle *C. vibrioides*, une bactérie environnementale. *C. vibrioides* présente deux opérons RiPPs régulés par des métaux, dont l'un est complètement homologue et un est partiellement homologue à celui de *B. pertussis*. La croissance relativement rapide, les connaissances et les outils développés chez cette bactérie font d'elle un bon modèle d'étude.

Afin de caractériser cette nouvelle famille de RiPP, le premier objectif de cette thèse a été de déterminer la fonction et les modifications post-traductionnelles de cette nouvelle famille de RiPP. Un deuxième objectif de la thèse a été de caractériser la biogénèse du RiPP. Bien que la présence d'un peptide signal Sec ait été signalée pour certaines RiPPs eucaryotes, cette caractéristique n'a pas été retrouvée dans les RiPPs bactériens. Ainsi, cette originalité soulève la question de la compétition entre l'installation des modifications post-traductionnelles dans le cytoplasme et l'exportation vers le périplasme qui sont orchestrées dans la bactérie.

Suite aux travaux effectués sur cette nouvelle famille de RiPP, nous avons nommé cette nouvelle famille « Bufferine ». Ce terme a donc été utilisé tout au long de cette thèse.

Résultats

I. Caractérisation de la fonction et des modifications des bufferines chez *C. vibrioides*

1. Recherche des conditions d'expression des opérons *buf1* et *buf2*

a. Recherche des inducteurs des opérons *buf1* et *buf2*

La transcription des opérons de *C. vibrioides* est régulée par un système σ /anti- σ . L'activité de σ^F est régulée par l'anti-sigma NrsF, de manière négative par séquestration (section Introduction I. 4. b.) (86,88,89). L'expression des deux opérons, *buf1* (sous-groupe DUF2282) et *buf2* (sous-groupe RiPP_6/12Cys) (section Introduction I. 4. b.) a été mesurée de façon indirecte par des fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur *lacZ*. Les bactéries ont été cultivées pendant 16 h dans différentes conditions et l'activité β -galactosidase a été mesurée. Différentes concentrations de métaux (CuSO_4 , FeSO_4 , MnCl_2 et ZnSO_4) et d'oxydants ($\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ produits par la réaction de la xanthine oxydase avec l'hypoxanthine (Fig. 30), H_2O_2 , diamide et HOCl) ont été testées.

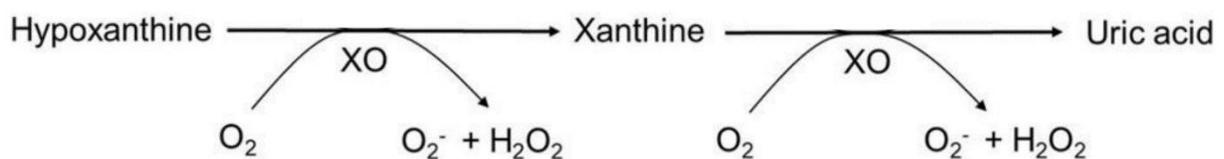


Figure 30. Schéma de la réaction enzymatique catalysée par la Xanthine oxydase (102).

Ces concentrations ont été choisies suite à des tests préliminaires de croissance comme étant les plus élevées possibles ayant des effets modérés sur la croissance liquide de *C. vibrioides*.

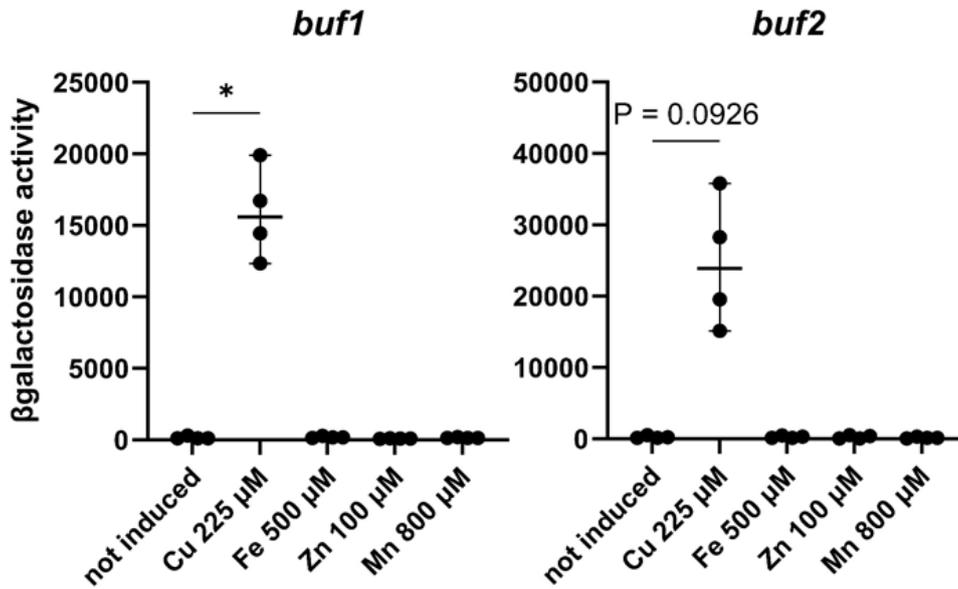


Figure 31. Activités β -galactosidase en présence de différents métaux, reflétant l'induction de l'expression de *buf1* et *buf2*. Les métaux ont été appliqués sous forme de sels de sulfate ou de chlorure.

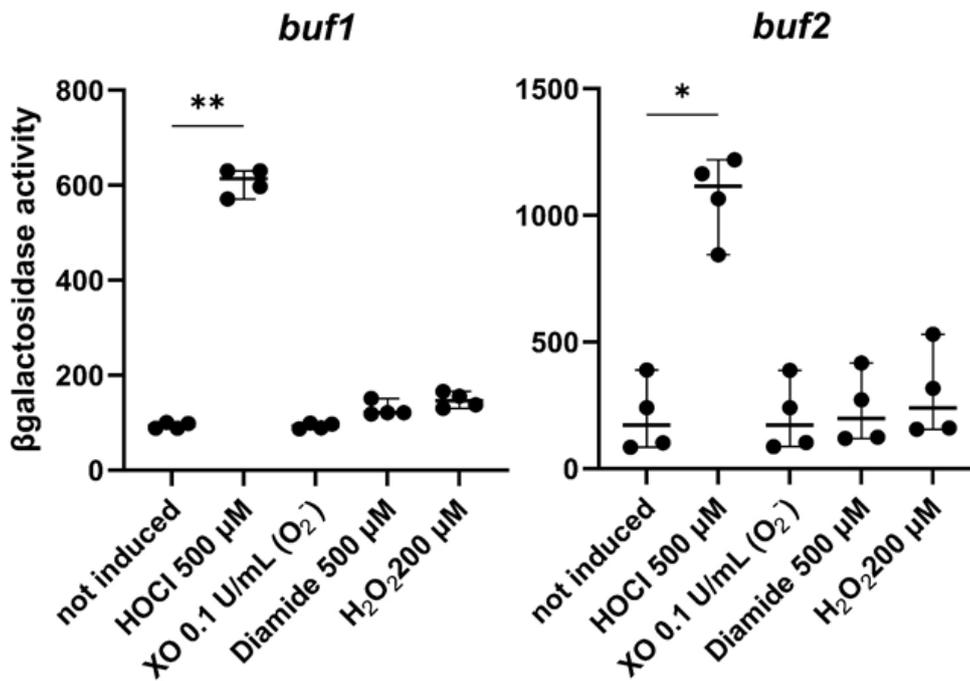


Figure 32. Activités β -galactosidase en présence de différents stress oxydants, reflétant l'induction de l'expression de *buf1* et *buf2*.

Les fusions transcriptionnelles ont permis de montrer que les opérons sont induits par le CuSO_4 spécifiquement parmi les métaux testés (Fig. 31) et par l'HOCl parmi les stress

oxydants (Fig. 32). Cependant, l'induction par le Cu est nettement plus forte que par HOCl. Comme le Cu, l'HOCl induit des carbonylations et des liaisons disulfures non natives (103). Deux résidus Cys hautement conservés dans la protéine NrsF pourraient jouer un rôle putatif de senseurs de ces stress, résultant en la transduction d'un signal qui conduit à la libération de σF . En effet, des substitutions de ces résidus en Ser provoquent une accumulation de σF dans la fraction soluble des cellules. Ainsi, la modification de conformation de ces deux Cys pourrait entraîner l'induction des opérons, mais cela n'a pas été démontré (section Introduction. III. 2. b. i) (88).

Différentes concentrations de CuSO_4 (25, 50, 75 et 100 μM) ont été testés afin de déterminer une concentration qui induirait les bufferines sans ralentir la croissance.

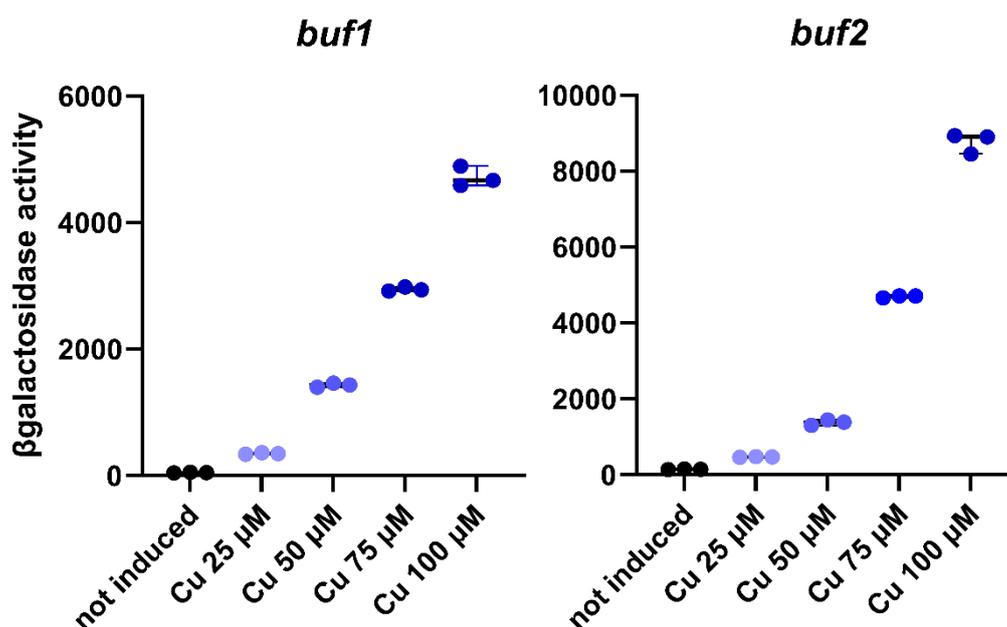


Figure 33. Activités β -galactosidase en présence de différentes concentrations de CuSO_4 , reflétant l'induction de l'expression de *buf1* et *buf2*.

Les fusions transcriptionnelles ont permis de montrer que les opérons *buf1* et *buf2* sont induits proportionnellement à la concentration de Cu et ce, dès 25 μM de CuSO_4 (Fig. 33). La concentration de 100 μM a été choisie afin d'induire l'expression des bufferines dans certains protocoles.

La forme du Cu (Cu^+ ou Cu^{2+}) induisant les opérons reste inconnue. Seul le Cu^{2+} est soluble et est rajouté sous forme CuSO_4 aux cultures. Les cultures ont été faites avec une forte oxygénation, par conséquent le Cu retrouvé dans le périplasma, où sont localisées les Cys

de NrsF, est probablement au moins en partie sous forme Cu^{2+} . Cependant, Cu^{2+} est naturellement réduit en Cu^+ , sensiblement plus toxique, par des agents réducteurs de la chaîne respiratoire (section Introduction. III. 1.) lors de son passage vers le cytoplasme. L'induction des opérons *buf* a donc été vérifiée avec le Cu^+ . Les mêmes concentrations de Cu (10, 25, 50 et 100 μM) ont été réduites à l'aide de 200 μM d'acide ascorbique dans le milieu de culture PYE, afin de tester l'induction des bufferines avec le système rapporteur. Parallèlement, la concentration du Cu^+ présente dans le milieu a été déterminée par un test colorimétrique impliquant le chélateur 2,2-bicinchoninic acid (BCA), qui forme un complexe coloré avec Cu^+ (utilisé ultérieurement, section Résultats. I. 4. c.).

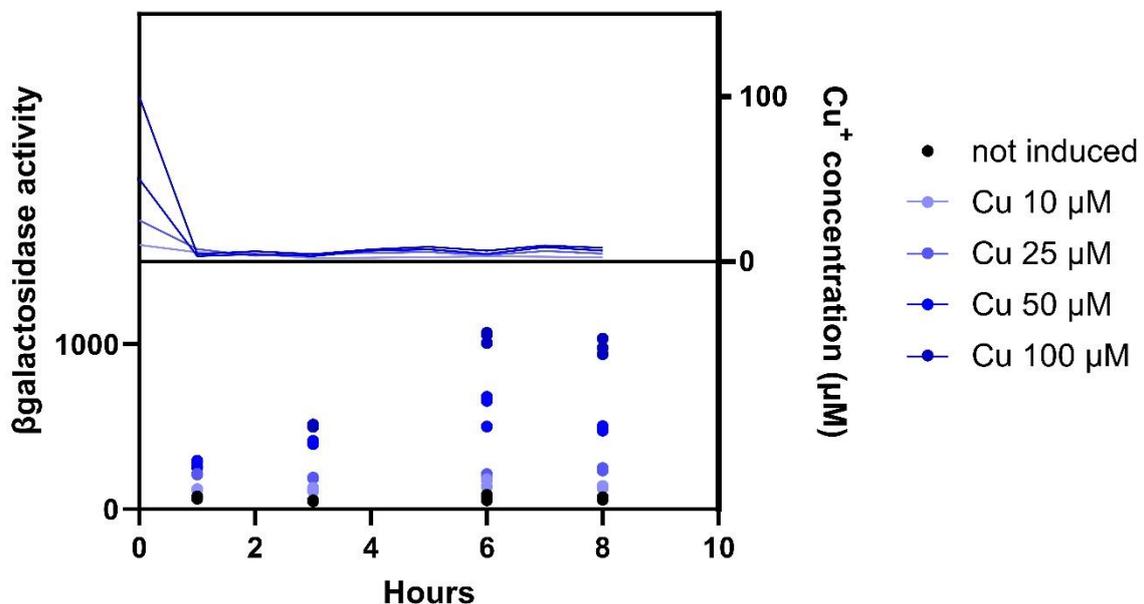


Figure 34. Etude de la stabilité du cuivre Cu^+ dans le milieu PYE et résultats des activités β -galactosidase induites. La concentration de Cu^+ dans le milieu a été mesurée par spectrophotométrie : l'absorbance maximale du complexe Cu-BCA_2 est de 562 nm. Les activités β -galactosidase reflètent l'induction de l'expression de *buf1*.

La fusion transcriptionnelle avec *buf1* a permis de montrer que cet opéron est induit proportionnellement à la concentration de Cu et au temps d'exposition (Fig. 34). Cependant, les concentrations de Cu^+ mesurées montrent une diminution drastique au bout d'une heure. Cette diminution pourrait être s'expliquer à la fois par l'importation d'une partie du Cu par les bactéries et par la réoxydation du Cu^+ en Cu^{2+} . En effet, comme *C. vibrioides* est strictement aérobic, une bonne oxygénation du milieu de culture est nécessaire pour obtenir une bonne densité bactérienne. La forme du Cu, Cu^+ ou Cu^{2+} , ayant induit l'opéron *buf1* dans ces

conditions, reste incertaine et aucune conclusion sur l'induction des bufferines par le Cu⁺ ne peut être tirée.

En vue de localiser les bufferines et de les produire et les purifier pour identifier leurs modifications chez *C. vibrioides*, l'induction de Buf1 et de Buf2 par le Cu ou par l'HOCl peut poser plusieurs problèmes. En plus d'induire du stress chez les bactéries, le Cu peut interagir avec les colonnes de chromatographie de type Ni, rendant difficile la purification, et l'HOCl induit l'oligomérisation des protéines. C'est pourquoi, une alternative a été mise en place.

b. Surexpression du facteur sigF

Afin d'obtenir des bactéries exprimant *buf1* et *buf2* sans induire de stress, un plasmide répliquatif chez *C. vibrioides* contenant le gène sigF sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG a été construit. Différentes conditions de culture ont été testées afin de déterminer les concentrations en IPTG qui induiraient une transcription similaire à celle induite par le Cu. Les fusions transcriptionnelles ont permis de montrer qu'une induction à 100 µM d'IPTG pendant 16 h était semblable à l'induction à 225 µM de Cu pendant 16 h (Fig. 35).

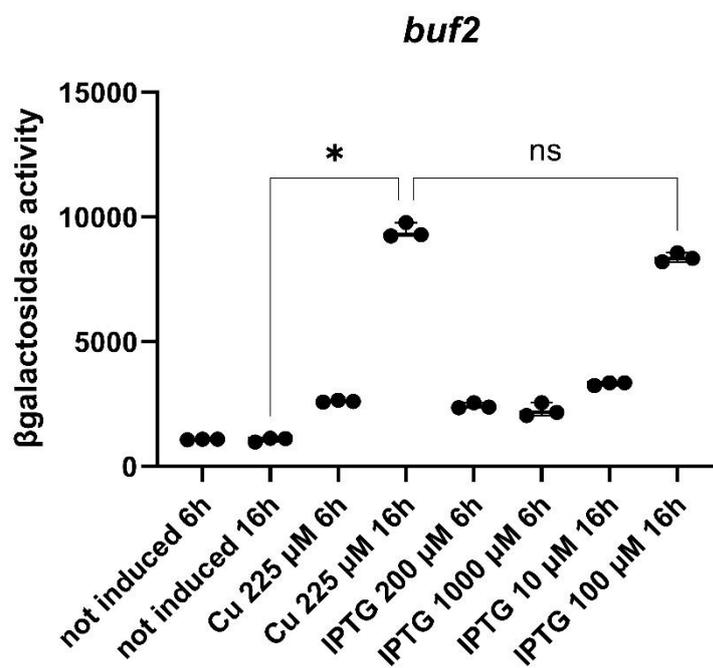


Figure 35. Activités β -galactosidase en présence de cuivre ou d'IPTG pendant 6 h ou une nuit, reflétant l'induction de l'expression de *buf2*.

Les résultats de Maertens et al. (2021) ont montré que le régulon Cu était plus réactif en milieu pauvre M2G qu'en milieu riche PYE (88). Différentes conditions de culture ont été testées afin de déterminer si des cultures en M2G permettaient d'obtenir une meilleure induction des bufferines que des cultures en PYE. Les fusions transcriptionnelles ont permis de montrer que les bufferines étaient mieux induits dans le PYE que dans le M2G, dans nos conditions (Fig. 36).

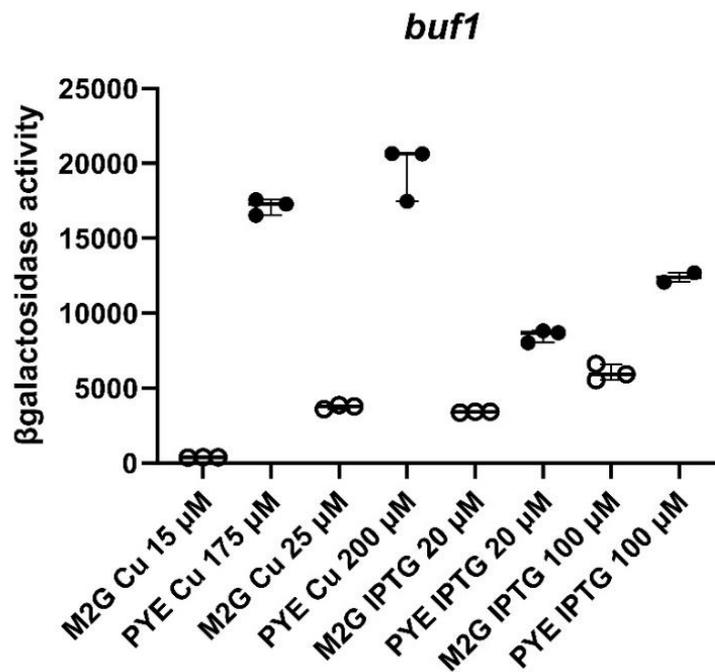


Figure 36. Activités β-galactosidase en présence de CuSO₄ ou d'IPTG pendant une nuit en milieu pauvre M2G ou en milieu riche PYE, reflétant l'induction de l'expression de *buf1*.

2. Recherche de la fonction de Buf1 et Buf2

Afin d'étudier le rôle des bufferines, des mutants de délétion ont été construits par échange allélique. Cette méthode a permis de déléter chacun des deux opérons (souches avec un seul opéron KO, nommées *buf1* et *buf2* pour l'opéron resté fonctionnel) ou les deux opérons ensemble (mutant nommé DKO). Dans les souches avec un seul opéron fonctionnel, les enzymes de modification de l'opéron restant ont aussi été délétées : ces deux souches nommés *buf1(A)* et *buf2(A)*, doivent donc produire chacune un seul précurseur non modifié.

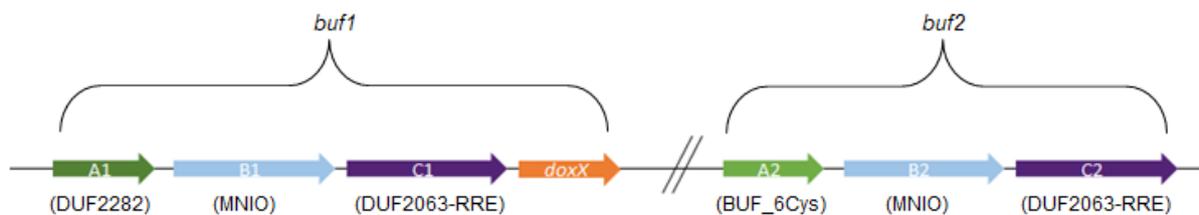


Figure 37. Représentation schématique des opérons de bufferine. L'opéron de quatre gènes avec le précurseur DUF2282 a été nommé *buf1* et l'opéron de trois gènes avec le précurseur BUF_6Cys a été nommé *buf2*. Les gènes codant pour le précurseur, l'enzyme MNIO et la protéine DUF2063-RRE ont été nommés respectivement A, B et C.

a. Fonction des bufferines dans la protection contre le stress cuivrique

i. Culture en présence de cuivre

Pour les tests phénotypiques, les souches testées ne contiennent pas le plasmide SigF, l'expression des opérons est obtenue avec les inducteurs naturels. Le premier phénotype testé est la culture en excès de Cu. Pour cela, des suivis de croissance en milieu de culture PYE ont été réalisés par le lecteur de plaque SPARK TECAN en présence ou en absence de 225 μM de CuSO_4 .

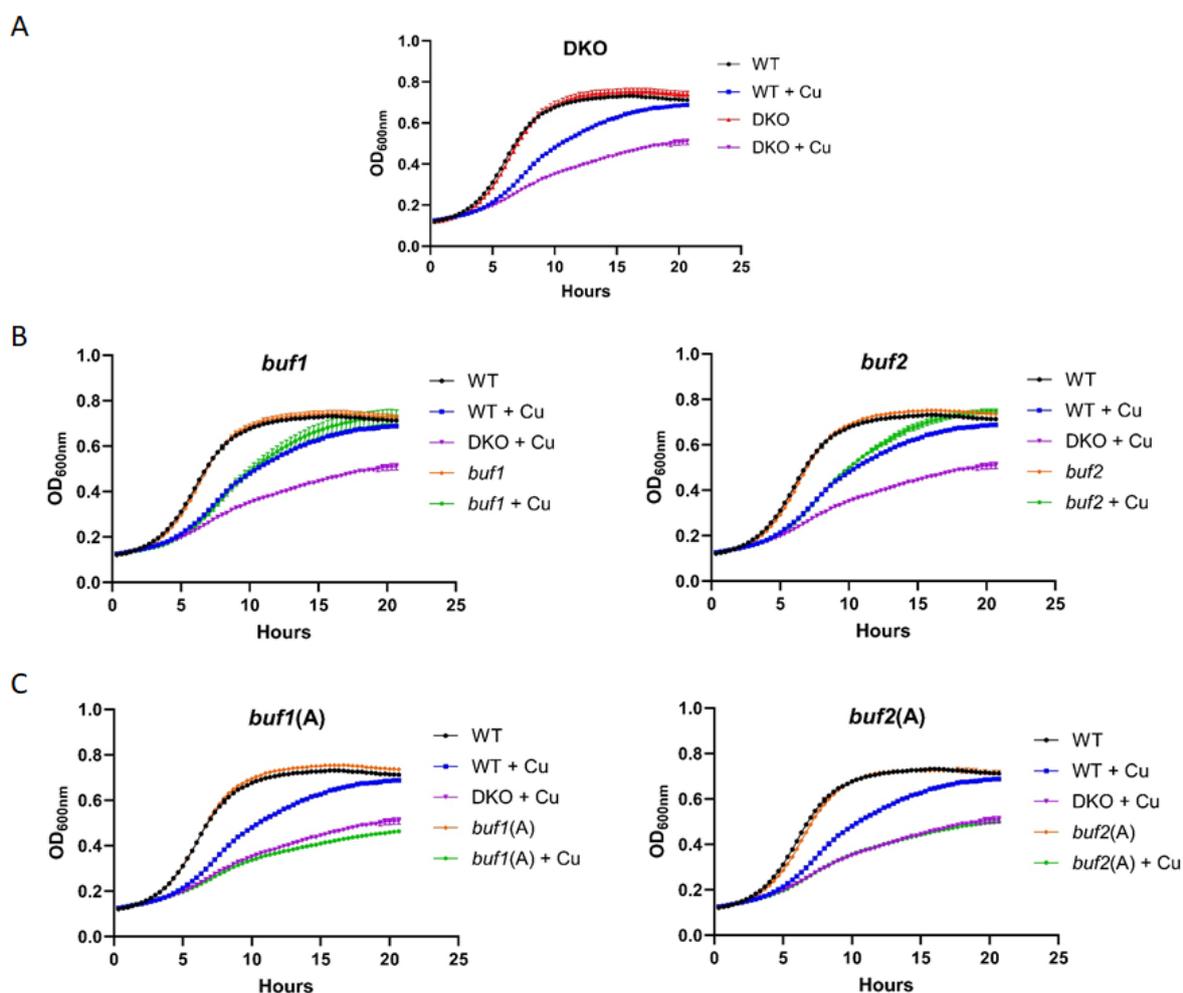


Figure 38. Suivi de croissance en présence ou en absence de CuSO_4 à $225 \mu\text{M}$ en milieu de culture PYE. A. Comparaison du DKO avec le WT. B. Comparaison des simples KO (*buf1* et *buf2*) avec le WT et le DKO. C. Comparaison des mutants précurseurs (*buf1(A)* et *buf2(A)*) avec le WT et le DKO.

Dans la figure 38A, en absence de Cu, les souches WT et DKO présentent des croissances similaires. En présence de Cu, les souches WT et DKO poussent moins vite, et la souche DKO est la plus affectée. Ces courbes suggèrent donc que les bufferines ont un rôle de protection contre l'excès de Cu. Dans la figure 38B, en absence ou en présence de Cu, les deux mutants simples KO *buf1* et *buf2* ont des croissances similaires à celles de la souche WT dans les mêmes conditions. Ceci suggère que les deux opérons RiPP ont des fonctions redondantes. Dans la figure 38C, en absence de Cu, la souche WT et les mutants n'exprimant chacun qu'un précurseur de RiPP, *buf1(A)* et *buf2(A)*, ont des croissances similaires. En présence de Cu, les deux mutants ont une croissance similaire à celles de la souche DKO, suggérant qu'il est nécessaire que les précurseurs soient modifiés pour qu'ils soient fonctionnels.

Comme expliqué plus haut le Cu est davantage sous forme Cu^+ , et donc plus toxique. Etant donné que *C. vibrioides* est une bactérie aérobique, la concentration en oxygène a été diminuée en supprimant l'agitation des cultures et différentes concentrations de Cu (10, 25, 50, 100 et 200 μM) ont été réduites à l'aide de 200 μM d'acide ascorbique dans le milieu de culture PYE (Fig. 39).

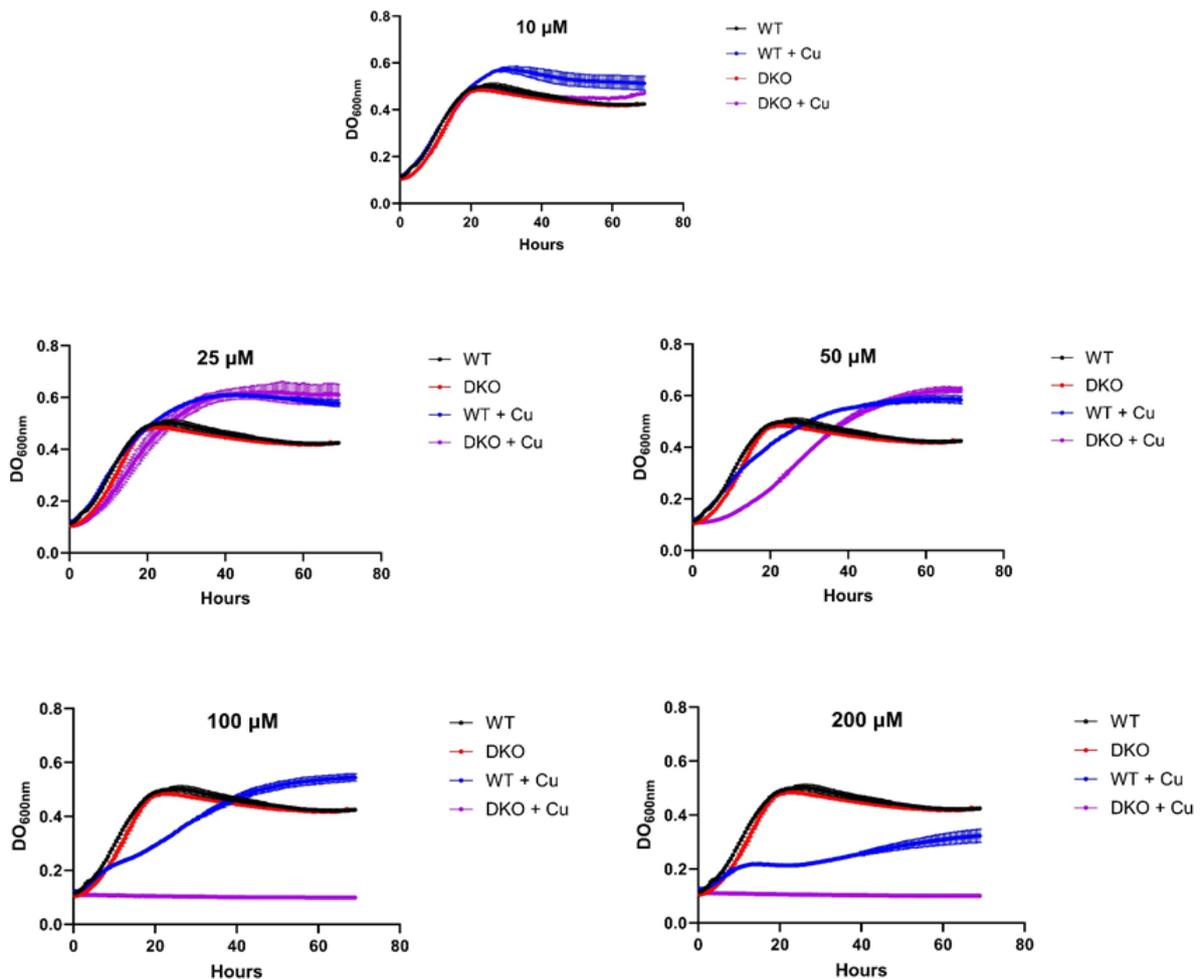


Figure 39. Suivi de croissance en présence ou en absence de différentes concentrations de CuSO_4 en présence de 200 μM d'ascorbate en milieu de culture PYE. Pour limiter l'oxydation du Cu^{2+} , les cultures ont été réalisées sans agitation.

En absence de Cu, les souches WT et DKO présentent des croissances similaires. En présence de Cu, les souches WT et DKO poussent moins vite, et la souche DKO est la plus affectée voire n'est plus capable de pousser. Ces courbes suggèrent donc que les bufferines ont un rôle de protection contre l'excès de Cu, à la fois sous la forme Cu^{2+} et sous la forme Cu^+ . De plus, les résultats obtenus montrent que les bactéries sont plus sensibles en présence de Cu^+ qu'en présence de Cu^{2+} . En effet, on obtient des courbes de croissance assez similaires pour 225 μM de Cu^{2+} et 50 μM de Cu^+ .

Afin de vérifier le lien entre le phénotype DKO et l'absence des bufferines, la souche DKO a été complétée par l'opéron *buf1*(ABC), étant donné la redondance des opérons et le caractère non nécessaire de DoxX (section Résultats III. 4.). Dans un premier temps, une complémentation de la souche DKO avec l'opéron *buf1* cloné sur le plasmide pMR10 réplcatif chez *C. vibrioides* et à faible nombre de copies, a été tentée. Cependant, le phénotype WT de croissance en présence de CuSO₄ n'a pas pu être restaurer avec la souche DKO pMR10(A1B1C1), suggérant que le promoteur de *buf1* ne fonctionne pas sur plasmide. Une tentative de complémentation a été faite sur chromosome en plaçant l'opéron *buf1* dans le locus de *buf2* de deux manière différentes : soit l'opéron présente les signaux de traduction de *buf1* avec les signaux de transcription (promoteur) de *buf2* (souche DKO *buf2*(A1B1C1) V1), soit il présente les signaux de traduction et de transcription de *buf1* (souche DKO *buf2*(A1B1C1) V2).

Un anticorps α -BufC1 a été utilisé pour vérifier la production de la protéine C1 et indirectement l'expression de l'opéron *buf1* complet. Après une induction de *buf1* au Cu pendant une nuit, les protéines (fractions solubles et insolubles) des souches WT, DKO et des mutants de complémentation ont été utilisées pour un immunoblot (Fig. 40A). Des suivis de croissance ont été réalisés par le lecteur de plaque SPARK TECAN en présence ou en absence de 225 μ M de CuSO₄ (Fig. 40B).

Les résultats (Fig 40A) montrent que la protéine BufC1 à 27 kDa n'est pas retrouvée dans les souches DKO pMR10(A1B1C1) et DKO *buf2*(A1B1C1) V1, à la différence de la souche DKO *buf2*(A1B1C1) V2. Ainsi, *buf1* ne serait exprimé que dans la souche DKO *buf2*(A1B1C1) V2.

Les courbes de croissance (Fig. 40B) montrent que la souche DKO *buf2*(A1B1C1) V1 a un phénotype semblable à la souche DKO, expliqué par l'absence d'expression de l'opéron. La souche DKO *buf2*(A1B1C1) V2 présente cependant un phénotype WT, établissant le lien entre le phénotype DKO et l'absence des bufferines.

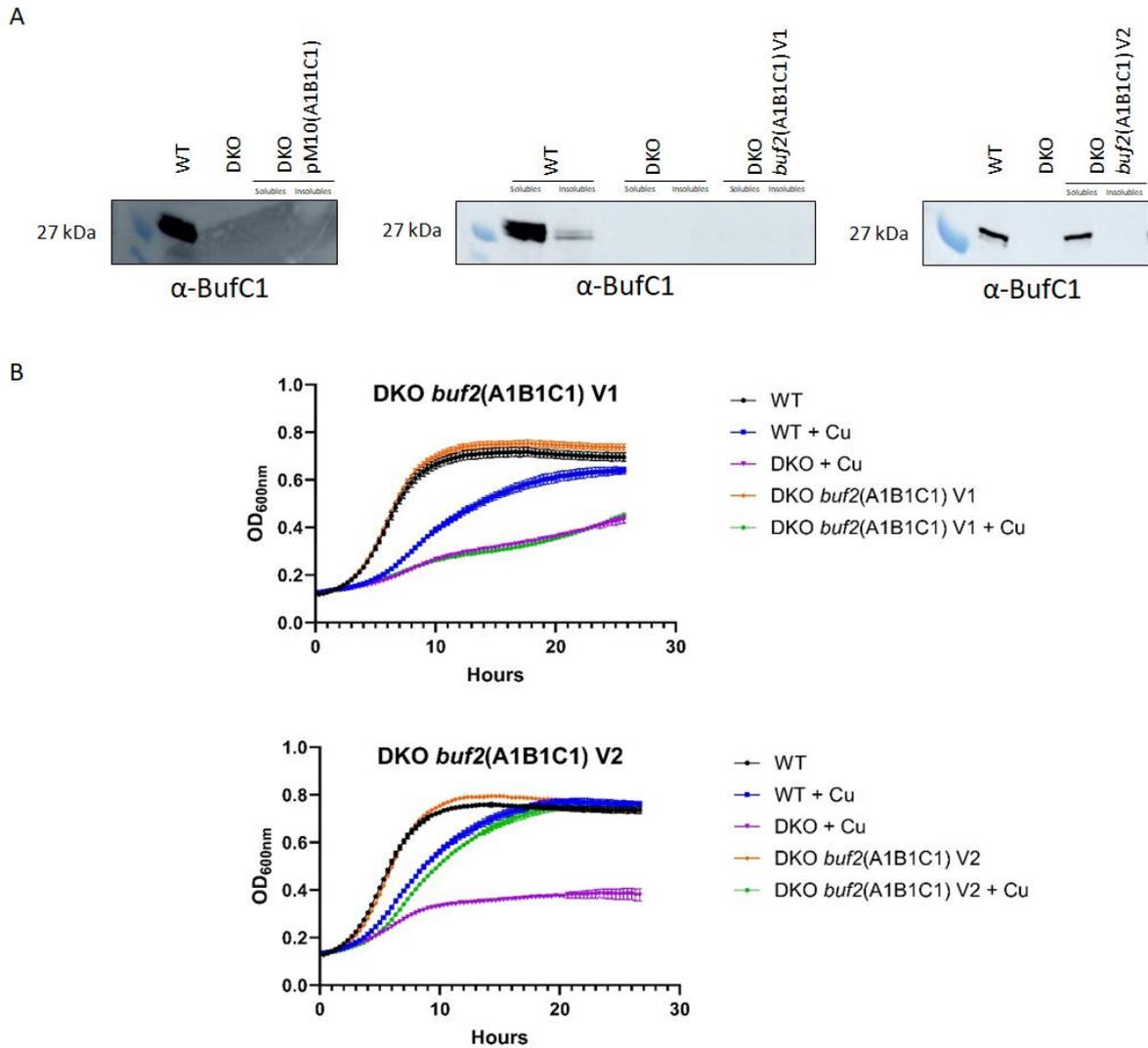


Figure 40. Etudes des mutants de complémentation. A. Western Blot pour détecter la protéine C1 dans les différentes souches. B. Suivi de croissance en présence ou en absence de CuSO_4 à 225 μM en milieu de culture PYE.

ii. Survie après un choc cuivrique

Une autre approche utilisée pour déterminer le rôle des bufferines dans la protection contre le Cu est la survie après un choc. Une étude de Alvarez-Martinez et al. (2006) (90) a montré que le facteur σF chez *C. vibrioides* a un rôle dans la réponse au stress oxydant pendant la phase stationnaire. En effet, la concentration de SigF augmente en fonction de la densité cellulaire, avec un niveau maximal dans les cellules en phase stationnaire après 24 heures de culture (90). Initialement, des chocs cuivriques avaient été effectués sur des cultures de 6 h et de 15 h, puis des chocs cuivriques sur des cultures de 24 heures ont été tentés. Pour les cultures de 6 h et de 15 h, la survie a été mesurée après 30 min d'exposition à 1 mM de Cu. Pour la culture de 24 h, la survie a été mesurée toutes les dix minutes pendant une heure d'exposition à 1 mM de Cu.

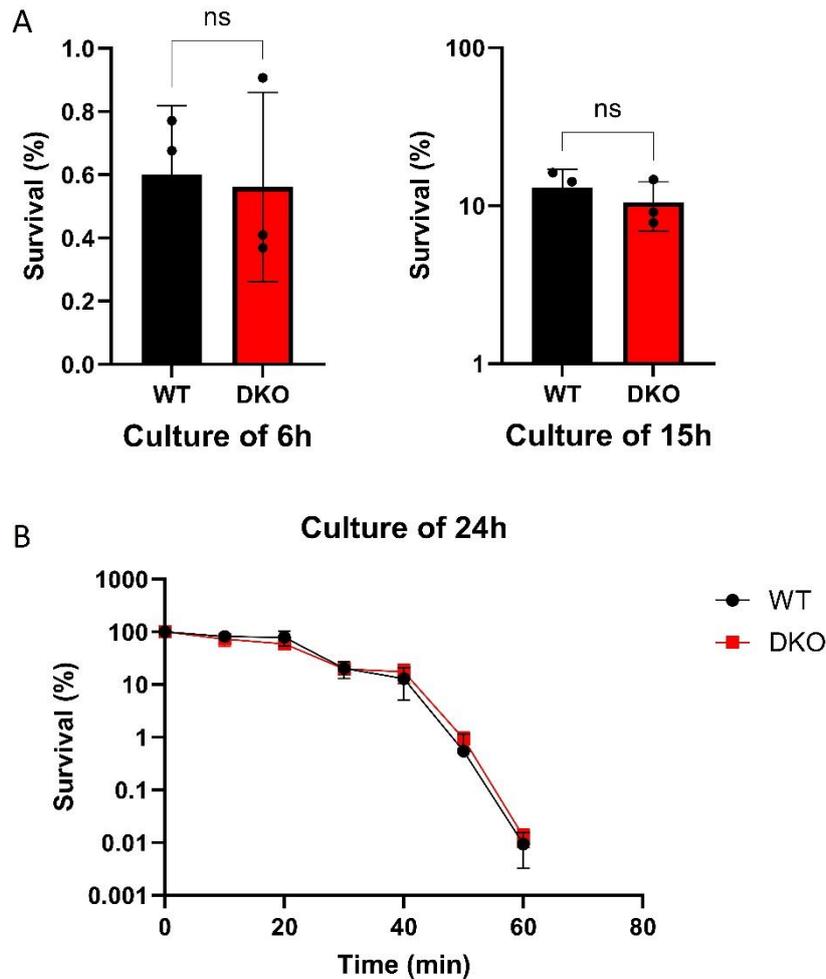


Figure 41. Résultats de survie des souches WT et DKO après un choc cuivrique à 1 mM en milieu de culture PYE. A. Survie après 30 min d'exposition à 1 mM de CuSO_4 . B. Cinétique de survie pendant une heure d'exposition à 1 mM de cuivre.

Les résultats montrent que la survie du WT et du DKO diminue avec le temps d'exposition au Cu (Fig. 41). Cependant, aucune différence de survie n'est constatée entre le WT et le DKO après un choc cuivrique de 1 mM. Ceci laisse supposer que les bufferines ont un rôle dans l'adaptation à un milieu modérément stressant, plutôt que dans la survie à un choc, chez *C. vibrioides*.

Parallèlement, notre collaboratrice Svetlana Dubiley (INSA Toulouse) a mis en place des tests phénotypiques de choc cuivrique chez *E. coli*. Chez *E. coli*, l'opéron *buf1* de *C. vibrioides*, ainsi qu'un opéron codant pour un peptide lasso non pertinent comme témoin négatif ont été clonés dans un plasmide inducible à l'IPTG. La survie des bactéries *E. coli* a été mesurée après 3 h d'exposition à une concentration bactéricide de CuSO_4 (300 μM). L'expression de *Buf1* a amélioré la survie d'*E. coli* exposé au Cu, suggérant un gain de fonction. En microaérobiose,

et en présence de CuSO_4 et d'ascorbate (pour générer Cu^+), Svetlana a également mis en évidence qu'*E. coli* exprimant l'opéron *buf1* survit mieux que la souche contrôle (voir l'article en Annexe).

b. Fonction des bufferines dans la protection contre le stress oxydant

Le stress métallique et le stress oxydant sont intimement liés. Quand les métaux sont en excès dans le cytoplasme, des réactions rédox peuvent induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène (37,95).

i. Culture en présence de stress oxydants et survie après un stress oxydant

Différents stress oxydants ont été utilisés : O_2^- / H_2O_2 produit par la réaction de la xanthine oxydase avec l'hypoxanthine, HOCl, H_2O_2 et diamide. Les conditions testées et les résultats obtenus sont listés dans le tableau 3.

Tableau 3. Conditions de tests phénotypiques utilisées.

Tests phénotypiques	Stress oxydants	Résultats
Cultures agitées	HOCl	Non reproductibles
Cultures agitées	O_2^- / H_2O_2	Non reproductibles
Cultures agitées	Diamide	Non reproductibles
Cultures statiques	HOCl	Non reproductibles
Survie après un choc	HOCl	Non reproductibles

Dans toutes ces expériences, les résultats étaient non reproductibles, que ce soit pour l' O_2^- / H_2O_2 produit par la réaction de la xanthine oxydase avec l'hypoxanthine, l'HOCl ou le diamide. Ces problèmes de variabilité pourraient être dû à une difficulté de standardiser les conditions de ces expériences comme la concentration exacte des ROS ou l'état physiologique des bactéries.

Seule la survie après un choc H_2O_2 a montré des résultats reproductibles (Fig. 42), mais aucune différence n'est constatée entre les souches WT et DKO : leur survie diminue de la même façon en fonction du temps d'exposition.

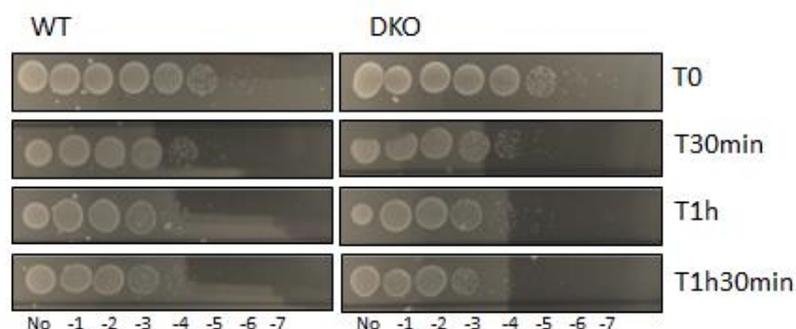


Figure 42. Résultats de survie des souches WT et DKO après un choc H_2O_2 à 50 mM en milieu de culture PYE.

ii. Halos d'inhibition par l'HOCl

Etant donné la difficulté d'obtenir des résultats reproductibles en cultures et en survie après un choc à l'HOCl, un autre protocole a été mis en place. Similaire aux antibiogrammes, ce protocole consiste à déposer quelques gouttes d'une solution d'HOCl à concentration connues sur une pastille placée sur un tapis bactérien. Cependant les résultats ne montrent aucune différence visible entre le WT et le DKO (Tab. 4).

Tableau 4. Résultats des diamètres des halos d'inhibition produit par l'HOCl à différentes concentrations sur les souches WT et DKO.

Concentration	Diamètre WT	Diamètre DKO
0 mM	0 cm	0 cm
50 mM	2.3 cm	2.4 cm
100 mM	1.8 cm	1.8 cm
250 mM	4.3 cm	4.6 cm
500 mM	3.8 cm	3.8 cm
Pur	7.4 cm	7.2 cm

iii. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Le rôle de ces bufferines contre le stress oxydant n'a pas pu être mis en évidence par les expériences de cultures ou de survie après un choc (H_2O_2 , O_2^- , HOCl ou diamide). Cependant, celui-ci pourrait être étudié en quantifiant directement les ROS induites par le Cu dans les deux souches. Une première méthode de quantification des ROS utilise la dichlorofluorescéine (Fig. 43).

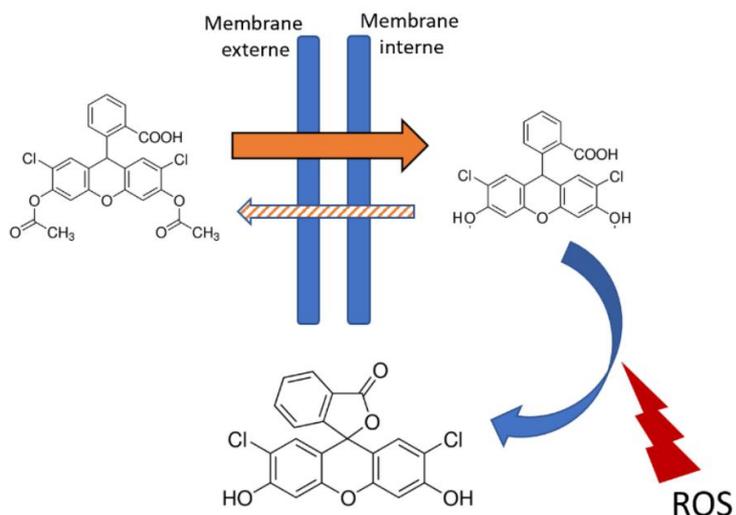


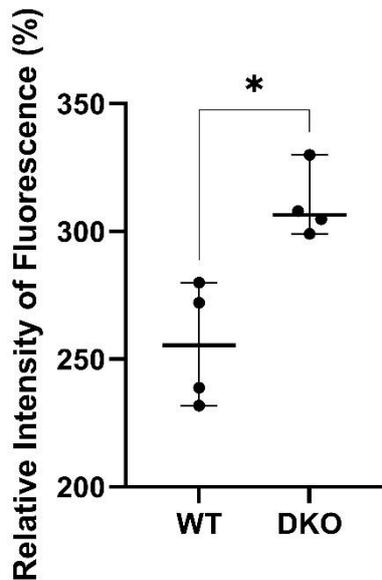
Figure 43. Représentation schématique de la méthode de quantification des ROS par la 2-7-dichlorofluoresceine diacétate dans une bactérie (102).

Les bactéries sont cultivées jusqu'à une DO souhaitée et sont exposées à la 2-7-dichlorofluoresceine diacétate pendant 30 minutes. Celle-ci est importée et modifiée en 2-7-dichlorofluoresceine par les estérases cellulaires. Les bactéries sont lavées et un stress Cu est appliqué. En contact avec des ROS, la 2-7-dichlorofluoresceine est modifiée

en dichlorofluoresceine fluorescente, et la fluorescence est suivie par fluorimétrie au SPARK TECAN.

Différentes conditions ont été testées afin de déterminer le meilleur protocole pour étudier la quantification des ROS. Cependant, différents problèmes ont été rencontrés : la DCFH-DA interagit avec le milieu riche PYE et sa concentration recommandée sature le détecteur du SPARK TECAN. Bien que le problème de milieu ait pu être réglé en utilisant du milieu pauvre M2G, la diminution de la concentration en dichlorofluoresceine diacétate a entraîné une plus grande variabilité dans les résultats. De plus, les résultats de mise au point ont montré que ce composé interagissait directement avec le Cu.

Un autre composé basé sur le même principe, le CellROX™ Deep Red, a été utilisé (104). A l'état réduit, le CellROX™ n'est pas fluorescent, mais il le devient après oxydation par les ROS. Afin d'éviter les éventuelles interactions entre ce composé et le Cu, un protocole reposant sur l'induction naturelle des bufferines en phase stationnaire a été développé. Le facteur σF contrôlant l'expression des bufferines est essentiel à la résistance contre le stress oxydant pendant la phase stationnaire (88,90). Une quantification du stress oxydant a donc été faite sur des bactéries après 24 heures de culture, où SigF atteint son niveau maximal, indépendamment d'un choc cuivrique.



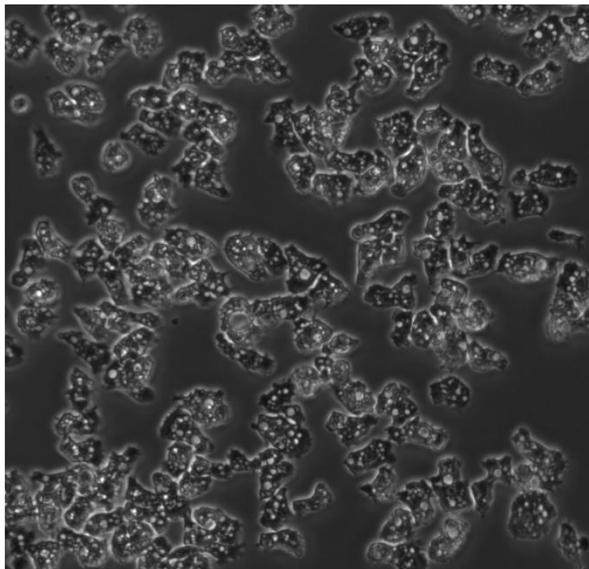
Les fluorescences relatives pour le WT et le DKO ont été calculées par rapport à leurs témoins sans CellROX.

Les résultats montrent une fluorescence plus importante pour le DKO que dans le WT, indiquant une quantité de ROS plus importante dans les bactéries DKO. Ces résultats suggèrent que les bufferines permettent une réduction de la quantité de ROS induits lors de la phase stationnaire (Fig. 44).

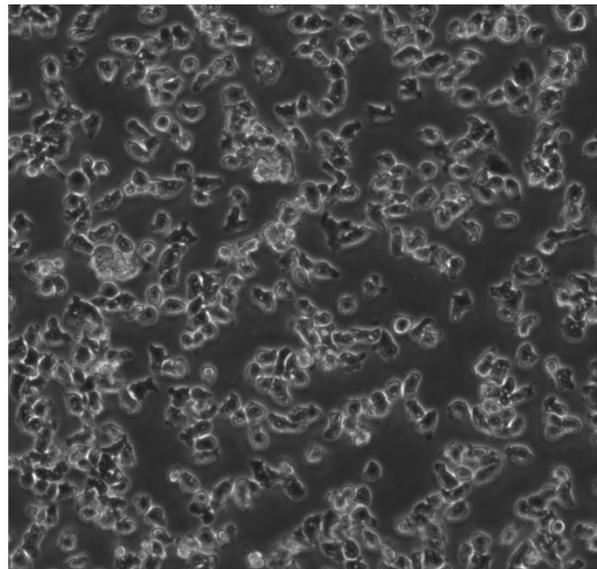
Figure 44. Intensité relative de fluorescence, reflétant la quantité de ROS chez les bactéries WT et DKO. La quantification du stress oxydant a donc été faite sur des bactéries après 24 heures de culture en milieu PYE.

c. Fonction des bufferines dans la protection contre la phagocytose

C. vibrioides est une bactérie environnementale qui partage son environnement avec des amibes (105). Ces protozoaires utilisent notamment comme stratégies de destruction bactérienne l'accumulation de Cu et de radicaux libres dans leurs phagosomes, stratégies similaires aux cellules phagocytaires (106). Afin d'étudier la fonction des bufferines dans la protection contre la phagocytose médiée par les amibes, deux espèces d'amibes modèles ayant chacune un protocole adapté, ont été utilisées : *Acanthamoeba castellanii* et *Dictyostelium discoideum* (Fig.45).



Acanthamoeba castellanii



Dictyostelium discoideum

Figure 45. Images de microscopie optique des amibes *A. castellanii* et *D. discoideum*, grossissement X40.

Le premier protocole, utilisé avec *A. castellanii* mais aussi avec *D. discoideum*, se rapproche du protocole de survie en macrophages. Bien qu'aucune conclusion n'ait pu être tirée concernant une possible différence de survie entre la souche WT et la souche DKO, les essais de mise au point ont permis de tirer des informations sur les interactions entre *C. vibrioides* et ces amibes.

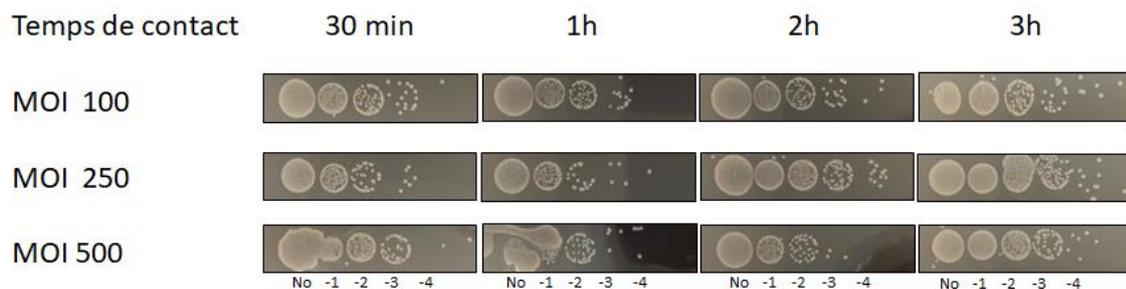


Figure 46. Résultats de mise en contact des bactéries WT avec *D. discoideum*, reflétant le taux d'internalisation. Les nombres de bactéries sont déterminées par dépôt de gouttes de lysats d'amibes ayant ingéré les bactéries.

La première information est que quelle que soit la quantité de bactéries (multiplicité d'infection) mises en contact avec les amibes (*A. castellanii* ou *D. discoideum*), ces dernières ne sont capables d'en internaliser qu'un nombre restreint. Par exemple, on retrouve 15 colonies dans 10 μ L à la dilution 10^{-3} pour une multiplicité d'infection (MOI) de 100 et après un temps de

contact de 30 min, et 6 colonies dans 10 μ L à la dilution 10^{-4} pour une MOI de 250 et d'un temps de contact de 2 h. Une amibe serait capable d'internaliser entre 15 et 60 bactéries pendant les temps de contact utilisés, indépendamment de la quantité de bactéries à disposition (Fig. 46).

La deuxième information est que *C. vibrioides* persiste jusqu'à 3 h dans les amibes *D. discoideum*. Une des mises au point a permis de mesurer 2% de survie des bactéries internalisées après 1h, 0.1% de survie à 3h et 0% de survie à 24h. Malgré cela, aucune information n'a été obtenue concernant une possible différence de survie entre la souche WT et la souche DKO.

Un autre protocole avec *D. discoideum*, décrit dans l'article Dallaire-Dufresne et al. (2011) (107), consiste à déposer une goutte d'amibes sur des boîtes recouvertes de bactéries issues de cultures liquides, puis de mesurer la diminution de densité bactérienne au niveau de ce spot. Les souches WT et DKO ont été utilisées, les différentes boîtes ont été prises en photos de manière standardisée et ont été analysées par Image J afin d'obtenir des résultats quantitatifs.

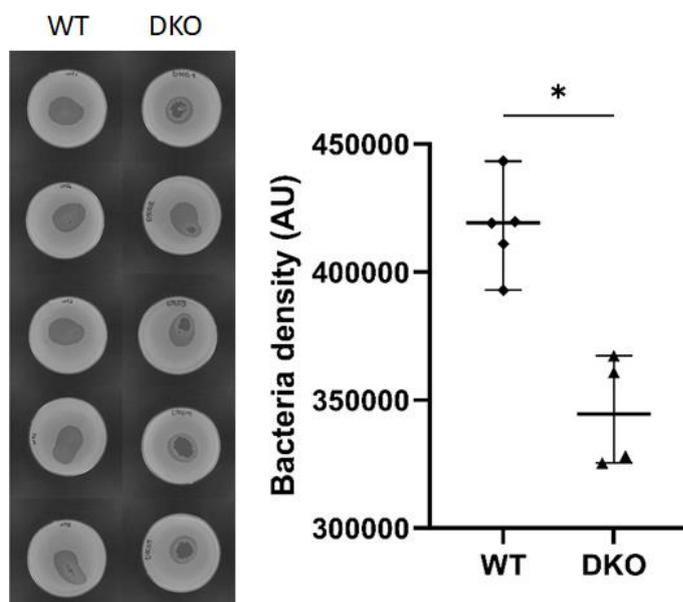


Figure 47. Résultats des lyses bactériennes des souches WT et DKO par les amibes, obtenus après 3 jours d'incubation à 25°C. Ces résultats bruts sous forme de photos et analysés sous forme de graphique reflètent la survie à la phagocytose.

Les résultats bruts se présentent sous forme de spots sur une gélose : dans la région de contact, lorsque les bactéries sont phagocytées par les amibes, une zone de lyse ou de densité bactérienne réduite apparaît. A l'aide d'Image J, les zones de moindre densité ont été délimitées et les nuances de gris ont été quantifiées : si les bactéries sont phagocytées, la densité bactérienne diminue, le fond devient plus foncé donc l'unité de nuance devient plus

faible. Cette quantification des nuances de gris permet d'obtenir un graphique : les résultats montrent une différence significative entre la souche WT et la souche DKO, suggérant que la souche WT résiste plus longtemps à la phagocytose que la souche DKO. En effet, si le nombre de bactéries internalisées est limité et que la souche WT est plus résistante à la lyse dans le phagosome, les amibes seront moins efficaces pour les phagocyter, et donc les plages de lyse seront réduites (Fig. 47).

3. Recherche des modifications de Buf1

a. Localisation des bufferines

Comme les précurseurs de Buf1 et Buf2 possèdent un peptide-signal prédit, leur localisation a été vérifiée. Après une induction des opérons RiPP au Cu pendant une nuit, des fractionnements cellulaires de la souche WT et de la souche DKO ont été effectués afin de séparer le surnageant, le cytoplasme et le périplasme. Les extraits ont été envoyés à nos collaboratrices du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Paris, où notre collaboratrice Dr Séverine Zirah a effectué des analyses par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse (LC-MS). La comparaison des profils du WT et du DKO ont permis de trouver des pics spécifiques du WT, et les masses peptidiques ont été comparées aux séquences protéiques des précurseurs RiPPs (non modifiés), afin de déterminer leur localisation. Cependant, aucune conclusion n'a pu être établie car les résultats étaient trop variables d'une préparation à un autre.

Etant donné les résultats de LC-MS peu concluants, l'efficacité du fractionnement a été vérifiée par Western Blot. Ainsi, après une induction des opérons bufferines au Cu (100 μ M) pendant 6 h ou une nuit, des fractionnements cellulaires de la souche WT ont été effectués afin de séparer le surnageant, le cytoplasme et le périplasme, et des anticorps α -MreB et α -PcoA spécifiques du cytoplasme et du périplasme respectivement, ont été utilisés.

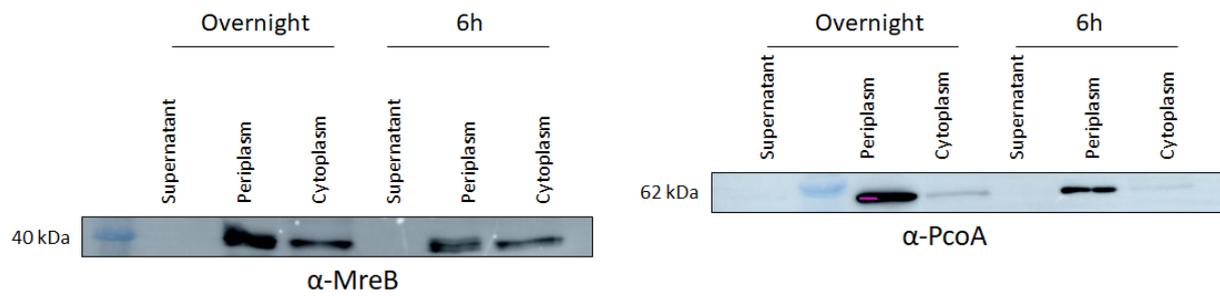


Figure 48. Western Blot obtenus pour les différents compartiments de la souche WT après une induction de 6h ou d'une nuit au cuivre (100 μ M) en milieu de culture PYE. MreB est une protéine cytoplasmique et PcoA une protéine périplasmique.

Les résultats montrent que la protéine MreB, de 40 kDa se retrouve dans la fraction périplasmique et la fraction cytoplasmique et que la protéine PcoA, de 62 kDa, se retrouve surtout dans la fraction périplasmique (Fig. 48). Bien qu'on puisse attendre un peu de PcoA dans le cytoplasme si elle est en cours de traduction, ce serait une forme d'un peu plus grande taille (à cause du signal peptide) que la forme périplasmique. En revanche, la présence de la protéine MreB dans le périplasmique serait dû à une contamination de la fraction périplasmique par la fraction cytoplasmique pendant le processus de fractionnement. Il est possible que le Cu utilisé pour induire l'opéron perturbe le fractionnement. Etant donné ces résultats, le travail sur cellules entières a été priorisé pour la recherche des modifications post-traductionnelles.

Une des particularités de cette nouvelle famille de RiPP est l'absence de gène de transporteur spécifique dans l'opéron, qui pourrait s'expliquer par la présence d'un peptide signal N-terminal dans le précurseur. Cependant, certains logiciels de prédiction indiquent que cette séquence N-terminale correspondrait à un segment transmembranaire : la bufferine serait alors dans le périplasmique mais ancrée dans la membrane plasmique. Afin d'étudier cette possibilité, des fusions traductionnelles du segment N-terminal du peptide BufA1 ou BufA2 avec la protéine rapportrice β -lactamase ont été construites. Ainsi, après une induction des opérons RiPP au Cu pendant une nuit, une ultracentrifugation a été effectuée afin de séparer les protéines solubles des insolubles, et un immunoblot a été effectué avec des anticorps α - β -lactamase.

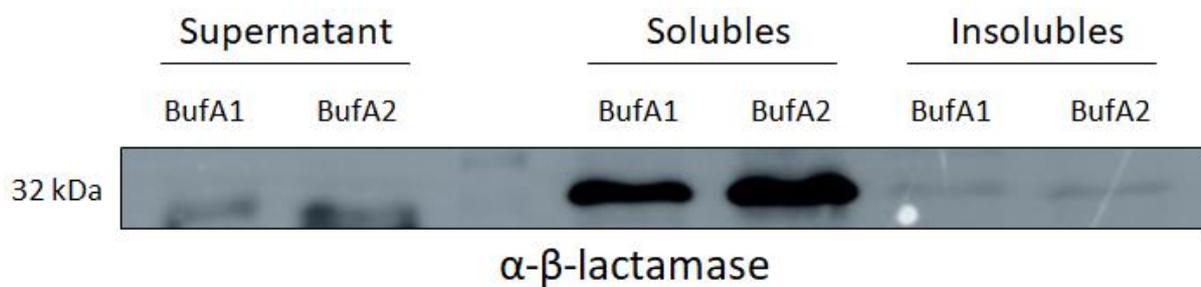


Figure 49. Western Blot obtenus pour les différents compartiments des souches de fusions après une induction d'une nuit au CuSO_4 ($100 \mu\text{M}$) en milieu de culture PYE. La β -lactamase est en fusion traductionnelle avec le peptide signal de Buf1 ou de Buf2.

Les résultats montrent que les fusions Buf- β -lactamase, de 32 kDa, sont retrouvées dans les fractions solubles en grande majorité (Fig. 49). Ceci indique que le peptide signal serait bien clivé, rendant les protéines solubles. Afin d'étudier les modifications, des fractions solubles provenant de cellules entières seront utilisées.

b. Purification des bufferines

Afin de purifier les bufferines pour identifier les modifications qu'elles portent, un 6His-tag a été ajouté à l'extrémité C-terminale ou N-terminale de chacun des précurseurs, dans les souches contenant *buf1* ou *buf2*. Ainsi, si la maturation de ces précurseurs implique un clivage protéolytique d'un côté ou de l'autre du core après sa modification (en plus du clivage du signal peptide), le RiPP mature peut être purifié par chromatographie d'extraits bactériens grâce à l'un des deux tags. Pour vérifier ces quatre constructions, une induction des opérons RiPP au Cu pendant une nuit et une ultracentrifugation ont été effectuées afin de séparer les solubles des insolubles, et un anticorps α -His a été utilisé dans un immunoblot. Les résultats montrent que les bufferines, entre 10 et 15 kDa, sont identifiables lorsque le tag est en position C-terminale, le tag en position N-terminale subissant un clivage protéolytique ou empêchant la production de la protéine mature (Fig. 50).

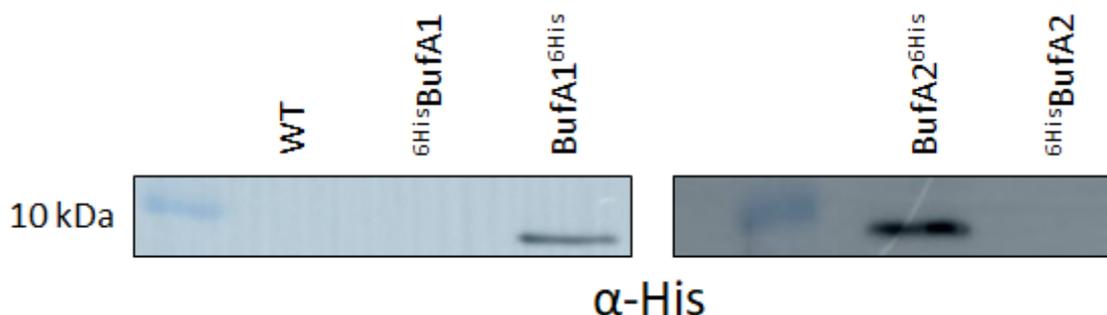


Figure 50. Résultats de Western Blot obtenus pour les différentes constructions après une induction d'une nuit au CuSO_4 ($100 \mu\text{M}$) en milieu de culture PYE.

Les premières purifications des bufferines ont été faites par chromatographie d'affinité sur colonne nickel (Ni^{2+}) après une induction au Cu ($100 \mu\text{M}$) pendant une nuit ou à l' HOCl pendant 3h ($300 \mu\text{M}$). Les résultats de purification ont été analysés sur gel de Coomassie et par Western Blot.

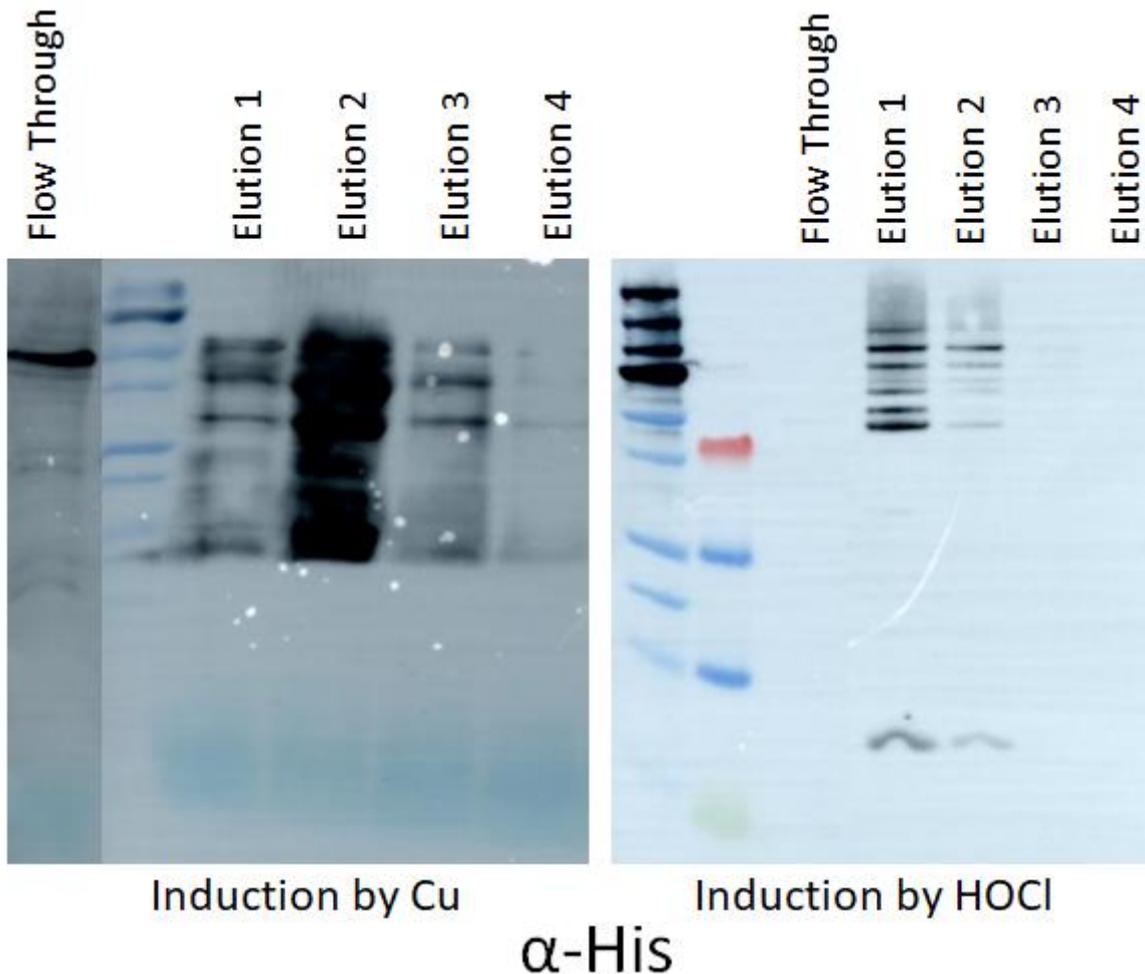


Figure 51. Western Blots obtenus pour les deux purifications de Buf1 His-taggé, après une induction d'une nuit au CuSO_4 ($100 \mu\text{M}$) ou à l' HOCl ($300 \mu\text{M}$).

Ces analyses montrent un problème de pureté des fractions de purification (Fig. 51). Pour le Cu, une explication est que ce métal, très affiné, se lierait de manière aspécifique à différentes protéines ainsi qu'à la résine NTA de la colonne, entraînant la purification de protéines non His-tagguées. En effet, des analyses en Mass Finger Printing de morceaux de gel, faites par notre collaborateur Jean-Michel Saliou (CIIL), ont montré une forte contamination en protéines ribosomales. Concernant l' HOCl , celui-ci induirait l'oligomérisation des bufferines. Tous ces résultats indiquent que la stratégie des précurseurs His-taggués induits par des stress tels que le Cu ou l' HOCl n'est pas fonctionnelle.

Par la suite, des versions strep-tagguées des deux bufferines ont été construites, ce qui a facilité leur purification (voir plus bas). J'ai aussi introduit le plasmide SigF dans les souches pour induire les opérons *buf* à l'IPTG et faciliter la purification.

c. Identification des modifications

Des prédictions de modèle 3D des bufferines Buf1 et Buf2 ont été obtenues par Rudy Antoine (CIIL) avec AlphaFold2. Les structures sont très similaires (Fig. 52) :

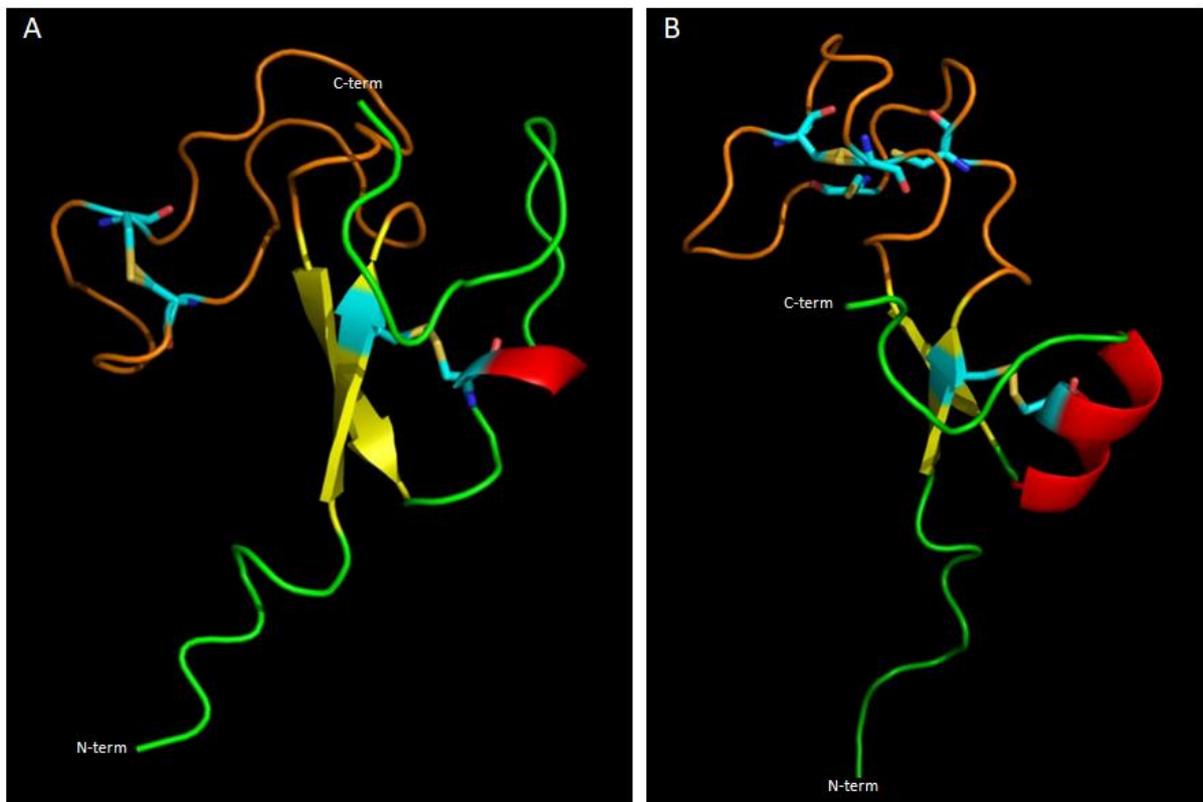


Figure 52. Prédiction de modèle 3D de Buf1 (A) et de Buf2(B) obtenu avec AlphaFold2. Les cystéines sont représentées en bleu clair. La prédiction montre un brin β (jaune) portant la première cystéine (CysI), une boucle peu structurée (orange) portant les cystéines II et III pour Buf1 et les cystéines II, III, IV et V pour Buf2, un deuxième brin β puis une courte hélice α (rouge) portant la dernière cystéine (CysIV pour Buf1 et CysVI pour Buf2).

En partant du N terminal la prédiction montre un brin β (jaune) portant la première cystéine (CysI), une boucle peu structurée (orange) portant les cystéines II et III pour Buf1 et les cystéines II, III, IV et V pour Buf2, un deuxième brin β puis une courte hélice α (rouge) portant la dernière cystéine (CysIV pour Buf1 et CysVI pour Buf2). Dans ces modèles, pour Buf1, des ponts disulfures seraient formés entre CysI et CysIV et entre CysII et CysIII. Pour Buf2, des ponts disulfures seraient formés entre CysI et CysVI et entre CysIV et CysV. Cependant, les

modifications post-traductionnelles ne sont pas prises en compte dans ces modèles. Nous avons fait l'hypothèse que les cystéines externes (CysI et CysIV pour Buf1, CysI et CysVI pour Buf2) formeraient un pont disulfure entre elles et que les cystéines des boucles non structurées (CysII et CysIII pour Buf1, CysII, CysIII, CysIV et CysV pour Buf2) seraient modifiées.

i. Identification par Mass Finger Printing

Malgré les contaminations décrites plus haut (section Résultats. I. 3. B.), des fractions de purification ont été déposées sur un gel dénaturant coloré au bleu de Coomassie Colloïdal, (Fig. 53A) et des bandes ont été découpées pour être analysées par Mass Finger Printing (Fig. 53B et 53C). Cette technique qui consiste à identifier des protéines par spectromètre de masse après réduction et digestion par la trypsine, a permis de retrouver des protéines His-tagguées dans les bandes 2, 3 et 4 (Fig. 53B). L'analyse approfondie de la bande 3 (Fig. 53C) montre que des peptides contenant les cystéines I et IV ont été trouvés (en rouge dans la séquence) mais que ceux contenant les deux autres Cys (cystéines II et III) ne l'ont pas été (en noir). Ces cystéines sont conservées dans les peptides RiPPs de la même famille. D'autre part, les résidus Cys sont souvent les sites de modifications dans d'autres familles de RiPP.

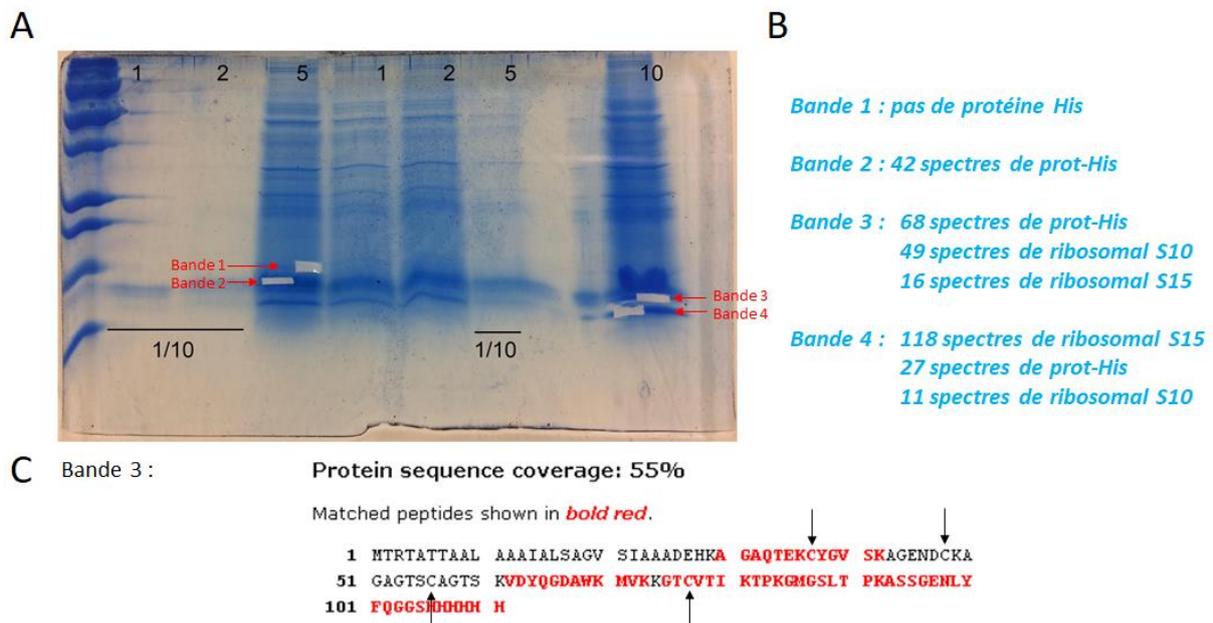


Figure 53. Résultats de la coloration au bleu de Coomassie Colloïdal et des analyses en Mass Finger Printing. A. L'opéron *buf1* codant *Buf1*^{6His} a été induit au CuSO_4 (100 μM) pendant une nuit. *Buf1* a été purifié sur colonne Ni^{2+} et des bandes de gel ont été découpées. B. L'analyse en Mass Finger Printing permet de retrouver des peptides correspondant à *Buf1*^{6His}. C. Les peptides tryptiques identifiés ont été colorés en rouge dans la séquence de *Buf1*^{6His}. Ceux contenant les cystéines I et IV (en rouge) ont été retrouvés, mais pas ceux contenant les deux autres Cys (cystéines II et III) (en noir).

Ces résultats permettent d'appuyer l'hypothèse de structure (Fig. 52). L'identification de peptides contenant les cystéines CysI et CysIV indique qu'elles ne sont pas modifiées, ce qui

est compatible avec le pont disulfure prédit. Les peptides tryptiques portant les cystéines CysII et CysIII ne sont pas retrouvés, suggérant que ces cystéines pourraient être modifiées. De plus, l'absence de peptides tryptiques dans le peptide signal serait en accord avec un peptide mature.

ii. Importance des cystéines

Afin d'étudier le rôle des Cys dans les modifications de Buf1, quatre mutants de substitution ont été construits afin de remplacer les Cys par des Ser : un mutant où CysI et CysIV ont été substitués ($Buf1^{CysISer+CysIVSer}$), un mutant où CysII a été substituée ($Buf1^{CysIISer}$), un mutant où CysIII a été substituée ($Buf1^{CysIIISer}$) et un mutant où CysII et CysIII ont été substitués ($Buf1^{CysIISer+CysIIISer}$). Ces différents mutants ont été confrontés au test phénotypique de culture en présence de Cu, et les courbes ont montré un phénotype DKO pour les quatre (Fig. 54).

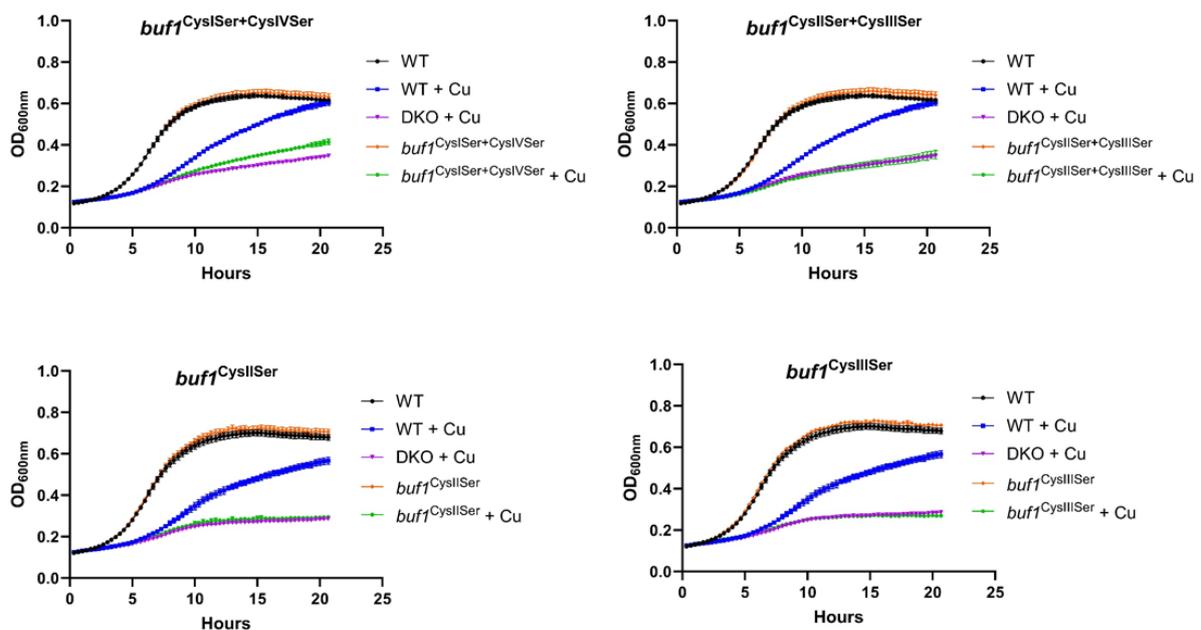


Figure 54. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 µM. Comparaison des mutants de substitution $Buf1^{CysISer+CysIVSer}$, $Buf1^{CysIISer+CysIIISer}$, $Buf1^{CysIISer}$ et $Buf1^{CysIIISer}$ avec le WT et le DKO.

Ces résultats suggèrent que chacune des Cys est importante dans la fonction de la bufferine Buf1. L'hypothèse est que les CysI et CysIV, formant un pont disulfure, sont nécessaires pour la structuration du peptide, et que les CysII et CysIII, modifiées, sont importantes dans la fonction du peptide.

iii. Identification par Chromatographie Liquide couplé à la Spectrométrie de Masse (LC-MS)

Etant donné les difficultés de purification en induisant au Cu ou à l'HOCl, la stratégie d'induction par la surexpression du facteur sigF (section Résultats. I. 1. B) en présence d'IPTG a été utilisée. Dans un premier temps, des extraits cellulaires solubles ont été produits afin d'identifier les modifications de Buf1 et de Buf2 en LC-MS. Après avoir induit à l'IPTG pendant une nuit, les extraits cellulaires solubles du DKO, et des simples mutants *buf1* et *buf2* ont été préparés et analysés en collaboration avec Séverine Zirah. Les profils de LC-MS des simples mutants ont été comparés à celui du DKO et ont permis de déterminer les pics spécifiques des bufferines (Fig. 55).

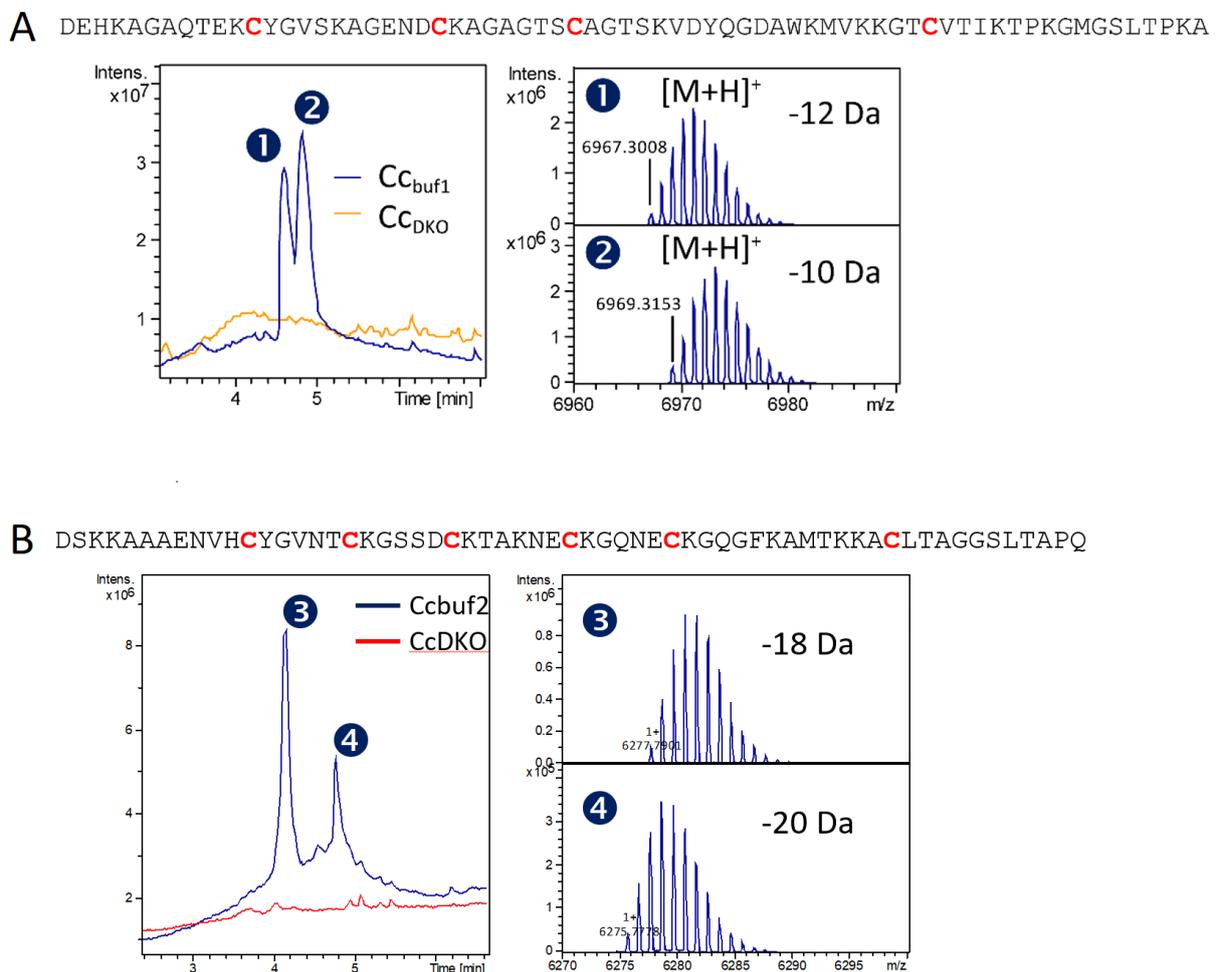


Figure 55. Analyses LC-MS des extraits cellulaires des souches *buf1*, *buf2* et DKO après une induction à l'IPTG (100 μ M) pendant une nuit en milieu de culture PYE.

Les analyses de LC-MS sur les extraits cellulaires solubles permettent de détecter deux formes pour le mutant *buf1* (Fig. 55A), absents chez le DKO, ayant des masses de -10 et -12 Da par

rapport à la masse attendue du peptide mature, après clivage du peptide signal (6978.3 Da). De plus, elles permettent détecter deux formes pour le mutant *buf2* (Fig. 55B), absents chez le DKO, avec des masses de -18 et -20 Da par rapport à la masse attendue du peptide mature, après clivage du peptide signal (6294.96 Da).

Dans un deuxième temps, des fractions de purification ont été utilisées afin confirmer les modifications de Buf1 par LC-MS. Après avoir induit à l'IPTG pendant une nuit, Buf1^{6His} a été purifié sur colonne Ni²⁺ à partir d'extraits cellulaires et les fractions de purification ont été analysés en collaboration avec Séverine Zirah. Une petite quantité de Buf1^{6His} a pu être purifiée à partir d'un volume important de surnageant de cette même culture, suggérant soit une faible sécrétion de la bufferine soit une lyse bactérienne partielle. Les profils de LC-MS ont permis de déterminer les pics spécifiques à Buf1^{6His} (Fig. 56).

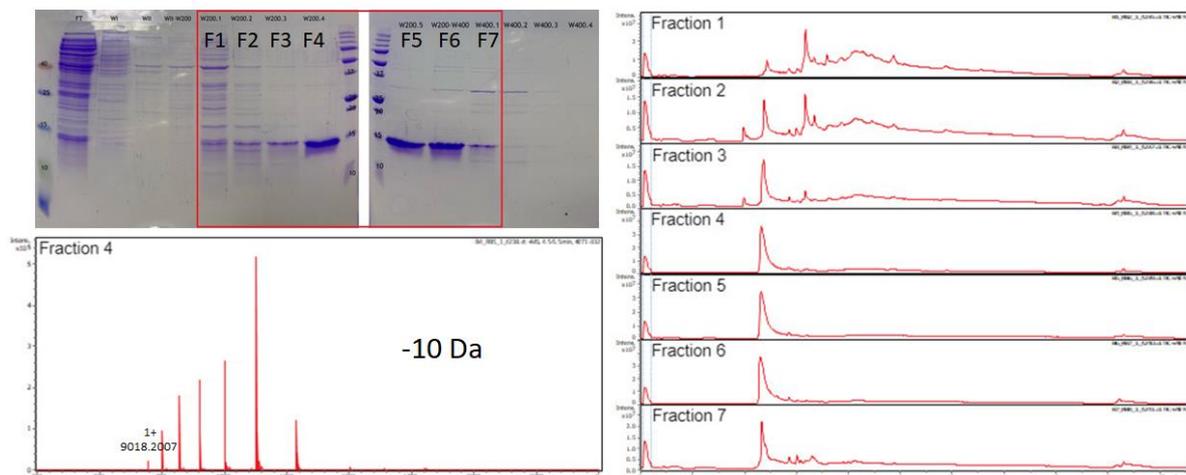


Figure 56. Gel de coomassie et analyses LC-MS des différentes fractions de Buf1^{6His} purifiée sur colonne Ni²⁺. L'opéron *buf1* codant Buf1^{6His} a été induit à l'IPTG (100 μM) pendant une nuit. Buf1 a été purifié sur colonne Ni²⁺ et des bandes de gel ont été découpées. B. L'analyse en LC-MS des différentes fractions de purification permet de détecter la forme -10 Da par rapport à la masse attendue du peptide mature portant un tag de 6 His, après clivage du peptide signal (9028 Da).

Contrairement aux analyses de LC-MS sur les extraits cellulaires solubles, les analyses de LC-MS sur les fractions purifiées permettent de détecter une seule forme de Buf1, de -10 Da par rapport à la masse attendue du peptide (9028 Da). La purification fait disparaître la forme -12 Da, une forme probablement moins stable (Fig. 56).

Les protéines BufB1 et BufB2 font partie de la famille des enzymes MNIO, qui comprend les protéines MbnB responsables de la formation de l'anneau oxazolone thioamide dans la biogénèse des méthánobactines, faisant perdre 4 Da (35). De plus, un pont disulfure cause la perte de 2 Da. Même si l'hypothèse du pont disulfure entre la première et la dernière Cys et

des modifications de type oxazolone thioamide sur les Cys internes expliquent la forme -10 Da pour Buf1 et – 18 Da pour Buf2, elle n’explique pas la forme -12 Da pour Buf1 et -20 Da pour Buf2.

Afin de déterminer les acides aminés et les modifications impliqués dans la perte des 10 Da et 12 Da du Buf1, les extraits cellulaires solubles et les fractions de purification ont été réduits, alkylés avec du bromoéthylamine, protéolysés par la chymotrypsine, la trypsine ou l’élastase, et analysés par LC-MS. Ainsi la réduction permet de rompre les ponts disulfures et l’alkylation permet de rajouter une pseudo lysine (changement de masse de +43.04 Da) sur les Cys. Les peptides obtenus par digestion ont été confrontés au logiciel d’analyse et de prédiction PEAKS afin de déterminer les possibles modifications pouvant expliquer les masses des différents peptides (Fig. 57).

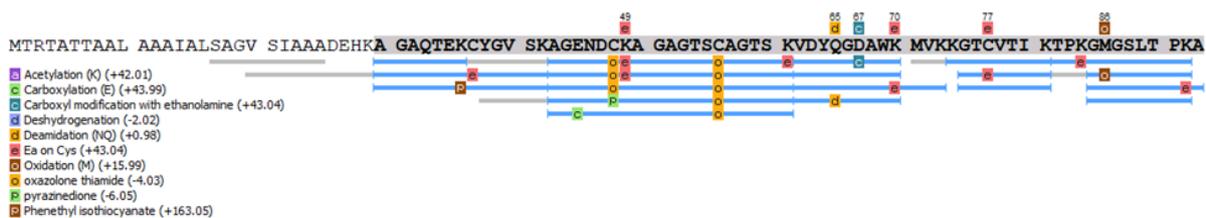


Figure 57. Analyse des peptides générés par clivage à la trypsine des extraits cellulaires de buf1 ou des fractions de Buf1^{6His} avec le logiciel PEAKS

Les résultats des prédictions de PEAKS montrent des modifications correspondant à l’alkylation sur les CysI et CysIV, soutenant l’hypothèse que ces Cys ne sont pas modifiées et forment un pont disulfure. Cependant l’alkylant étant peu spécifique, des alkylations sont aussi présentes sur des lysines. Des modifications connues chez les méthanobactines, l’oxazolone thioamide et la pyrazinedione ont été proposées, et le logiciel retient l’oxazolone thioamide sur plusieurs peptides (Fig. 57). D’autres modifications comme des acétylations, des carboxylations, des deshydrogenations ou des oxydations ont aussi été proposées. Cependant ces résultats sont à regarder avec du recul car les modifications sont proposées sur la base de modifications existantes, et bien que l’oxazolone thioamide pourrait expliquer la perte de 4 Da, d’autres modifications le pourraient aussi.

Des études supplémentaires faites par nos collaboratrices Séverine Zirah et Céline Guillaume (MNHN), avec un alkylant plus spécifique aux Cys (iodoacetamide), révèlent des espèces portant principalement 3 ou 4 groupes alkylants pour Buf1 et 4, 5 ou 6 groupes alkylants pour Buf2. Ces résultats suggèrent que la modification des résidus Cys entraîne la formation de

groupes sensibles à l'alkylation. De plus, ces mêmes études sur un peptide tryptique central AGENDCKAGAGTSCAGTSK (19-mer) produit par notre collaboratrice Sophie Jünger (thèse au MNHN dirigée par la Dr Yanyan Li), ont montré que les CysII et CysIII portaient à la fois les modifications induisant la perte de 4,03 Da, et des groupes correspondant à l'alkylation. Ensemble, ces données suggèrent que les CysII et CysIII centrales sont les cibles de réactions d'oxydation à 4 électrons (-4 Da chacune) générant des groupes sensibles à l'alkylation, et que les CysI et CysIV forme une liaison disulfure (S-S) (-2 Da). Ainsi, sur la base de toutes ces données, l'espèce -12 Da serait expliquée par la présence d'une liaison S-S labile entre les groupes sensibles à l'alkylation issus de CysII et CysIII, en équilibre avec l'espèce -10 Da.

Les mutants Cys-Ser précédemment obtenus (section Résultats I. 3. C. ii.) ont été analysés et comparés au WT en LC-MS par nos collaboratrices Séverine Zirah et Céline Guillaume après surexpression du facteur SigF. Les analyses de LC-MS sur les extraits cellulaires solubles permettent de détecter des formes de masses de -6 Da par rapport aux masses calculées pour les mutants Buf1^{CysII Ser} et Buf1^{CysIII Ser}, correspondant vraisemblablement à une modification sur la Cys restante et un pont disulfure, et une forme d'une masse de -2 Da pour le mutant Buf1^{CysII Ser+CysIII Ser}, correspondant au pont disulfure. Cependant, ces analyses ne détectent pas de peptides du mutant Buf1^{CysI Ser+CysIV Ser}, suggérant que ces mutations rendent la protéine plus sensible à la dégradation.

L'oxazolone thioamide est une modification qui entraîne une perte de 4 Da apportée par MbnB chez la méthanobactine. Cette modification est sensible à l'hydrolyse acide, induisant une ouverture du cycle et une perte de 26 Da (32). Pour tester la possibilité de cette modification dans Buf1, Sophie Jünger a réalisé des tests d'hydrolyse acide. Les résultats n'ont montré aucun changement de masse après 1 h ou 24 h d'hydrolyse, suggérant que les modifications ne sont probablement pas des oxazolones thioamides.

iv. Caractérisation des modifications par spectrophotométrie

Afin de purifier les bufferines, un 6His-tag avait été ajouté à l'extrémité C-terminale de chacun des précurseurs. Cependant, vu l'affinité du Cu pour les résidus His, celui-ci peut compromettre certains tests comme des tests d'interaction entre les bufferines et le Cu. C'est pourquoi, un Twin-Strep-tag a été ajouté à l'extrémité C-terminale de chacun des précurseurs, dans les mutants simples KO buf1 et buf2. Après avoir induit l'expression de l'opéron restant à l'IPTG pendant une nuit, Buf1^{6His} et Buf2^{6His} ont été purifiés sur colonne Nickel, et Buf1^{Twstr}

et Buf1^{Twstr(CIIS+CIIS)} ont été purifiés sur colonne Streptactine. Pour déterminer si les modifications sont détectables par spectrométrie optique, les spectres UV-visible de 250 à 360 nm des bufferines ont été enregistrés (Figs. 58 et 59).

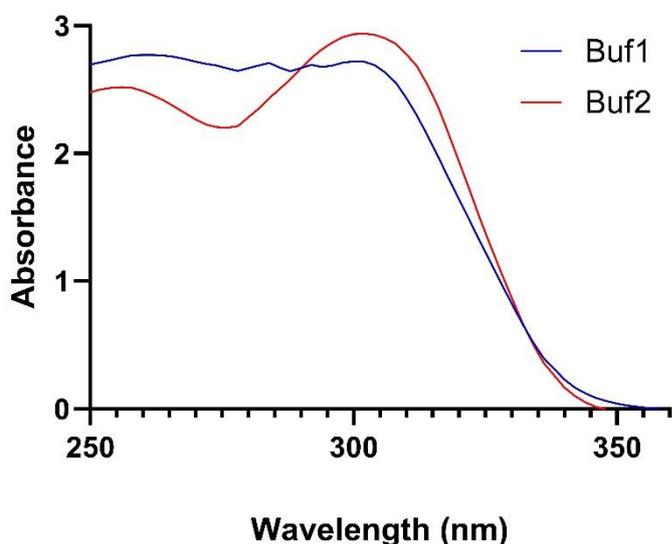


Figure 58. Comparaison des spectres optiques UV-visible de Buf1^{6His} et Buf2^{6His}

Les spectres obtenus montrent de l'absorbance à 280 nm pour Buf1^{6His} et Buf2^{6His}, correspondant aux acides aminés aromatiques. Elle est plus faible pour Buf2^{6His} parce que ce dernier ne possède pas de Trp, à la différence de Buf1^{6His}. Un maximum d'absorbance à 305 nm est présent chez les deux bufferines, attestant de modifications similaires de type hétérocycle au niveau des Cys.

Le pic à 305 nm est plus important pour Buf2, cohérent avec la présence de deux Cys supplémentaires modifiées.

Pour les bufferines Twin-Strep-tagées, les spectres obtenus montrent une différence entre la bufferine WT et la bufferine dont CysII et CysIII ont été mutées. L'épaule à 305 nm observé pour Buf1 sauvage est absent du mutant Cys, ce qui supporte l'hypothèse d'hétérocycles au niveau de ces Cys.

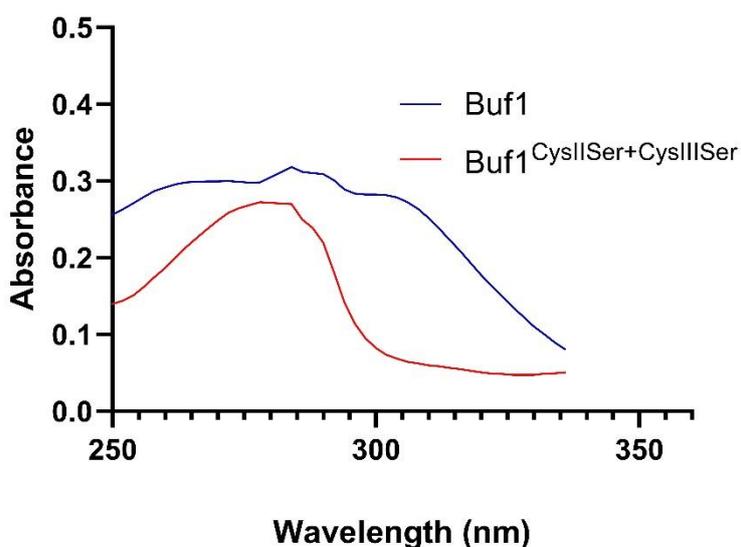


Figure 59. Comparaison du spectre optique UV-visible de Buf1^{Twstr} et du spectre de Buf1^{Twstr(CIIS+CIIS)}

v. Identification des modifications par Résonance Magnétique Nucléaire

Afin de déterminer la structure du Buf1, la version Buf1^{6His} produite en présence d'IPTG et isolée par purification sur colonne Nickel, a été envoyée à nos collaborateurs les Drs Guy Lippens et Svetlana Dubiley (INSA Toulouse) afin de l'analyser en RMN. Dans un premier temps, un spectre 1D de protons a été enregistré pour discriminer les structures ordonnées des structures désordonnées. Les structures ordonnées ont ensuite été analysées par acquisition de spectres 2D ¹H-¹³C (l'abondance naturelle du ¹³C est de 1%).

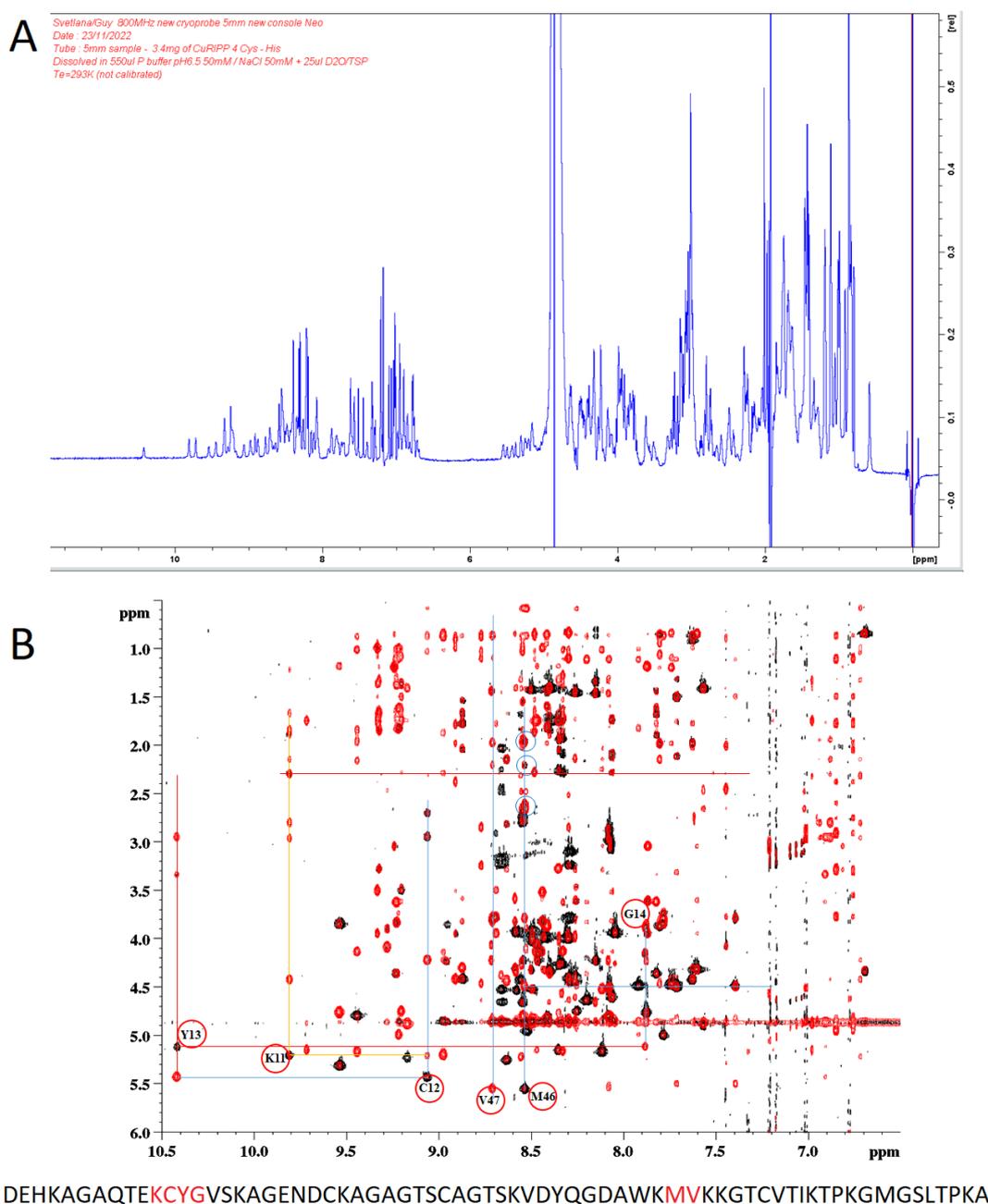


Figure 60. Spectres RMN 1D (A) et 2D (B) obtenus pour Buf1^{6His} (Guy Lippens et Svetlana Dubiley)

Ainsi, en fonction de leur environnement moléculaire et des structures secondaires, les protons H^+ et les carbones ^{13}C vont présenter des déplacements chimiques ([ppm]) différents. Les résultats de spectre 1D (A) montrent que Buf1 présente des régions ordonnées (entre 10 et 6 ppm) et des régions désordonnées (entre 5 et 0 ppm). L'analyse de spectres 2D 1H - ^{13}C (B) des régions ordonnées indique une structuration des acides aminés de 11 à 14 et des acides aminés de 46 à 47. En comparant avec le modèle Alphafold2 (section Résultats I. 3. C.), ces résultats sont cohérents avec la structuration en brins β de ces régions (Fig. 60).

Afin d'améliorer la compréhension scientifique de cette thèse, le prochain paragraphe discutera de l'identification finale des modifications, bien que je n'aie pas participé directement à ces étapes du travail. Afin d'élucider la structure de Buf1, le peptide tryptique central AGENDCKAGAGTSCAGTSK (19-mer) marqué ^{15}N et ^{13}C a été produit chez *E. coli* par Sophie Jünger et analysé en RMN par Guy Lippens et Svetlana Dubiley.

Les résultats de spectre 2D 1H - ^{15}N et 1H - ^{13}C permettent l'attribution des protons NH de Lys24 et de Ala32, et des protons $H\alpha$ d'Asp22 et de Ser30, les résidus qui suivent et précèdent respectivement les Cys23 (= CysII) et Cys31 (= CysIII) modifiés. Cependant, aucun proton NH et $H\alpha$ n'a été attribué pour les résidus Cys modifiés, indiquant que les atomes N et C α de Cys23 et Cys31 font partie d'hétérocycles et éliminant la possibilité d'une modification comme celle de la chryséobasine (50) (Fig. 61). Les résultats de spectre 2D 1H - ^{13}C montrent des corrélations entre les atomes $H\alpha$ de Asp22 et de Ser30, et les atomes de carbone respectivement à 161,1 ppm et 159,8 ppm.

Le peptide tryptique central 19-mer a été marqué uniformément au ^{13}C , ^{15}N et des expériences de RMN à triple résonance (1H , ^{13}C , ^{15}N) ont permis d'obtenir d'autres attributions. Les premiers résultats permettent de confirmer que la CysII est modifiée car le C α ne résonne pas à une valeur typique de 50 ppm. Les atomes de carbone C=O des CysII et CysIII présentent des valeurs autour de 184 ppm, éliminant les modifications telles que les peptides thioamides (oxazolone et pyrezinedione thioamide) présentant une valeur attendue de 200 ppm (Fig. 61). De plus, ces atomes de carbone C=O sont couplés avec une constante de couplage de 90 Hz à des atomes de carbone qui ont un déplacement chimique d'environ 120 ppm, indiquant que ces atomes de carbone C=O des Cys modifiées sont connectés aux atomes de carbone des hétérocycles aromatiques. Enfin, les déplacements chimiques ^{13}C de Buf1 sont dans la même plage que ceux observés pour les atomes de carbone dans des groupes thio-oxazole (49).

Ainsi, les résultats de MS, de spectrophotométrie et de RMN permettent de conclure que la modification conduit à la cyclisation des deux Cys pour former des groupes thio-oxazole (Fig. 61).

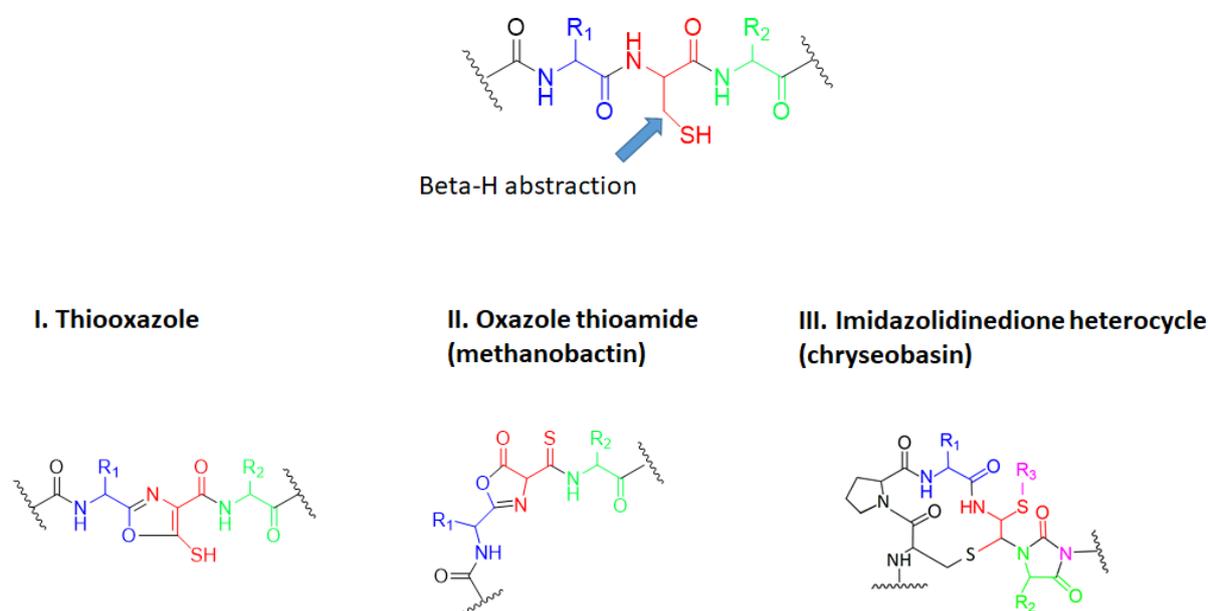


Figure 61. Structures chimiques d'une cystéine (rouge) native ou modifiée selon trois modifications possibles (Guy Lippens et Svetlana Dubiley). Les données de RMN ont permis d'écarter les structures II et III et de suggérer la structure I.

4. Mécanisme d'action de Buf1

Bien que la fonction et la modification de cette bufferine modèle soient élucidées, son mécanisme d'action reste inconnu. L'hypothèse est que les bufferines sont des chalcophores, des métallophores qui permettent de chélater le Cu. Contrairement aux chalcophores de type méthanobactines qui permettent l'acquisition du Cu dans le surnageant, les chalcophores de cette nouvelle famille permettraient la chélation du Cu dans le périplasme et ainsi la protection des bactéries des effets de celui-ci.

a. Détection de chalcophore par Chromazurol S

Afin de tenter d'identifier un éventuel chalcophore, un test de détection des chalcophores par le chromazurol S (CAS) a été utilisé (108). Ce test consiste en la formation d'un complexe très labile entre le chromazurol S et le Cu (CAS-Cu) qui a la particularité d'être bleu. En présence de chalcophore, le Cu est arraché au complexe, rendant au chromazurol sa couleur jaune d'origine. Trois différents protocoles ont été utilisés avec cette méthode.

Dans les tests classiques au Chromasurol S, la moitié d'une boîte de pétri est réservée au milieu de culture solide sur lequel la bactérie est cultivée, tandis que l'autre moitié est composée de milieu contenant le complexe CAS-Cu. Ainsi, le chalcophore est sécrété par les bactéries dans le surnageant, diffuse dans la gélose et fait diminuer la zone bleu correspondant au complexe CAS-Cu. Les souches WT et DKO, après avoir été induites au CuSO_4 ou à l' HOCl pendant 3 h ont été lavées, standardisées à une DO_{600} de 1, et étalées sur la moitié de la boîte de pétri réservée au milieu de culture solide. Cependant, les résultats ont décelé un problème possible de compatibilité du milieu avec le test puisque la décoloration au cours du temps s'observe même pour les bactéries non induites utilisées comme contrôle négatif (Fig. 62). La décoloration du complexe CAS-Cu au cours du temps n'a donc pas permis de conclure sur une potentielle différence entre WT et DKO. Le milieu solide PYE contiendrait des molécules capables de déplacer lentement le Cu du complexe.

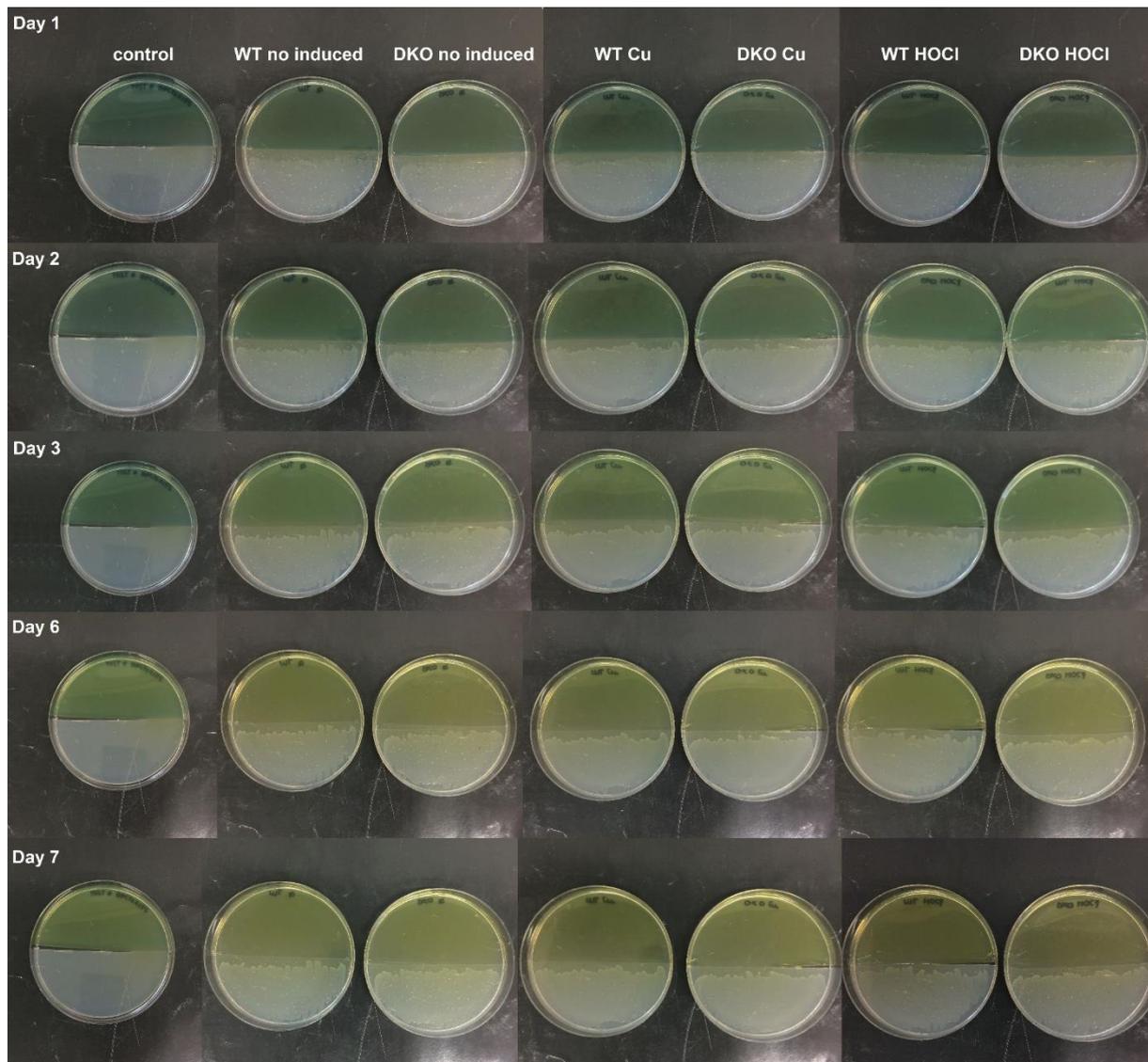


Figure 62. Résultats du tests CAS sur cellules entières après induction ou non des souches WT et DKO au CuSO_4 ($100 \mu\text{M}$) ou à l' HOCl ($300 \mu\text{M}$).

Un protocole alternatif, basé sur ce même système de diffusion consiste à diluer le complexe CAS-Cu dans de l'eau mQ et de l'agarose, et de le couler dans des boîtes de pétri. Un puits central est creusé pour pouvoir y accueillir l'échantillon. Cette technique a été utilisée pour y déposer des surnageants de culture (Fig. 63) ou des extraits cellulaires solubles (Fig. 64).

En présence d'un chalcophore, un halo jaune se forme autour du puits. Après les avoir cultivées pendant 2 h et induites au Cu ou à l' HOCl pendant 3 h, les souches WT et DKO ont été centrifugées, et les surnageants ont été récupérés et déposés dans les puits. Le milieu de culture PYE a été utilisé comme témoin négatif.

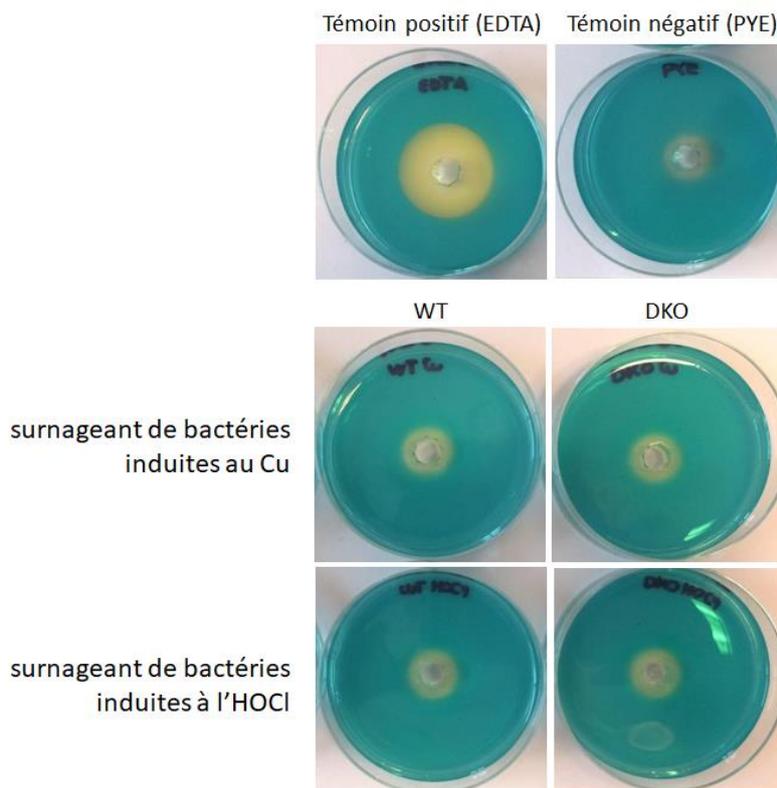


Figure 63. Résultats du tests CAS sur surnageants après induction ou non des souches WT et DKO au CuSO_4 (100 μM) ou à l'HOCl (300 μM)

Les résultats montrent que le PYE chélate modestement le Cu du complexe CAS-Cu.

Les surnageants des souches WT et DKO déplacent le Cu du complexe CAS-Cu de la même manière, quel que soit l'inducteur des bufferines. Ces résultats suggèrent la présence en faible concentration de chélateurs de Cu dans les surnageants, mais il ne s'agit pas de bufferines puisqu'on observe aussi la décoloration pour le surnageant des DKO (Fig. 63).

Etant donné la très faible concentration de bufferines dans les surnageants, un test similaire a été fait avec les extraits cellulaires solubles.

Après avoir induit l'expression des opérons à l'IPTG pendant une nuit (surexpression de sigma sigF), les extraits cellulaires solubles des souches WT, DKO et des simples mutants *buf1* et *buf2* ont été récupérés, ultrafiltrés ou non sur un filtre 30 KDa et déposés dans les puits. L'EDTA a été utilisé comme un témoin positif, et le tampon Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM a été utilisé comme témoin négatif.

Les résultats montrent que le tampon ne chélate pas le Cu du complexe CAS-Cu. Les extraits cellulaires des souches WT, DKO, *buf1* et *buf2* déplacent le Cu du complexe CAS-Cu de la même manière (Fig. 64). Ces résultats suggèrent la présence de chélateurs de Cu dans les extraits cellulaires mais qu'ils ne sont pas reliés aux RiPPs de cette nouvelle famille.

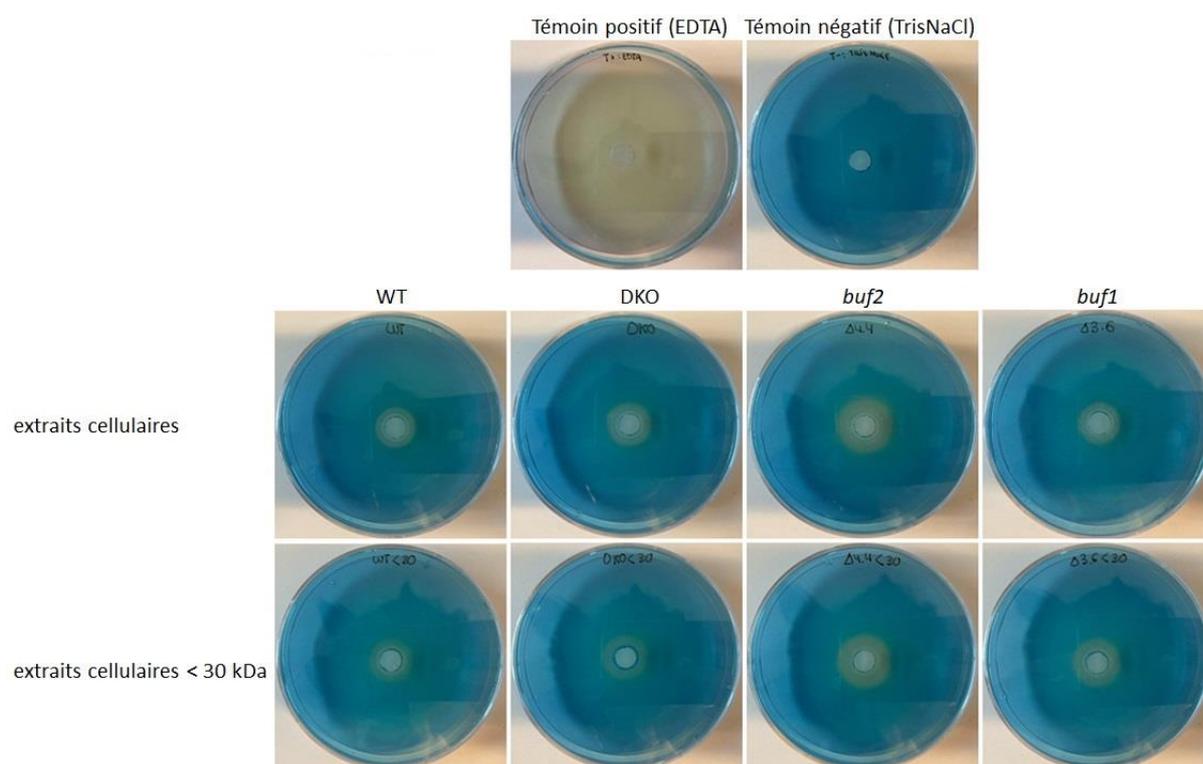


Figure 64. Résultats du tests CAS sur extraits cellulaires solubles après induction à l'IPTG (100 μ M) des souches WT, DKO, *buf1* et *buf2*. Les extraits cellulaires solubles ont été ou non ultrafiltrés à 30 kDa.

Ainsi, les protocoles de détection de chalcophore par Chromazurol S n'ont pas permis de conclure sur la nature chélatrice des RiPPs de cette nouvelle famille.

b. Détection de chalcophore par transfert de surnageant

Si les bufferines chélatent le Cu et qu'elles sont retrouvées partiellement dans le compartiment extracellulaire, le surnageant de la souche WT devrait conférer une protection contre ce métal. Pour tester cette hypothèse, les souches WT et DKO ont été induites au Cu pendant 4 h et centrifugées afin de récupérer les surnageants. Les surnageant ont été filtrés, dilués en proportions 50:50 avec du PYE 2X et utilisés comme milieu de culture. Des suivis de croissance ont été réalisés avec le lecteur de plaque SPARK TECAN en présence ou en absence de 225 μ M de Cu (Fig. 65).

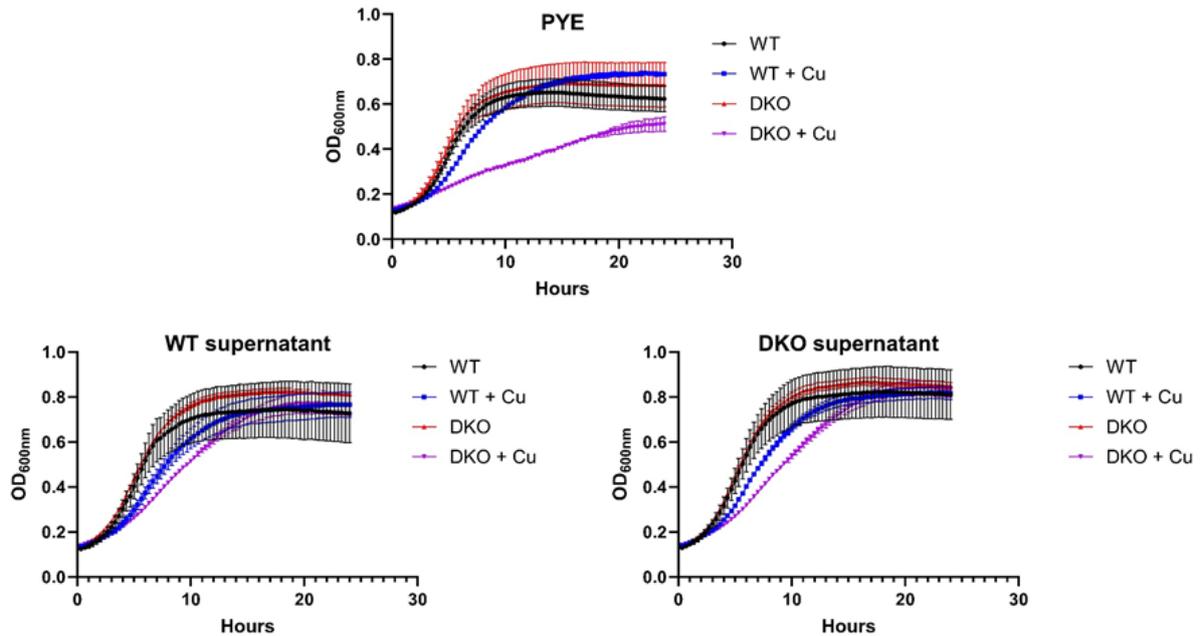


Figure 65. Suivi de croissance en présence ou en absence de CuSO_4 225 μM . Comparaison des souches DKO et WT en milieu PYE, supplémenté ou non avec des surnageants produits par la souche WT ou par la souche DKO.

Dans le milieu PYE complet classique, les souches WT et DKO présentent les phénotypes attendus (section Résultats. I. 2. a. i.) : en absence de Cu, les souches WT et DKO présentent des croissances similaires, et en présence de Cu, leur croissance est affectée, surtout celle de la souche DKO. Dans milieu contenant du surnageant de la souche WT, la souche DKO récupère un phénotype WT en présence de Cu, suggérant une protection du surnageant contre le Cu. Cependant, dans milieu contenant du surnageant de la souche DKO, la souche DKO récupère aussi un phénotype WT en présence de Cu, suggérant une protection contre le Cu, indépendante de la production des bufferines (Fig. 65).

c. Détection de complexes Buf-Cu

Afin d'étudier de façon directe l'interaction entre Buf1 et le Cu, le RiPP Twin-Strep-taggé Buf1^{Twstr} a été produit et purifié sur colonne Streptactine. En parallèle et en complément, une souche *E. coli* exprimant l'opéron *buf1* complet avec BufA1^{str} (Strep-tagagée) sur plasmide a été construite par Svetlana Dubiley afin de maximiser la production.

Dans un premier temps, Buf1^{Twstr} purifié a été incubé avec CuSO_4 et des analyses de LC-MS ont été faites par nos collaboratrices Séverine Zirah et Céline Guillaume (MNHN) afin de déterminer le ratio Buf1:Cu et la spécificité de cette interaction. Dans ces conditions, les

résultats ont permis de déterminer une spécificité de Buf1 pour le Cu parmi une gamme de métaux (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cr^{2+}) avec un ratio de 1:1. Cependant, les proportions du complexe Buf1-Cu et de la forme sans Cu (apo) variaient nettement d'une expérience à l'autre.

Pour étudier l'interaction entre Buf1 et le Cu, deux protocoles ont été comparés, un protocole in vitro où le CuSO_4 a été rajouté après purification de Buf1^{Twstr} ou Buf1^{str}, et un protocole in vivo où les cultures bactériennes de *C. vibrioides* ou d'*E. coli* ont été traitées avec du CuSO_4 pendant plusieurs heures avant la purification de la bufferine. Les analyses de LC-MS faites par Séverine Zirah et Céline Guillaume ont montré que les bufferines produites selon le protocole in vivo, étaient entièrement chargées en Cu (ratio 1 :1).

De plus, des analyses en EPR faites par notre collaborateur le Dr Giuseppe Sicoli (Université de Lille) ont permis d'étudier plus en détail la liaison du Cu^{2+} , qui est paramagnétique. Alors que les spectres du complexe Buf1^{Twst}-Cu produit in vitro n'étaient pas reproductibles, les spectres du complexe Buf1^{Twst}-Cu produit in vivo ont confirmé la formation de complexes et indiqué l'implication d'atomes d'azote dans la coordination du Cu (voir Article en annexe).

Notre interprétation de la différence entre les complexes formés in vitro et in vivo est qu'il existe un équilibre entre des formes de Buf1 « compétente » (-10 Da) et « incompétente » (-12 Da) pour la liaison du Cu. Cette dernière forme ne pourrait pas fixer de Cu selon l'hypothèse que ses groupements thiooxazoles forment un pont S-S. Lorsque le Cu est présent en excès dans l'environnement de *C. vibrioides*, il entre dans le périplasme via des porines et en réponse, les bactéries activent l'expression des bufferines. Les bufferines néo-synthétisées (forme de masse -10 Da) vont chélater le Cu directement lorsqu'elles arrivent dans le périplasme. Ainsi, l'interaction Buf1-Cu produite in vivo reflète mieux ce qui se passe naturellement chez *C. vibrioides*. A l'inverse, la production et la purification des bufferines en absence de Cu peut entraîner la formation d'un pont disulfure entre les groupes thio-oxazoles au cours de la production et la purification, qui correspondrait à une forme incompétente pour la liaison du Cu. La stabilité du pont S-S entre les groupements thiooxazoles est vraisemblablement moindre qu'un pont S-S entre des Cys. Il existerait donc un mélange de formes (-10 Da et -12 Da) lorsque la bufferine est produite sans Cu, ce qui rendrait la formation du complexe in vitro moins efficace et moins reproductible.

Une autre technique pour détecter les complexes Buf-Cu in vitro est la technique de titrage spectrophotométrique avec un ligand compétitif (109). Le principe de cette technique repose

sur la formation d'un complexe entre le Cu et un chélateur absorbant dans le visible, que le RiPP ajouté en concentration croissante serait capable de déplacer progressivement. Le chélateur 2,2-bicinchoninic acid (BCA) a été utilisé comme ligand compétitif pour le Cu^+ et le 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) pour le Cu^{2+} , avec $\text{Buf1}^{\text{Twstr}}$.

Les résultats montrent que l'ajout de concentrations croissantes de $\text{Buf1}^{\text{Twstr}}$ permet le déplacement du Cu des chélateurs vers la bufferine (Figs. 66 et 67). Cependant, la formation du complexe avec le Cu^{2+} en particulier semble être très lente (Fig. 66), suggérant de nouveau un équilibre entre des formes compétente et incompétente pour la liaison. Pour le Cu^+ (Fig. 67), l'expérience est réalisée sans oxygène, en boîte à gants, et il est possible que dans ces conditions le pont S-S instable entre thiooxazoles tend à se rompre.

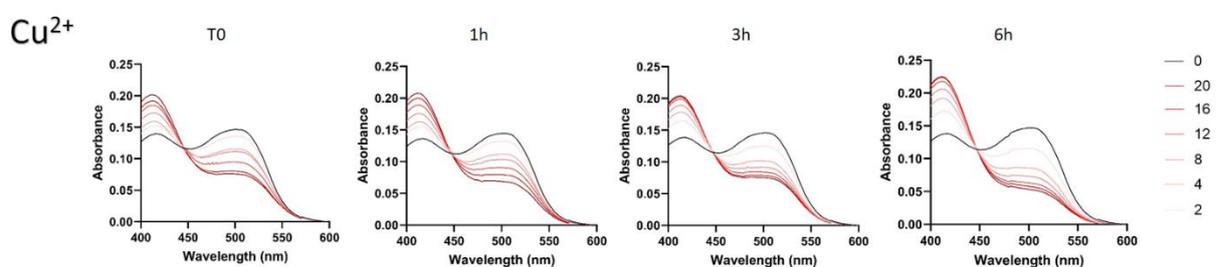


Figure 66. Etude de l'interaction de $\text{Buf1}^{\text{Twstr}}$ avec le Cu^{2+} par spectrophotométrie : l'absorbance maximale du complexe Cu^{2+} -PAR est de 505 nm

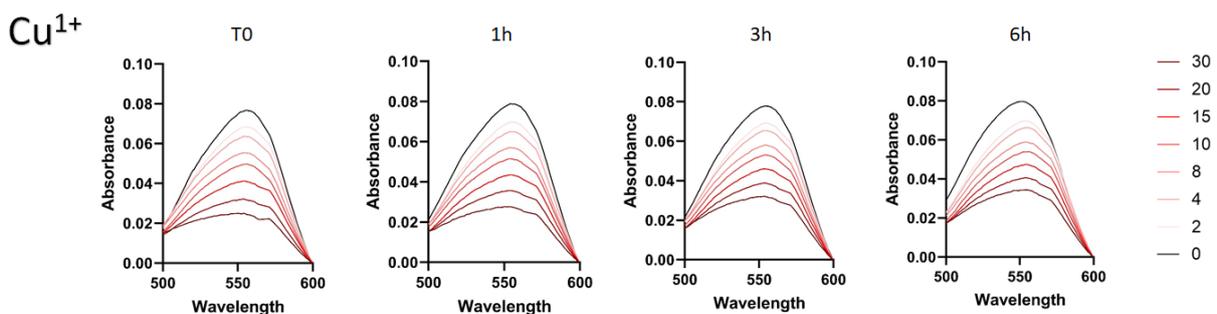


Figure 67. Etude de l'interaction de $\text{Buf1}^{\text{Twstr}}$ avec le Cu^+ par spectrophotométrie : l'absorbance maximale du complexe Cu^+ -BCA est de 562 nm

Ces résultats ont permis de caractériser l'interaction entre les deux formes de Cu avec Buf1 , et d'estimer des constantes d'affinité par l'ajustement (« fit ») des courbes aux équations 1 et 2 (section Matériels et Méthodes). Cette technique a permis d'estimer des constantes de dissociation K_D en suivant le protocole décrit par Novoa-Aponte (2020) (109). Ainsi, un K_D d'environ 10^{-20} M a été obtenu pour le Cu(I) et un K_D d'environ 10^{-15} M pour le Cu(II) ,

correspondant à la gamme des affinités observées pour les méthano-bactines (section Introduction. I. 1. d.).

Buf1^{str} a été produit avec ou sans Cu²⁺, marqué au ¹⁵N et au ¹³C, et étudié en RMN par Guy Lippens et Svetlana Dubiley. La comparaison des spectres de la forme apo-bufferine et du complexe avec Cu²⁺ a montré la disparition des pics correspondant aux voisins directs des groupes thiooxazole, Lys24, Ser30 et Ala32, indiquant fortement leur implication dans la coordination de Cu²⁺ (voir article en annexe). De plus, nos collaborateurs ont observé l'atténuation de résonances correspondant à des résidus du feuillet beta de la bufferine, ce qui suggère un changement de conformation du peptide lors de la liaison au Cu²⁺. L'étude de la liaison du Cu⁺ sera nettement plus compliquée puisqu'il faut travailler sans O₂.

II. Etude de la biogénèse des bufferines chez *C. vibrioides*

1. Spécificité des enzymes de modification

La première question qui a été abordée concernant la biogénèse est la spécificité des enzymes de modification, et notamment la capacité des enzymes de modification d'un opéron à modifier le précurseur du deuxième opéron. Pour répondre à cette question, deux mutants ont été construits : un mutant produisant le précurseur BufA1 et les enzymes de modification de l'opéron *buf2* nommé *buf1(A)+buf2(BC)* et un mutant produisant le précurseur BufA2 et les enzymes de modification de l'opéron *buf1* nommé *buf1(BCD)+buf2(A)*. Les gènes restants sont présents dans leur locus d'origine. Ces mutants ont été testés en culture en présence de CuSO₄. Ils ont montré un phénotype DKO, suggérant que les enzymes de modification sont spécifiques du précurseur de leur propre opéron (Fig. 68).

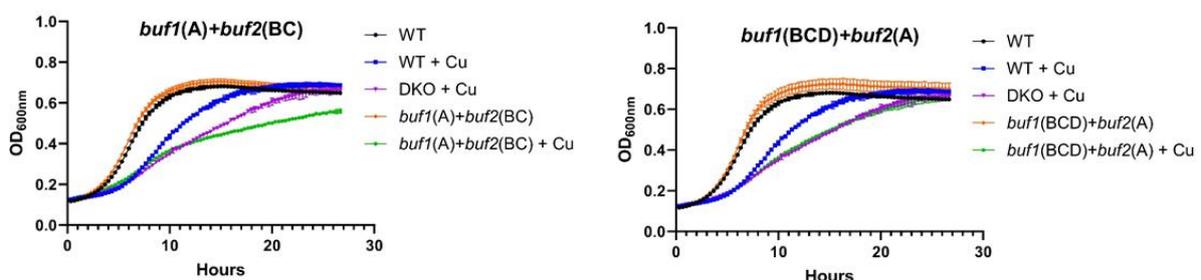


Figure 68. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 µM. Comparaison des mutants de croisement *buf1(A)+buf2(BC)* et *buf1(BCD)+buf2(A)* contre le WT et le DKO.

Dans les mutants *buf1(A)+buf2(BC)* et *buf1(BCD)+buf2(A)* respectivement, l'absence des gènes *bufA2* et *bufA1* pourrait altérer la transcription de autres gènes de leur propre opéron. Pour vérifier cela, l'expression des opérons a été mesurée de façon indirecte par des fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur *lacZ* à différents endroits de l'opéron. Ainsi, dans l'opéron *buf1* ou dans l'opéron *buf2*, le gène *lacZ* a été fusionné avec le gène *bufA*, avec le dernier gène (*doxX* pour *buf1* ou *bufC2* pour *buf2*) ou avec le dernier gène en absence du gène *bufA*. Les bactéries ont été cultivées pendant 16 h en présence de 225 μM de Cu et les activités β -galactosidase ont été mesurées. Le mutant présentant le gène *lacZ* fusionné au gène *bufA* a été utilisé comme témoin négatif non induit.

Les fusions transcriptionnelles ont permis de montrer qu'il existe une polarité dans les opérons *buf1* et *buf2*, caractérisée par une diminution des activités β -galactosidase. Cette polarité est peu affectée lorsque le précurseur est délété, suggérant que l'absence des gènes *bufA2* et *bufA1* n'altère pas la transcription des gènes suivants dans leur propre opéron (Fig. 69).

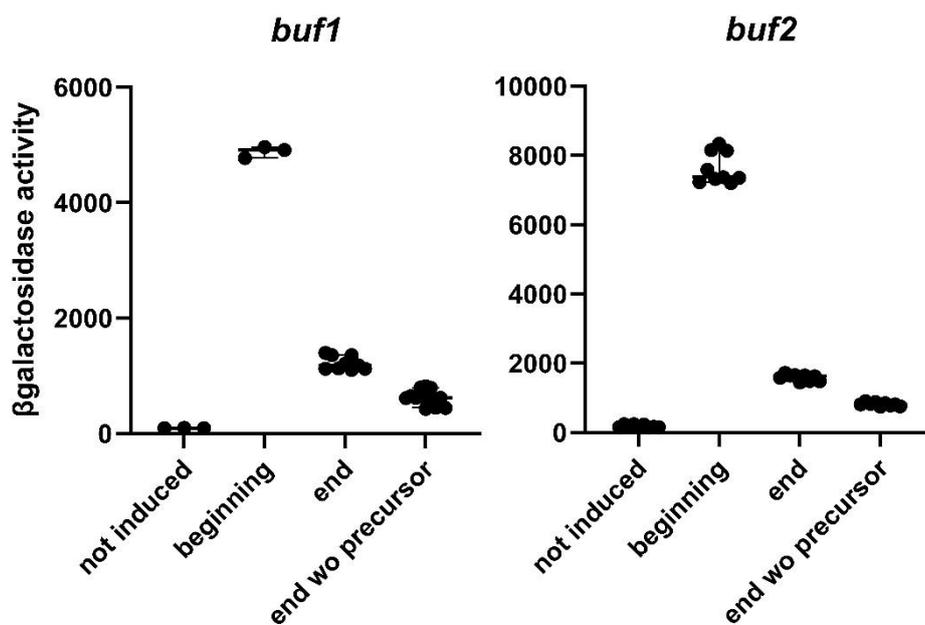


Figure 69. Activités β -galactosidase selon la position du rapporteur dans les opérons. L'expression des opérons *bufferines* a été induite avec 100 μM de CuSO_4 pendant une nuit.

Cependant, dans ces premières constructions, chacun des gènes était dans son environnement génétique d'origine. Chez *C. vibrioides* et *E. coli*, il a été montré que les ARNm sont limités à leur site de transcription, ce qui restreint l'organisation spatiale des ribosomes (110). Etant donné que l'opéron *buf1* et l'opéron *buf2* sont éloignés sur le chromosome, dans le contexte de ces mutants il est possible que les enzymes de modification d'un opéron ne retrouvent pas le précurseur de l'autre opéron. Pour contourner ce problème, deux autres

mutants ont été construits : les gènes des précurseurs *bufA1* et *bufA2* ont été introduits respectivement à la place du précurseur natif de chaque opéron. Ces deux mutants nommés *buf1(A2BCD)* et *buf2(A1BC)* ont été testés pour leur phénotypique en culture en présence de Cu. Les courbes de croissance ont montré un phénotype DKO, suggérant que les enzymes de modification sont spécifiques du précurseur de leur propre opéron (Fig. 70). Afin de vérifier l'absence de modification, les bufferines doivent être détectées par MS.

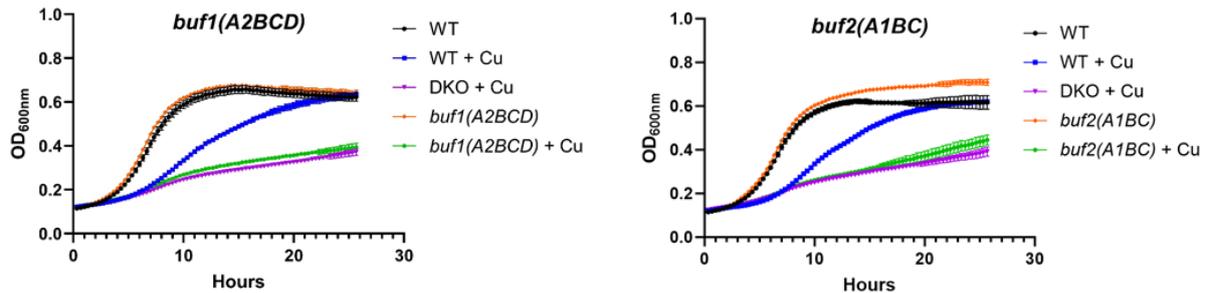


Figure 70. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 μM . Comparaison des mutants de croisement *buf1(A2BCD)* et *buf2(A1BC)* contre le WT et le DKO.

2. Caractérisation des déterminants d'interaction

Grâce à des analyses d'exploration de génomes (« genome mining »), un opéron homologue à celui de *C. vibrioides* a été retrouvé chez *Rubrivivax gelatinosus* où les protéines BufB et BufC sont fusionnées, suggérant une interaction directe pendant la biogénèse. En vue d'études structurales par Pascal Arnoux (CEA CADARACHE), la protéine de fusion BufBC de *R. gelatinosus* a été produite chez *E. coli* et purifiée sur colonne Nickel par Justine Lucas, une stagiaire de 3^{ème} année de Licence. Cependant, aucune cristallisation n'a été obtenue à ce jour.

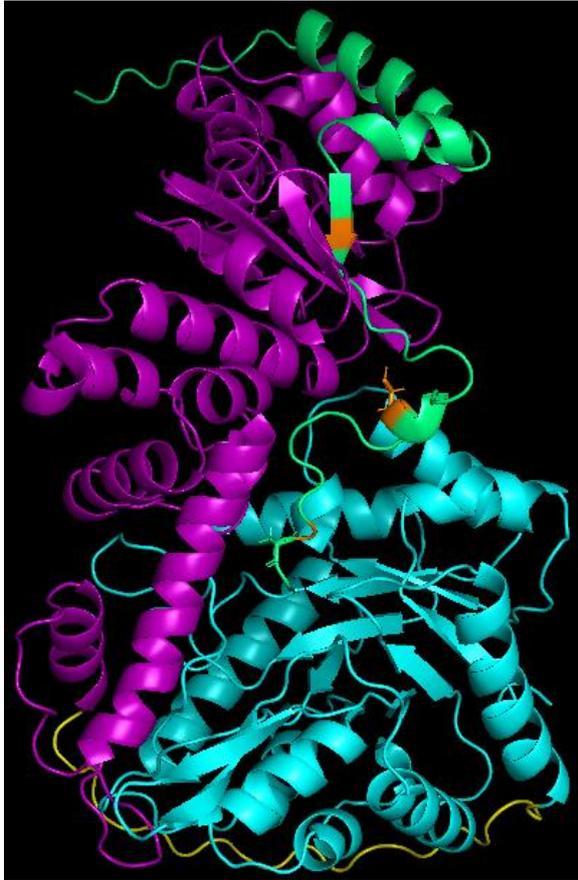


Figure 71. Prédiction de modèle 3D de l'interaction de BufA avec la protéine de fusion BufBC chez *R. gelatinosus* obtenue avec AlphaFold2. Les Cys sont représentées en orange.

Une prédiction de modèle 3D de l'interaction entre le précurseur BufA et la protéine de fusion BufBC chez *R. gelatinosus* a été obtenue avec AlphaFold2 par Rudy Antoine au laboratoire. La partie BufB de la protéine de fusion (bleu) est reliée à la partie BufC (violet) par un linker (jaune). Le précurseur peptide (vert), a été tronqué dans cette prédiction, pour éviter qu'il ne se replie complètement et perde son interaction avec le complexe BufBC. La partie hydrophobe du peptide signal du précurseur est positionnée entre deux hélices du domaine RRE (violet) et le premier brin β portant la

première cystéine (orange) forme une beta augmentation avec le feuillet béta du domaine RRE. Cette dernière interaction est similaire à celles fréquemment retrouvées dans d'autres familles de RiPPs (section Introduction I. 2. d. i). Enfin la 2^{ème} Cys du précurseur est positionnée tout près du site actif de BufB.

Cette prédiction structurale a permis de formuler des hypothèses concernant les interactions entre BufA, BufB et BufC chez *C. vibrioides*. L'hypothèse est que la reconnaissance de BufA par BufB et BufC est composite : BufC reconnaîtrait le peptide signal et premier brin β portant la première Cys, et BufB reconnaîtrait les deuxième et troisième Cys.

a. Rôle des protéines B et C dans la reconnaissance du précurseur

Afin d'étudier le rôle des enzymes de modification BufB1 et BufC1 dans la reconnaissance du précurseur, des mutants de délétion des gènes codant pour la protéine B1 (*buf1(ACD)*), la protéine C1 (*buf1(ABD)*) et la séquence codant le domaine RRE de la protéine C1 (*buf1(ABC_{DUF2063}D)*) (les lettres majuscules indiquent quels gènes sont conservés dans chaque mutant) ont été construits dans la souche *buf1*. Leur phénotype ont été testés en culture en présence de CuSO₄. Les courbes de croissance ont montré un phénotype DKO

pour les trois mutants, suggérant que les enzymes de modification BufB1 et BufC1 sont importantes dans la biogénèse de Buf (Fig. 72).

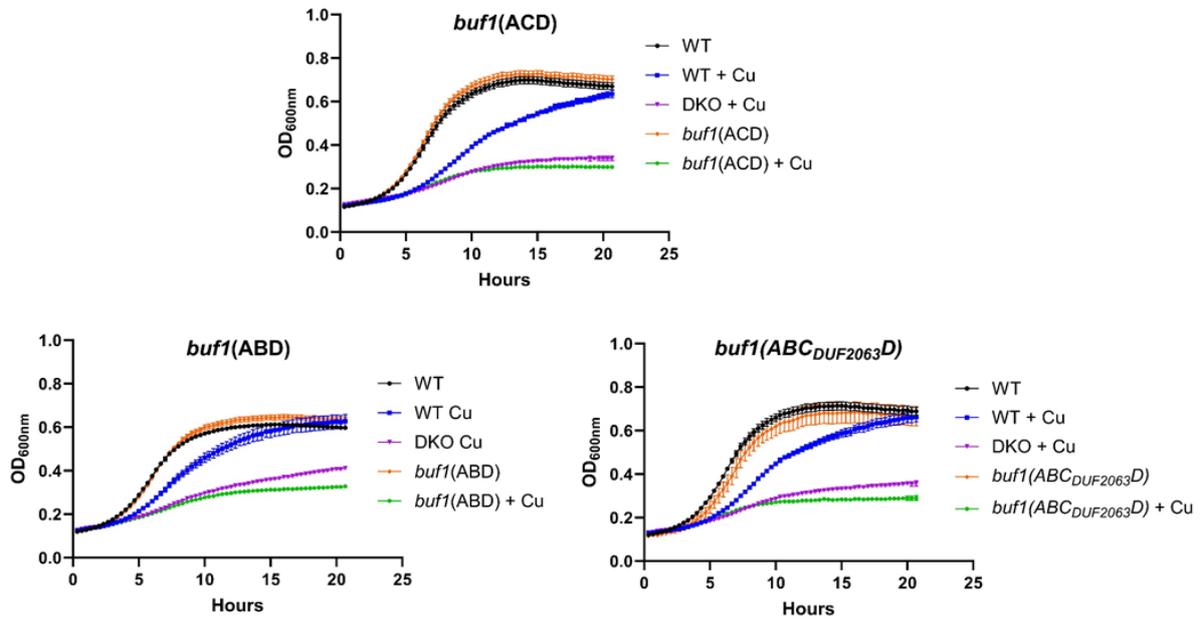


Figure 72. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 μ M. Comparaison des mutants de BufB1, *buf1(ACD)*, de BufC1, *buf1(ABD)* et *buf1(ABC_{DUF2063D})* qui ne contient plus que le domaine DUF2063 de la protéine C1, contre le WT et le DKO.

Ces mutants ont été analysés en LC-MS par Séverine Zirah et Céline Guillaume après surexpression du facteur sigF en présence d'IPTG. Les analyses de LC-MS sur les extraits cellulaires solubles montrent une absence de production du précurseur, suggérant des peptides plus sensibles à la dégradation. Ceci suggère une absence de modifications post-traductionnelles.

Concernant les mutants *buf1(ACD)* et *buf1(ABC_{DUF2063D})*, la question de la production du reste de la protéine C1 se pose. Afin de pouvoir détecter la protéine C1, un anticorps α -BufC1 a été produit contre la protéine recombinante purifiée. Après une induction des opérons RiPPs au Cu pendant une nuit, les protéines solubles des souches WT, DKO, *buf1(ACD)*, *buf1(ABD)* et *buf1(ABC_{DUF2063D})*, ont été utilisées pour un immunoblot.

Les résultats montrent que la protéine BufC1 à 27 kDa est retrouvée dans la fraction soluble de la souche sauvage. BufC1 est retrouvée chez le mutant *buf1(ACD)* en quantité plus faible, suggérant et confirmant un complexe entre les protéines B1 et C1 où la protéine B1 stabilise la protéine C1. En revanche, la partie DUF2063 attendue à 14.5 kDa dans le mutant de

délétion du domaine RRE est absente du Western Blot (Fig. 73). Alors que l'absence de bande chez la souche mutante *buf1(ABD)* est attendue, puisqu'elle ne produit pas C1, l'absence de bande pour le mutant *buf1(ABC_{DUF2063}D)* pourrait s'expliquer par une mauvaise reconnaissance de la partie DUF2063 par l' α -BufC1 ou par une dégradation protéolytique du domaine restant. Ainsi, soit la partie DUF2063 seule ne suffit pas à installer les modifications, soit l'absence du RRE rend la protéine sensible à la dégradation.

En ce qui concerne la détection de la protéine BufB dans les différentes souches, nous n'avons pas d'anticorps contre cette protéine. Les deux protéines B et C travaillent vraisemblablement en complexe, comme c'est le cas pour MbnBC ou TglHI (52). Il est donc possible que la perte d'une des deux déstabilise l'autre, mais ceci n'a pas été testé chez *C. vibrioides*.

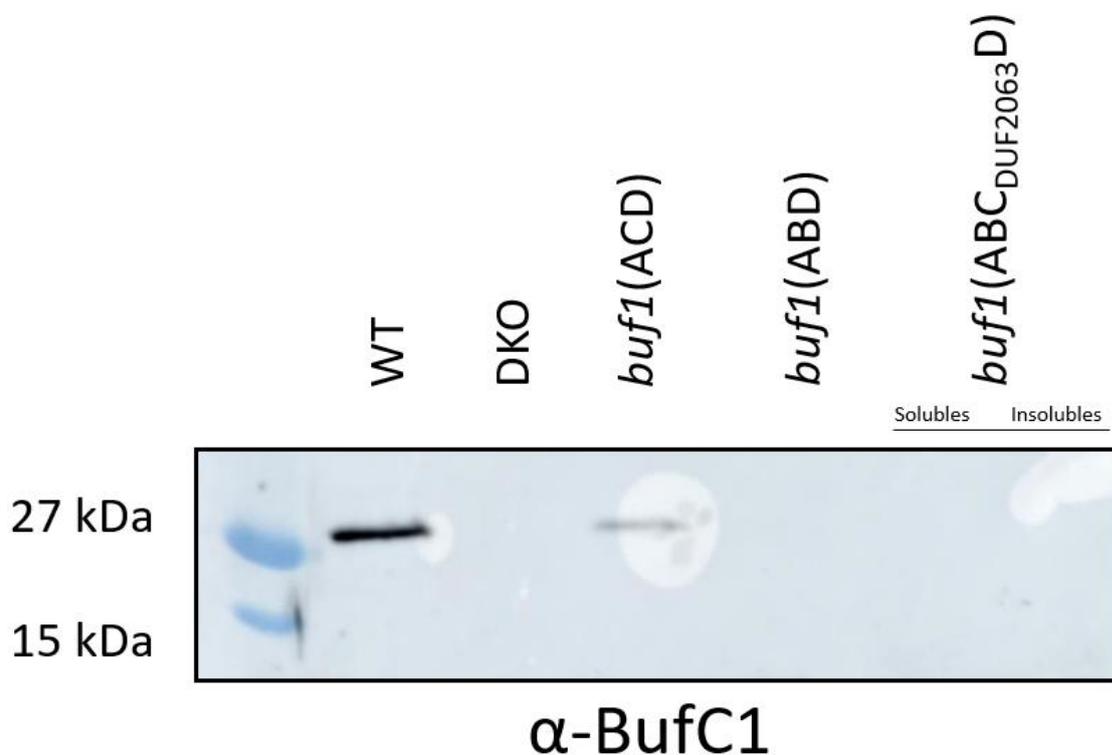


Figure 73. Western Blot pour détecter C1 dans les différentes souches, après une induction d'une nuit au CuSO_4 (100 μM).

b. Caractérisation des déterminants d'interaction présents sur le précurseur

i. Caractérisation par technique de co-précipitation

Dans un premier temps, l'interaction entre le précurseur BufA1 et la protéine BufC1 a été étudiée par la technique de co-précipitation. Cette technique consiste à mettre les protéines en contact, d'accrocher l'une des deux par une résine spécifique et de révéler l'autre, par Western Blot. Si les deux protéines interagissent, la 2^{ème} protéine sera précipitée (« pull

down ») en même temps que la première et sera révélée par immunoblotting. Le témoin négatif consiste à mettre la protéine à révéler en présence de la résine mais en absence du partenaire, afin de vérifier l'absence d'interaction aspécifique entre la protéine à révéler et la résine. Plusieurs constructions et plusieurs conditions de co-précipitation ont été testées et listés dans le tableau 5.

Tableau 5. Constructions et conditions de co-précipitation utilisées

Constructions BufA1 et BufA2	Constructions BufC1 et RRE1	Protéines BufA1 et BufA2	Protéines BufC1 et RRE1	Pull down	Révélation
His-SUMO- BufA1	GB1-BufC1	BufA1 purifié	BufC1 purifié	BufC1 par IgG- sépharose	BufA1 par anti-His
His-SUMO- BufA1	GB1-BufC1	BufA1 purifié	BufC1 purifié	BufA1 par nickel	BufC1 par IgG
His-SUMO- BufA1	GB1-BufC1	BufA1 en extrait total	BufC1 purifié	BufC1 par IgG- sépharose	BufA1 par anti-His
His-SUMO- BufA1	GB1-BufC1	BufA1 purifié	BufC1 en extrait total	BufA1 par nickel	BufC1 par IgG
His-SUMO- BufA1	GB1-BufC1	BufA1 en extrait total	BufC1 en extrait total	BufC1 par IgG- sépharose	BufA1 par anti-His
His-SUMO- BufA1	GB1-BufC1	BufA1 en extrait total	BufC1 en extrait total	BufA1 par nickel	BufC1 par IgG
His-SUMO- BufA1	GB1-RRE1	BufA1 purifié	RRE en extrait total	BufA1 par nickel	RRE par IgG
His-SUMO- BufA1	GB1-RRE1	BufA1 en extrait total	RRE1 en extrait total	RRE1 par IgG- sépharose	BufA1 par anti-His
His-SUMO- BufA1	GB1-BufC2	BufA1 en extrait total	BufC2 en extrait total	BufC2 par IgG- sépharose	BufA1 par anti-His
His-SUMO- BufA2	GB1-BufC1	BufA2 en extrait total	BufC1 en extrait total	BufC1 par IgG- sépharose	BufA2 par anti-His
His-SUMO- BufA2	GB1-RRE1	BufA2 en extrait total	RRE1 en extrait total	RRE1 par IgG- sépharose	BufA2 par anti-His
His-SUMO- BufA1	MBP-BufC1	BufA1 en extrait total	BufC1 en extrait total	BufA1 par nickel	BufC1 par anti-MBP
His-SUMO- BufA1	MBP-BufC1	BufA1 en extrait total	BufC1 en extrait total	BufC1 par amylose	BufA1 par anti-His
His-SUMO- BufA1	MBP-RRE1	BufA1 en extrait total	RRE1 en extrait total	BufA1 par nickel	RRE1 par anti-MBP
His-SUMO- BufA1	MBP-RRE1	BufA1 en extrait total	RRE1 en extrait total	RRE1 par amylose	BufA1 par anti-His
MBP-BufA1	His-C1	BufA1 en extrait total	BufC1 en extrait total	BufA1 par amylose	BufC1 par anti-His
MBP-BufA1	His-C1	BufA1 en extrait total	BufC1 en extrait total	BufA1 par nickel	BufC1 par anti-MBP

Cependant, dans toutes ces conditions, les résultats ne sont pas interprétables car les témoins négatifs révèlent une bande correspondant à une interaction aspécifique de la protéine à révéler avec la résine, invalidant l'interaction entre les deux protéines. Ces difficultés pourraient provenir de la partie hydrophobe de BufA1 mais pourrait aussi provenir ou d'un mauvais repliement de BufC1, qui aurait besoin d'être en complexe avec BufB1 pour l'interaction avec le précurseur.

Des fusions entre B1 et C1, inspirées de la fusion BC chez *R. gelatinosus*, ont été construites avec un S-tag, et des tests de co-précipitations ont été faits avec différents variants du précurseur BufA1 fusionné à la maltose binding protein (MBP), dont des résidus N-terminaux ont été retiré progressivement pour perdre la plus grande partie du peptide signal, puis l'ensemble du peptide signal ainsi que le premier brin beta :

MBP-BufA1 :

- MTRTATTAALAAAIALSAGVSIAAAEDEHKAGAQTCKCYGVSKAGENDCKAGAGTSC
AGTSKVDYQGDAWKMVKKGTCVTIKTPKGMGSLTPKA

MBP-BufA1^{mid} :

- MTRTATTAALAAAIALSAGVSIAAAEDEHKAGAQTCKCYGVSKAGENDCKAGAGTSC
AGTSKVDYQGDAWKMVKKGTCVTIKTPKGMGSLTPKA

MBP-BufA1^{short} :

MTRTATTAALAAAIALSAGVSIAAAEDEHKAGAQTCKCYGVSKAGENDCKAGAGTSC
AGTSKVDYQGDAWKMVKKGTCVTIKTPKGMGSLTPKA

La protéine BufB1C1 et les différents variants de BufA1 ont été mis en contact, les variants de BufA1 ont été précipités par de la résine amylose (MBP) et la protéine BufB1C1 a été révélée par un anticorps α -S-tag par Western Blot. Pour chaque co-précipitation, la quantité de protéines de BufA1 engagée a été vérifiée par un anticorps α -MBP. Contrairement aux essais de co-précipitation avec BufC1 seul, les témoins négatifs ne montrent aucune interaction aspécifique entre la protéine à révéler et la résine utilisée (Fig. 74).

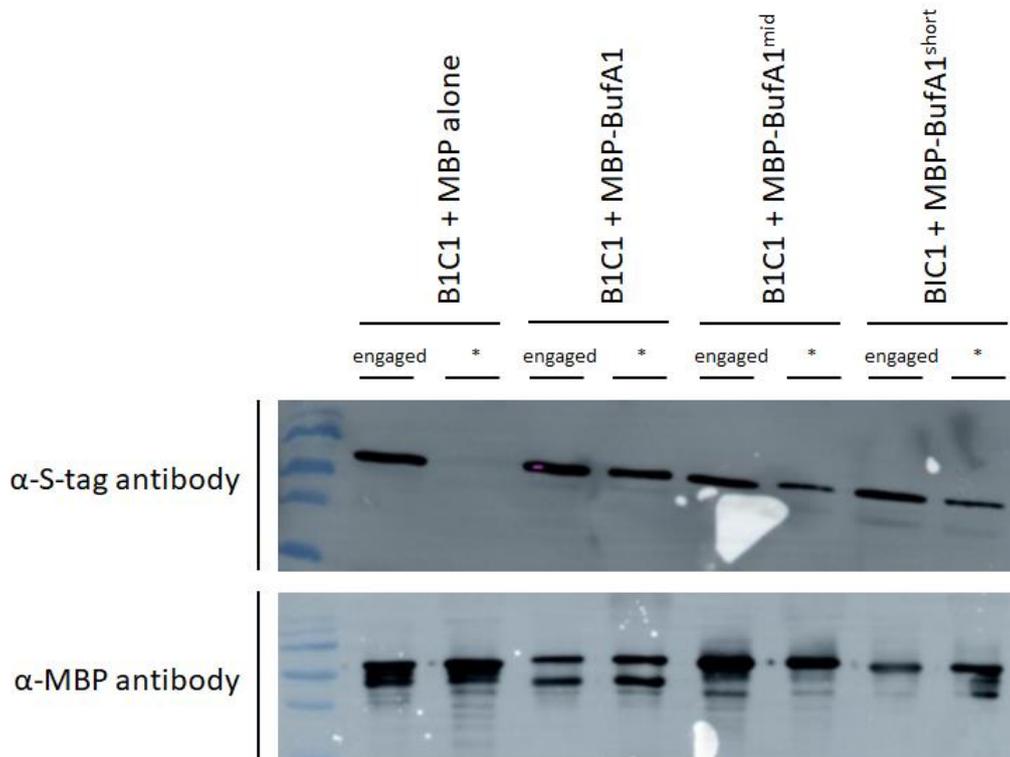


Figure 74. Western Blot montrant une interaction spécifique entre BufB1C1 S-tag et différents variants de la fusion MBP-BufA1

De façon intéressante, les constructions MBP-BufA1, où la région qui contiendrait les signaux de reconnaissance du précurseur par BufC1 a été raccourcie, présentent des interactions plus faibles avec la fusion BufB1C1. Cependant le signal n'est pas plus faible lorsqu'on a délété à la fois le peptide signal et la région mature N-terminale incluant le premier brin β , que lorsqu'on a délété seulement le peptide signal. La région du premier brin beta présente dans la première mais pas dans la deuxième, ne semble pas contribuer de façon majeure à l'interaction selon cette expérience. Il est possible qu'en absence du peptide signal elle ne se positionne pas correctement vis-à-vis du complexe BC.

En revanche, il reste une interaction entre la forme la plus courte et le complexe BufB1C1. Ceci suggère que la reconnaissance ferait intervenir un signal composite, comme indiqué par le modèle AlphaFold : BufC1 reconnaîtrait le peptide leader, qui est inclus dans la portion N-terminale du précurseur, et B1 reconnaîtrait la région autour des Cys à modifier.

ii. Caractérisation par test phénotypique et analyses en LC-MS

Pour confirmer l'importance de la séquence du peptide signal, du premier brin β et de la partie mature dans la biosynthèse, des mutants ont été construits sur le précurseur BufA1 (tab. 6) :

un mutant délété de la partie hydrophobe du peptide signal (*buf1*(A^{ΔHySP}BCD)), un mutant où le peptide signal de BufA1 a été remplacé par celui du BufA2 (*buf1*(A^{SPA2}BCD)) ou par celui de CCNA_01592, une protéine de *C. vibrioides* dont le peptide signal a une séquence très proche de celle de BufA1 (*buf1*(A^{SPX}BCD)), et des mutants où le brin β a été délété (*buf1*(A^{ΔTEKCY}BCD)) ou remplacé par une autre séquence (*buf1*(A^{AAACA}BCD)) ont été construits sur le précurseur BufA1. De plus, pour déterminer l'importance de la partie mature du précurseur, le gène du précurseur *bufA2* avec le peptide signal de celui de BufA1 a été introduit à la place du précurseur natif de l'opéron *buf1* (*buf1*(A^{2SPA1}BCD)). Ces différents mutants sont listés dans le tableau 6 et ont été testés pour leur phénotypique en culture en présence de CuSO₄.

Tableau 6. Séquences protéiques des précurseurs des mutants de BufA1. La séquence native du précurseur BufA1 est représentée en vert foncé avec les 4 cystéines en jaune. Les acides aminés délétés sont représentés en gris, les acides aminés substitués en rouge, et les séquences des peptides signaux de BufA2 et de CCNA_01592 (SPX dénote ce signal peptide) sont représentées respectivement en vert clair et en violet.

Souches	Séquence protéique des précurseurs
WT	MTRTATTAALAAAIALSAGVSIAAADEHKAGAQTEKCYGVSKAGENDCKAGA GTSCAGTSKVDYQGDawkmvkkgTCVTIKTPKGMGSLTPKA
Modifications du Peptide signal	
<i>buf1</i> (A ^{SPA2} BCD)	VKETTmnsIKSVTLASAAALFALTSVAATPSFADEHKAGAQTEKCYGVSKAGE NDCKAGAGTSCAGTSKVDYQGDawkmvkkgTCVTIKTPKGMGSLTPKA
<i>buf1</i> (A ^{SPX} BCD)	MIRTAMIAATALAASLAASAPAFADeHKAGAQTEKCYGVSKAGENDCKAGAG TSCAGTSKVDYQGDawkmvkkgTCVTIKTPKGMGSLTPKA
<i>buf1</i> (A ^{ΔHySP} BCD)	MTRTATTAALAAAIALSAGVSIAAADEHKAGAQTEKCYGVSKAGENDCKAGA GTSCAGTSKVDYQGDawkmvkkgTCVTIKTPKGMGSLTPKA
Modifications du premier brin β	
<i>buf1</i> (A ^{AAACA} BCD)	MTRTATTAALAAAIALSAGVSIAAADEHKAGAQAACAGVSKAGENDCKAGA GTSCAGTSKVDYQGDawkmvkkgTCVTIKTPKGMGSLTPKA
<i>buf1</i> (A ^{ΔTEKCY} BCD)	MTRTATTAALAAAIALSAGVSIAAADEHKAGAQTEKCYGVSKAGENDCKAGA GTSCAGTSKVDYQGDawkmvkkgTCVTIKTPKGMGSLTPKA
Remplacement de la partie mature	
<i>buf1</i> (A ^{2SPA1} BCD)	MTRTATTAALAAAIALSAGVSIAAADSKAAAENVHCYGVNTCKGSSDCKTAK NECKGQNECKGQGFKAMTKKACLtaggSLTAPQ

Les courbes de croissance ont montré un phénotype WT pour le mutant *buf1*(A^{SPX}BCD), un phénotype DKO pour les mutants *buf1*(A^{1SPA2}BCD) et *buf1*(A^{2SPA1}BCD) et un phénotype intermédiaire pour le mutant *buf1*(A^{ΔHySP}BCD) (Fig. 75).

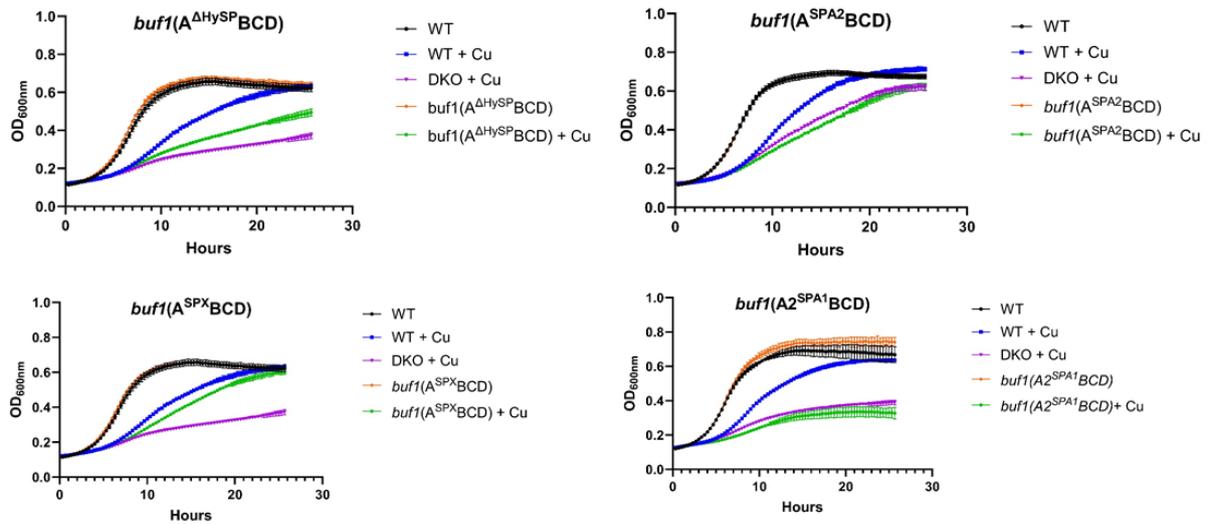


Figure 75. Suivi de croissance en présence ou en absence de CuSO₄ à 225 μM. Comparaison des mutants *buf1*(A^{ΔHySP}BCD), *buf1*(A^{SPA2}BCD), *buf1*(A^{SPX}BCD) et *buf1*(A^{2SPA1}BCD) contre le WT et le DKO.

Ces résultats appuient une reconnaissance composite du précurseur où le peptide signal et la partie mature interviennent. Dans le peptide signal, les premiers résidus pourraient être importants. En effet, lorsque l'on compare les séquences des peptides signaux de BufA1, BufA2 et CCNA_01592, on observe un meilleur alignement entre BufA1 et CCNA_01592 notamment des 10 premiers résidus, alors que les régions hydrophobes sont assez similaires entre les 3 (Fig. 76 et 77). Le signal peptide de BufA2 est un peu plus long.

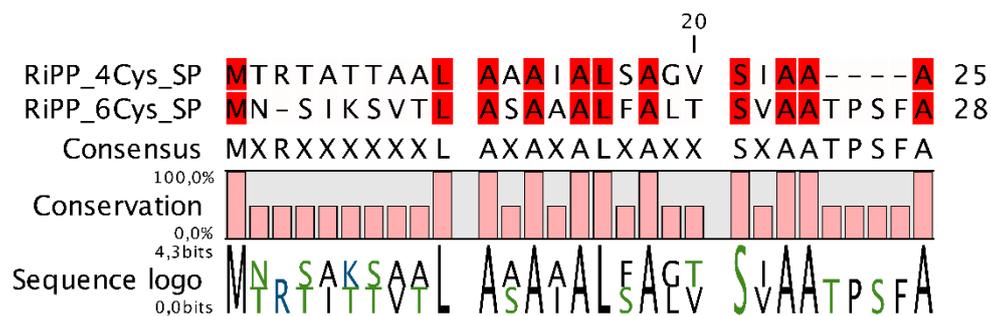


Figure 76. Alignement des peptides signaux de BufA1 avec celui de BufA2 (Rudy Antoine)

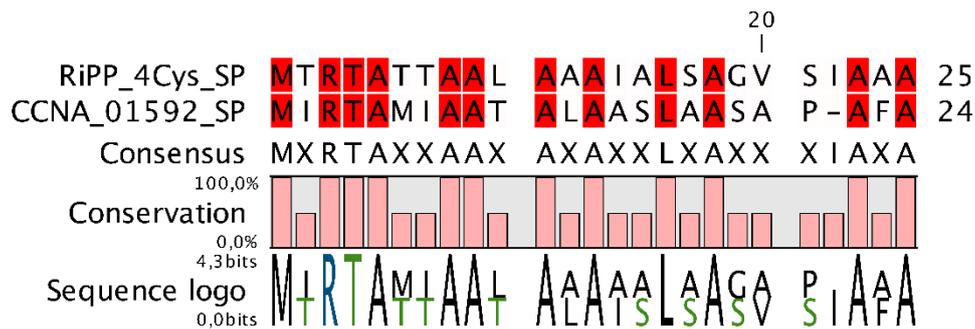


Figure 77. Alignement des peptides signaux de BufA1 avec celui de CCNA_01592 (Rudy Antoine).

Le phénotype intermédiaire du mutant *buf1*(A^{ΔHySP}BCD) est plus difficile à interpréter. En effet il est vraisemblable que le peptide soit dans le mauvais compartiment. Etant donné que le peptide signal, qui permet la prise en charge et le transport dans le périplasme par la machinerie Sec, ne possède plus la partie hydrophobe, le précurseur resterait dans le cytoplasme. On peut donc difficilement comparer son phénotype à celui des autres.

Ces mutants ont été analysés en LC-MS par Séverine Zirah et Céline Guillaume après surexpression du facteur sigF en présence d'IPTG. Les analyses de LC-MS sur les extraits cellulaires solubles n'ont pas permis de détecter le précurseur ou le peptide mature pour les mutants *buf1*(A^{ΔHySP}BCD) et *buf1*(A^{SPA2}BCD), suggérant des peptides plus sensibles à la dégradation. Le mutant *buf1*(A^{SPX}BCD) présentait la forme Δ10 Da, caractéristique du peptide Buf1 mature.

Les phénotypes en culture en excès de cuivre ainsi que les analyses en LC-MS des mutants *buf1*(A^{ΔTEKCY}BCD) et *buf1*(A^{AAACA}BCD) restent à tester.

iii. Caractérisation par technique de polarisation de fluorescence

Pour confirmer les résultats précédents et poursuivre la caractérisation de ces déterminants, l'étude des interactions entre le précurseur BufA1 et les protéines BufB1C1, BufB1 et BufC1 par la technique de polarisation de fluorescence a été initiée. Le principe de cette technique repose sur la capacité de rotation d'un peptide liée à un fluorochrome et de son effet sur une lumière polarisée. Lorsque le peptide est libre, sa capacité de rotation dans le milieu est grande, induisant une dépolarisation de l'émission de fluorescence. A l'inverse, lorsque le peptide est lié à une protéine, sa capacité de rotation est fortement réduite, ne modifiant pas la polarisation d'émission de fluorescence.

Cette technique consiste donc à mettre en contact un peptide lié à un fluorochrome (tracer) et une protéine partenaire à différentes concentrations, et de lire la fluorescence à l'aide un lecteur de plaque aux ondes d'excitation et d'émission adéquates. Le témoin négatif consiste à utiliser une protéine qui ne lie pas le tracer, afin de vérifier l'absence d'interaction aspécifique. Trois peptides dérivés de BufA1, potentiels sites de liaison à BufB1 et BufC1, ont été construits et liés à un fluorochrome, la fluorescéine :

Peptide 1 : FITC-linker hexyl-GENDCKAGAGTSCAGTSKVD

Peptide 2 : FITC-linker hexyl-GADEHKAGAQTEKCYGVSK

Peptide 3 : FITC-linker hexyl-GMTRTATTAATAGSSGS

Le peptide 1 correspond à la région du core contenant les CysII et CysIII. Le peptide 2 correspond au début du core, y compris le brin β 1 proposé par le modèle comme interagissant avec le feuillet β du domaine RRE par beta augmentation. Enfin le peptide 3 correspond au début du peptide signal, mais rendu plus polaire dans sa région C terminale pour augmenter sa solubilité. Il n'est donc pas un reflet parfait de la séquence naturelle. Pour la mise au point de la polarisation de fluorescence, le peptide 2 a été mis en contact avec différentes concentrations de BufB1C1 ou de BufC1.

La mise au point a pour objectif de trouver le point de saturation de la fluorescence, qui correspond à la concentration maximale de protéine capable de stabiliser le tracer. Les premiers résultats indiquent une interaction entre ce peptide et chacune des deux protéines. Cependant, la saturation n'est pas atteinte même si les courbes s'infléchissent aux fortes concentrations de protéine (jusqu'à 1 mM pour B1C1 et 0.1 mM pour C1). La concentration du tracer a donc été diminué (de 50 nM initialement à 2.5 nM dans les derniers tests) afin d'éviter de consommer trop de protéines (Fig. 78).

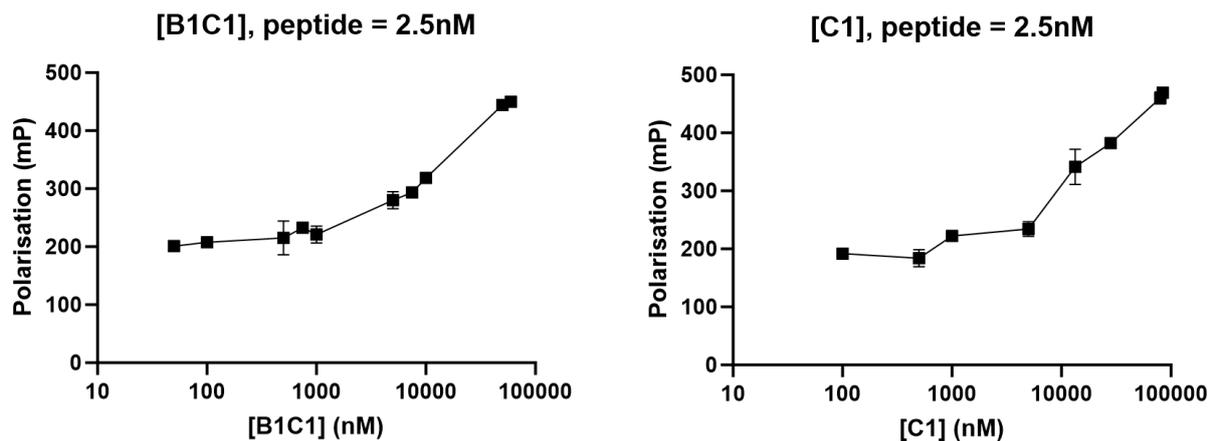


Figure 78. Résultats de polarisation de fluorescence obtenus pour les tests d'interaction entre le peptide 2 et B1C1 ou C1

L'absence de saturation pourrait s'expliquer par une interaction très faible des protéines avec cette région du précurseur. Si la reconnaissance est multipartite, lorsque qu'un seul signal de reconnaissance est présent, l'affinité avec BufB1 et/ou BufC1 serait très faible, alors que la présence des différents signaux au long du précurseur augmenterait l'affinité. D'autres tests restent à réaliser : faire les mêmes expériences avec les peptides 1 et 3, ainsi que vérifier les résultats avec une protéine qui ne lie pas les peptides comme témoin négatif.

3. Caractérisation de la fonction de la protéine DoxX

Une autre question concerne le rôle de l'enzyme DoxX dans l'opéron *buf1*. Les mutants *buf1* et *buf2* ne montrent aucune différence de croissance en présence de CuSO_4 par rapport au WT, suggérant que DoxX n'est pas important puisque l'opéron *buf2* ne porte pas de gène correspondant. Cependant, DoxX pourrait être important pour l'opéron *buf1*. Un mutant de délétion de DoxX *buf1(ABC)* a été construit dans la souche *buf1* et testé pour son phénotypique en culture en présence de CuSO_4 . Les courbes ont montré un phénotype WT, suggérant que l'opéron *buf1* reste fonctionnel et protège les cellules contre le Cu sans DoxX (Fig. 79).

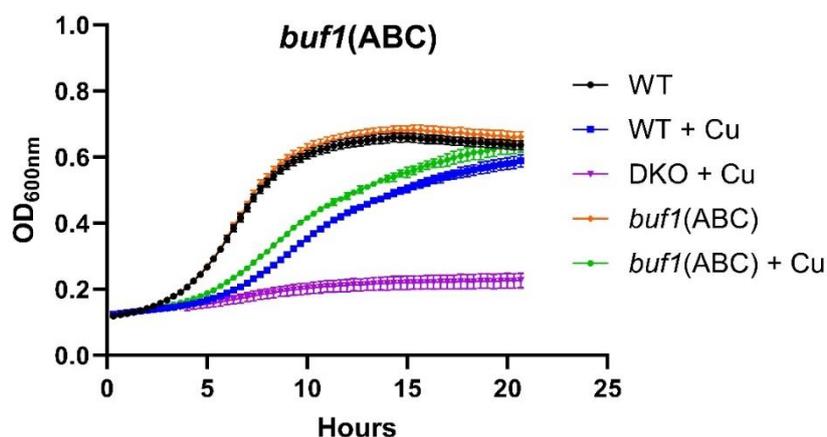


Figure 79. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 225 µM. Comparaison des mutants de DoxX *buf1(ABC)* avec le WT et le DKO.

Le mutant *buf1(ABC)* a été analysé en LC-MS par Séverine Zirah et Céline Guillaume après surexpression du facteur sigF en présence d'IPTG. Les analyses de LC-MS sur les extraits cellulaires solubles montrent que le mutant *buf1(ABC)* présentait la forme -10 Da, suggérant que l'absence de DoxX n'a pas d'effet sur les modifications. Une hypothèse du rôle de DoxX chez *C. vibrioides* pourrait être que la protéine permet de recycler les bufferines oxydées par leur contact avec le Cu en vue de leur réutilisation. Cependant, les études phénotypiques et en LC-MS ne sont pas suffisamment fines pour étudier un tel rôle. Un rôle indépendant mais complémentaire de DoxX avec les bufferines n'est pas à exclure. Par exemple comme les stress cuivrique et oxydant sont liés, il pourrait contribuer à lutter contre le stress oxydant. D'autres tests doivent être mis en place afin de mettre la fonction de DoxX en évidence.

III. Caractérisation de la fonction de la bufferine chez *B. pertussis*

Au vu des résultats obtenus chez *C. vibrioides*, et pour revenir à l'origine de ce travail, initié pour caractériser le rôle de la bufferine de *B. pertussis* dans la pathogénicité de l'agent de la coqueluche, une caractérisation de la fonction a été tentée chez *B. pertussis*. Les différentes approches menées chez *C. vibrioides* ont permis de faire un lien entre la bufferine, la tolérance au Cu (croissance) et l'HOCl (induction). *B. pertussis* est une bactérie pathogène et se retrouve phagocytée par les macrophages où le Cu est en excès dans les phagosomes. Pour se défendre contre les agents pathogènes, les neutrophiles, cellules de l'immunité innée, produisent de l'HOCl. Cette explosion oxydative des neutrophiles suit la phagocytose et

nécessite la myéloperoxidase (111). Ceci pourrait expliquer la présence de cet opéron RiPP dans son régulon de virulence.



Figure 80. Représentation schématique de l'opéron bufferine de *B. pertussis*. Les gènes *bp2924*, *bp2925*, *bp2926* et *bp2927* codent respectivement pour le précurseur DUF2282, l'enzyme MNIO, la protéine DUF2063-RRE et DoxX.

Chez *B. pertussis*, trois mutants étaient déjà disponibles au laboratoire: un mutant BPEL délété de l'opéron complet et un mutant $B\Delta 26$, délété de *bp2926*, gène codant pour l'enzyme de modification BufC. Un mutant dit « optimisé » avait aussi été construit, où le codon d'initiation de chaque gène chevauche le codon STOP du gène précédent afin de forcer la traduction des protéines Bp2925, Bp2926 et Bp2927. En effet, les résultats de transcriptomiques ont indiqué que le gène *bp2924* codant la bufferine, est transcrit beaucoup plus fort que les trois autres, suggérant une atténuation transcriptionnelle importante.

1. Premiers tests phénotypiques

Le premier test de phénotype testé est la culture en excès de Cu. Pour cela, des suivis de croissance ont été réalisés par le lecteur de plaque SPARK TECAN en présence ou en absence de 1 mM de Cu dans le milieu riche SS. Cette concentration a été choisie comme étant la plus élevée possible ayant des effets modérés sur la croissance liquide de *B. pertussis*.

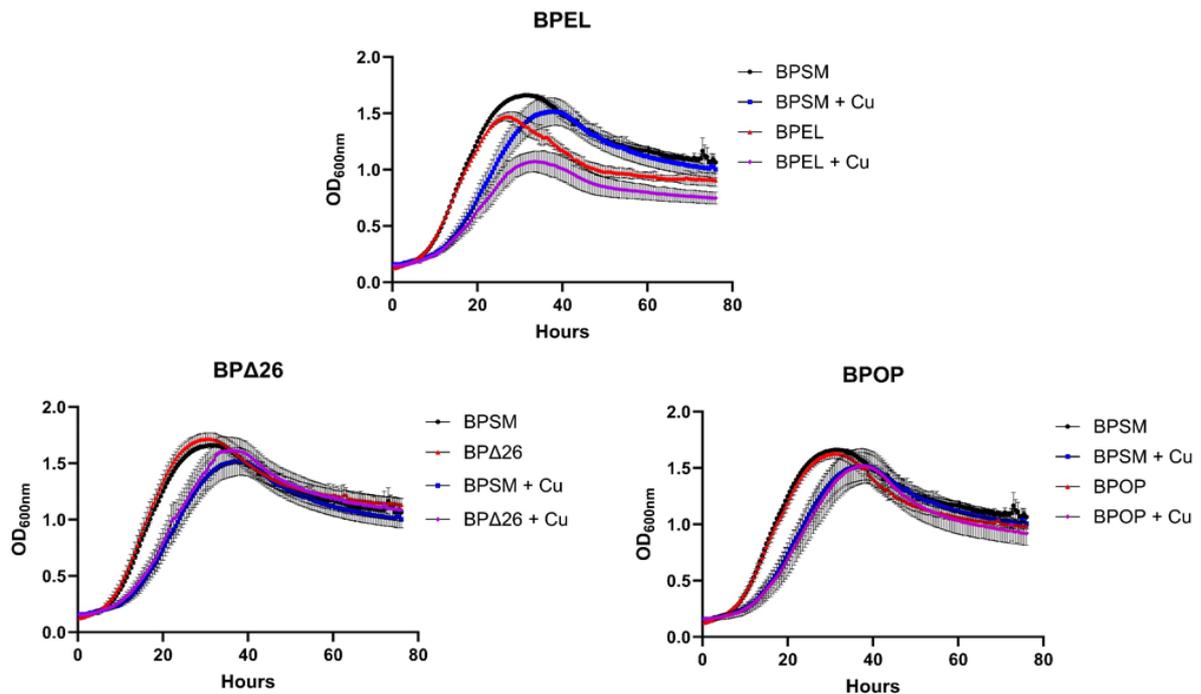
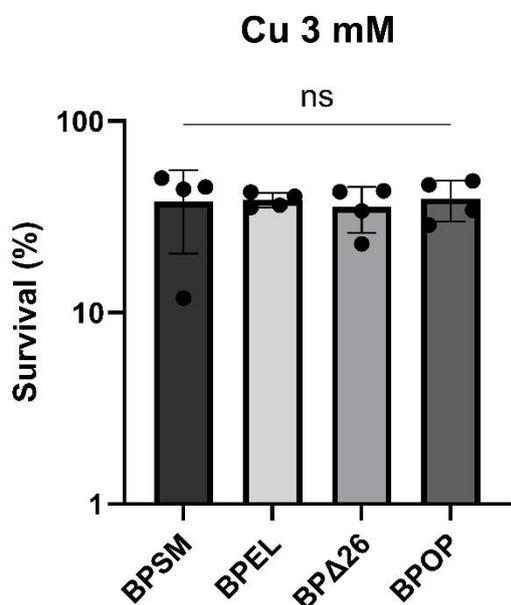


Figure 81. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre 1 mM. Comparaison de BPEL, BPA26 et BPOP contre BPSM (WT).

Dans la Fig. 81, en absence de Cu, la souche BPEL présente une croissance altérée par rapport à BPSM (WT). Elle démarre à la même vitesse mais sa DO plafonne plus tôt et plus bas. En présence de Cu, les souches BPSM et BPEL présentent cette même différence de croissance. Ces courbes ne permettent donc pas de conclure sur un rôle de protection contre l'excès de Cu. En absence ou en présence de Cu, les souches BPSM et BPA26 ont des croissances similaires. Ces courbes peuvent suggérer deux conclusions différentes : soit Buf n'est pas impliqué dans la protection contre le Cu chez *B. pertussis* soit il n'est pas nécessaire que BufA soit modifié pour être fonctionnel chez cette bactérie. Cette dernière hypothèse serait en accord avec des résultats de protéomique obtenus au laboratoire : les trois dernières protéines ne sont que peu ou pas détectables, ce qui suggère que BufA pourrait n'être que partiellement modifiée. Dans la figure C, en absence ou en présence de Cu, les souches BPSM et BPOP ont des croissances similaires, suggérant que les enzymes de modifications n'apportent pas de fonction supplémentaire. Ces résultats sont à prendre avec prudence, car nous n'avons pas encore caractérisé la masse de BufA chez *B. pertussis*. Ils suggèrent cependant que la bufferine pourrait jouer un rôle différent.

Une autre approche utilisée pour déterminer le rôle de la bufferine dans la protection contre le Cu est la survie après un choc. Des premiers chocs cuivriques sur des cultures en phase

stationnaire ont été effectués afin de déterminer les conditions adéquates : concentration de Cu, concentration d'acide ascorbique et temps d'exposition. La survie a donc été mesurée après 2 h d'exposition à 3 mM de Cu et 4 mM d'acide ascorbique.



Les résultats montrent que la survie des souches BPSM, BPEL, BPA26 et BPOP diminue après 2h d'exposition au Cu (Fig. 82). Cependant, aucune différence de survie n'est constatée entre ces souches. Ceci laisse supposer que la bufferine n'aurait pas de rôle dans la survie à un choc chez *B. pertussis*.

Figure 82. Résultats de survie des souches BPSM, BPEL, BPA26 et BPOP après 2h d'exposition à 3 mM de CuSO_4 (+ 4 mM d'acide ascorbique)

Différents stress oxydants ont aussi été testés: $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ produit par la réaction de la xanthine oxydase avec l'hypoxanthine et HOCl (Tab. 7).

Tableau 7. Conditions de tests phénotypiques utilisées et résultats.

Tests phénotypiques	Stress oxydants	Résultats
Survie après un choc (PBS)	$\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$	Aucune différence
Survie après un choc (PBS)	HOCl	Bactéries trop sensibles
Survie après un choc (SS)	HOCl	Milieu trop protecteur

Ainsi, les tests de survies à différents stress oxydants n'ont pas permis de conclure sur le rôle de la bufferine dans la protection contre le stress oxydant.

Enfin, de la même manière que pour *C. vibrioides* avec les amibes, *B. pertussis* est une bactérie pathogène confrontée aux macrophages de l'hôte (112). Les macrophages utilisent comme stratégies de destruction bactérienne l'accumulation de Cu et de radicaux libres dans

leurs phagosomes. Afin d'étudier la fonction de la bufferine dans la protection contre la phagocytose médiée par les macrophages, des cellules de la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP1 ont été utilisées. Les souches BPSM, BPEL et BP Δ 26 ont été mises en contact avec les macrophages pendant 30 min, et la survie a ensuite été mesurée après 1h, 4h et 24h d'exposition macrophages (Fig. 83).

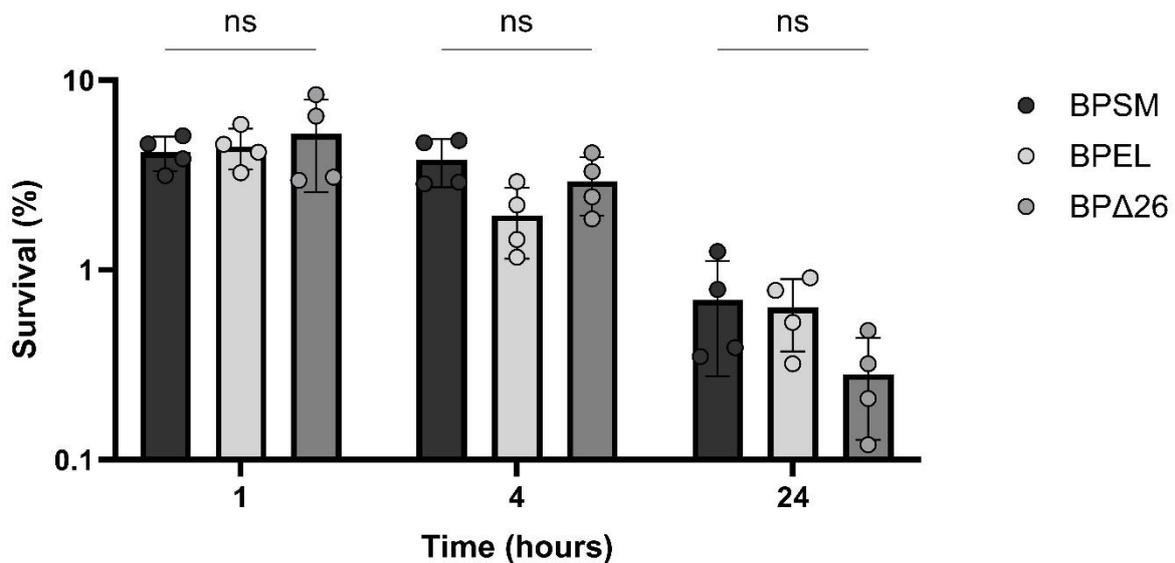


Figure 83. Survie des souches BPSM, BPEL, BP Δ 26 et BPOP après 1h, 4h ou 24h d'exposition aux THP1

Les résultats montrent que la survie des souches BPSM, BPEL et BP Δ 26 diminue avec le temps passé dans les macrophages. Cependant, aucune différence significative de survie n'est constatée entre ces souches. Ceci laisse supposer que la bufferine n'a pas ou peu de rôle dans la survie aux macrophages chez *B. pertussis*.

Concernant BPEL, il a été observé au laboratoire par une analyse transcriptomique que la délétion de l'opéron entier induisait une diminution de la transcription des gènes voisins de l'opéron *buf* transcrits de façon divergente, *bp2921-2923*. Le lien de la transcription entre ces deux opérons n'est pas connu et l'une des hypothèses est qu'il s'agisse d'effets sur la topologie de l'ADN. Le gène *bp2922* code une protéine appelée BfrG, une protéine homologue aux transporteurs de type « TonB-dépendants » connus pour l'importation de complexes fer-sidérophore à travers la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif. Il a été observé que l'expression de *bp2922* chez *B. pertussis* est régulée négativement par le Cu (113), suggérant que BfrG servirait à l'importation de ce métal à travers la membrane externe par un

mécanisme pour l'instant inconnu. La diminution de la transcription des gènes *bp2921-2923* suite à la délétion de l'opéron bufferine pourrait impacter les résultats des phénotypes liés au Cu. C'est pourquoi, deux nouveaux mutants ont été construits par Majda Hachmi, une doctorante du laboratoire qui s'intéresse à BfrG : un mutant $BP\Delta 24$ délété du gène *bp2924*, gène codant BufA, et un mutant $BP24_{STOP}$ où un codon STOP a été inséré au début du gène *bp2924* afin d'interrompre la traduction de BufA sans perturber l'ADN et éviter ainsi de potentiels effets topologiques. Afin de vérifier l'effet de ces mutations sur la transcription des gènes *bp2921-2923*, une analyse par RNAseq a été faite par Majda Hachmi. Parmi les mutants BPEL, $BP\Delta 24$ et $BP24_{STOP}$, seul le mutant $BP24_{STOP}$ présentait un taux de transcription des gènes *bp2921-2923* proches de ceux de BPSM, appuyant un effet de la topologie de l'ADN de la région *bp2924* sur l'opéron voisin. Ainsi les tests phénotypiques se sont ensuite focalisés sur le mutant $BP24_{STOP}$ afin d'éviter le biais lié à la transcription des gènes *bp2921-2923*.

2. Fonction de la bufferine dans la protection contre le stress cuivrique ?

a. Culture en présence de cuivre

Dans un premier temps et afin d'amplifier un potentiel phénotype, un plasmide suicide a été inséré dans le gène *copZ* de *B. pertussis*. En effet, *copZ* code une chaperonne cytoplasmique à Cu qui protège la bactérie d'un excès de Cu, et c'est l'une des rares défenses contre le Cu encore fonctionnelles chez *B. pertussis* (96). Des suivis de croissance dans le milieu riche SS ont été réalisés par le lecteur de plaque SPARK TECAN en absence ou en présence de différentes concentrations de Cu^{2+} ou de Cu^+ (réduit avec 1 mM d'acide ascorbique) (Fig. 84).

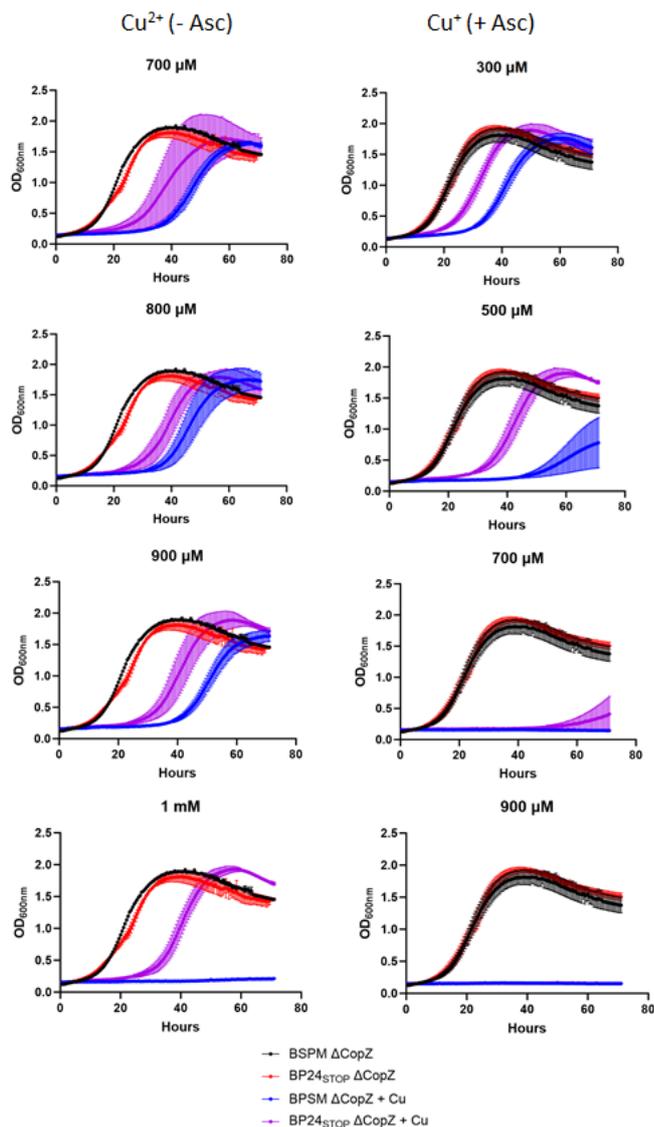


Figure 84. Suivi de croissance en présence ou en absence de cuivre Cu^{2+} ou Cu^+ à différentes concentrations. Comparaison de BPSM ΔcopZ contre BP24_{STOP} ΔcopZ en milieu SS.

Pour chacune des figures, en absence de Cu^{2+} ou Cu^+ , les souches BPSM- ΔcopZ (noir) et BP24_{STOP}- ΔcopZ (rouge) présentent des croissances similaires. En présence de Cu, les souches BPSM- ΔcopZ (bleu) et BP24_{STOP}- ΔcopZ (violet) présentent une croissance altérée où la souche BPSM est le plus affectée. Contrairement à *C. vibrioides*, les courbes ne suggèrent pas que Buf ait un rôle de protection contre l'excès de Cu. A l'inverse, l'absence de Buf semble favoriser la croissance des bactéries en excès de Cu. Il est possible que le rôle de Buf chez *B. pertussis* soit différent de celui de chez *C. vibrioides*.

b. Culture dans des milieux appauvris

Afin d'étudier le rôle de Buf dans l'acquisition ou le stockage du Cu chez *B. pertussis*, les souches BPSM et BP24_{STOP} sauvages ont été utilisées. Des suivis de croissance ont été réalisés par le lecteur de plaque SPARK TECAN dans différents milieux : le milieu pauvre THJS et un milieu contrôlé et développé au laboratoire et sous brevet, le milieu Milnez (Fig. 85).

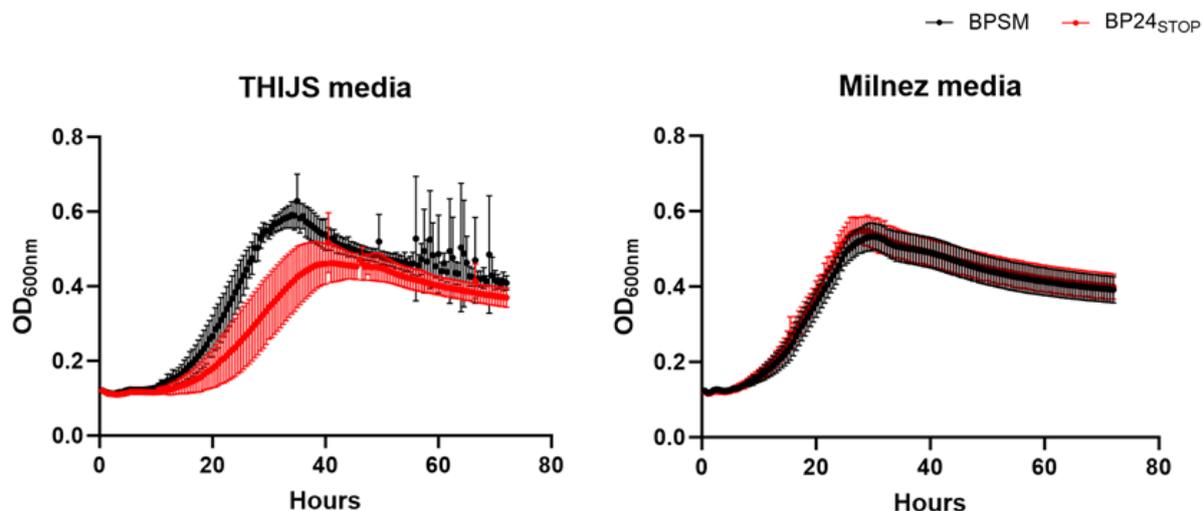


Figure 85. Suivi de croissance en milieu THIJS et milieu Milnez. Comparaison de BPSM contre BP24STOP en milieu THIJS et Milnez.

Dans le milieu THIJS, les souches BPSM et BP24_{STOP} présentent des croissances différentes, et celle de la souche BP24_{STOP} est réduite par rapport à la souche sauvage. Dans le milieu Milnez, les souches BPSM et BP24_{STOP} présentent des croissances similaires. Les milieux THIJS et Milnez se distinguent par la présence de métaux dans le milieu Milnez dont le Cu, alors que le milieu Thijs est dépourvu de métaux ajoutés, à l'exception du Fe. Ainsi, les courbes suggèrent que Buf semble être important dans des conditions de carence en métaux, ce qui serait compatible avec un rôle dans l'acquisition ou l'utilisation optimale de métaux. Il est donc important de tester cette hypothèse en excluant un à un les différents métaux composant le milieu Milnez : Cu, magnésium (Mg), calcium (Ca), Mn, Fe, Co et Zn.

Discussion et perspectives

Le Cu est un micronutriment essentiel pour tous les organismes vivants. Il est utilisé par une variété d'enzymes impliquées dans la respiration, le métabolisme de l'azote et la défense contre le stress oxydant. Cependant, il est également toxique car il perturbe l'équilibre rédox cellulaire, détruit les groupes Fe-S et affecte l'homéostasie protéique et lipidique. Dans la littérature, un certain nombre de stratégies assurant l'homéostasie du cuivre chez les bactéries ont déjà été caractérisées. Les bactéries exposées à des concentrations stressantes de ce métal ont notamment développé des systèmes de d'efflux, de détoxification et de passivation, qui sont finement régulés (89,95).

Les RiPPs sont des produits naturels peptidiques synthétisés par voie ribosomale et modifiés post-traductionnellement. Ces composés possèdent pour la plupart des propriétés antimicrobiennes, antivirales, antifongiques, herbicides ou cytotoxiques, mais sont aussi impliqués dans certains processus physiologiques, la communication et les interactions hôte-pathogènes. Au cours des dernières décennies, les RiPPs ont aussi intéressé la communauté scientifique en raison de leur diversité structurale et fonctionnelle, et les progrès récents des outils bio-informatiques et l'explosion des données génomiques ont permis d'identifier plus de 40 familles de RiPPs (1,50).

Durant ma thèse et grâce à une approche multidisciplinaire, nous avons caractérisé à la fois une stratégie bactérienne complémentaire d'adaptation au cuivre, et une nouvelle famille de RiPP dérivée des opérons « GIG » induits par les métaux lourds et trouvés chez plusieurs bactéries environnementales et pathogènes (87).

Chez la bactérie modèle *C. vibrioides*, les produits de cette nouvelle famille de RiPP, les bufferines, sont impliqués dans la tolérance à un excès de cuivre, environnemental ou amibien, et permettent la limitation de la production des ROS en phase stationnaire. Bien que leur absence conduise à un ralentissement de la croissance de cette bactérie, les bufferines ne seraient que des acteurs supplémentaires dans la protection vis à vis d'un excès de cuivre, complétant les systèmes de défense actifs grâce à une stratégie de passivation. En effet, chez *C. vibrioides*, au moins un autre système pourrait prendre en charge les fortes concentrations en cuivre lors d'un choc (98). De plus, chez *C. metallidurans*, les GIG à eux seuls ne sont pas essentiels à la résistance à l'Au, à l'Ag ou au Cu (84).

Au vu des premières recherches du rôle des bufferines chez *B. pertussis*, on pourrait légitimement se questionner sur le rôle de toutes les bufferines de l'arbre phylogénétique. Il se pourrait que la fonction des bufferines soit différente en fonction du mode de vie des bactéries productrices, selon si ces bactéries sont environnementales, opportunistes ou pathogènes, strictement humains ou non. Tandis que l'expression des opérons des bufferines est

fréquemment contrôlée par des facteurs sigma spécifiques de fonction extracytoplasmique, la présence des bufferines chez des bactéries telles que *B. pertussis* et *L. pneumophila* indique qu'elles seraient probablement impliquées dans les interactions hôte-pathogène (85). Ainsi, les bufferines pourraient aider les bactéries à se protéger contre le cuivre rencontré dans les compartiments phagosomiaux des protistes prédateurs ou des phagocytes de mammifères (95). Cependant, contrairement à *L. pneumophila* où les bufferines sont exprimé lors d'une infection d'amibes, il a été montré que l'expression du régulon de virulence de *B. pertussis*, dont fait partie l'opéron de la bufferine, est régulée négativement dans les macrophages, suggérant un rôle différent (114).

L'acquisition du cuivre est importante chez les bactéries pathogènes, spécifiquement pour l'assemblage de leurs propres cuproprotéines, car en dehors des cellules immunitaires, le cuivre est séquestré par les protéines de l'hôte présentes dans les muqueuses ou dans les fluides corporels. Un autre argument de cette différence de rôle des bufferines entre les bactéries pathogènes strictes et les bactéries environnementales est que la proportion de protéines impliquées dans la défense du cuivre dépend du style de vie. En effet, une étude *in silico* menée au laboratoire sur une centaine de β -protéobactéries a montré que les bactéries dont la niche est plus restreinte, telles que les bactéries pathogènes, commensales et symbiotiques présentaient de plus grandes proportions de cuproprotéines et de chaperonnes relativement à leurs systèmes de défense, alors que ces proportions sont inversées chez bactéries environnementales (102). En d'autres termes, lorsque les bactéries s'adaptent à une nouvelle niche que sont les hôtes eucaryotes à partir de l'environnement, la sélection naturelle semble favoriser l'élimination de gènes de défense contre le cuivre.

Cependant, des systèmes moins spécifiques peuvent à la fois être impliqués dans l'acquisition, le stockage et dans la protection contre le cuivre. Par exemple, la yersiniabactine d'*E. coli*, un métallophore notamment impliqué dans l'acquisition du fer, ainsi que le glutathion, le bacillithiol et le mycothiol peuvent jouer un rôle important dans la tolérance au cuivre, notamment en passivant les ions de cuivre par chélation. Plus important encore, les méthanobactines, qui constituent une autre famille de RiPP récupérant le cuivre du milieu pour l'assemblage des cuproenzymes, sont aussi capables de protéger les bactéries des métaux toxiques (102).

Bien que le rôle des bufferines dans la protection contre le cuivre ait été mis en évidence chez *C. vibrioides*, le sort des ions Cu^+ ou Cu^{2+} chélatés reste inconnu. Chez *C. vibrioides*, on peut imaginer que les bufferines périplasmiques pourraient transférer le cuivre à un transporteur d'exportation du cuivre dans la membrane externe, pCoB (98). Chez *B. pertussis* ou dans un contexte d'acquisition, on peut imaginer que les bufferines périplasmiques pourraient fournir le cuivre à des métallochaperons pour son acheminement vers les cuproprotéines (37,95).

Chez *B. pertussis*, il existe un opéron divergent de l'opéron *buf*, l'opéron *cruR-bfrG-bp2921* caractérisé en partie par un ancien thésard au laboratoire, Gauthier Roy, et par sa successeuse Majda Hachmi. BfrG est un transporteur de la membrane externe de type TonB-dépendant. L'expression de cet opéron est régulée négativement par un excès de cuivre de façon post-transcriptionnelle, via CruR (113), ce qui supporte l'hypothèse que BfrG importerait le cuivre. Selon les résultats du laboratoire, le cuivre importé par BfrG serait vraisemblablement sous forme chélatée. En ce qui concerne la protéine Bp2921, des prédictions de structure grâce au logiciel AlphaFold2 montrent une homologie de structure avec FoxB, caractérisée comme une réductase du Fe(III) dans un complexe avec la ferrioxamine, un sidérophore, conduisant à la libération périplasmique de Fe(II) (115). Bp2921 comporte une cavité périplasmique prédite bien plus large que ce qui est nécessaire pour fixer un ion métallique non chélaté ou un complexe métallique de petite taille. L'hypothèse actuelle est qu'une protéine périplasmique fixant le cuivre, comme un chaperon périplasmique à cuivre ou même la bufferine, interagisse avec Bp2921 pour que ce dernier réduise le Cu(II) en Cu(I). Après avoir été réduit par Bp2921, le cuivre serait pris en charge par une chaperonne périplasmique non encore identifiée pour l'assemblage des cytochrome C oxidases ou d'autres métalloprotéines nécessitant du cuivre (113).

Le rôle de la bufferine dans l'acquisition ou le stockage chez *B. pertussis* reste hypothétique et d'autres expériences doivent être réalisées afin de résoudre ce mystère de longue date, point de départ de ce projet.

La liaison du cuivre implique la modification post-traductionnelle de résidus cystéine en 5-thiooxazoles, un motif retrouvé très rarement dans la nature jusqu'à présent. L'état des lieux des connaissances sur les modifications de type 5-thiooxazole sont limitées à un seul produit naturel RiPP, la sélénobactérocine, dont la biosynthèse implique une enzyme radical-SAM (49). Néanmoins, le rôle de ce RiPP n'est pas connu.

La modification des résidus Cys en motifs 5-thiooxazole dans le précurseur BufA par l'enzyme MNIO BufB et sa protéine partenaire BufC, élargit le spectre de réaction des enzymes MNIO. A ce jour, les enzymes MNIO sont connues pour catalyser des réactions d'oxydation remarquables et installer au moins cinq modifications différentes : une oxazolone thioamide chez les méthanobactines, un 3-thiaglutamate chez les pearlins, un hétérocycle imidazolidinedione chez la chryséobasine, un amide C-terminal chez les aminopyruvatides et un acide (S)-3-amino-2-oxobutanoïque chez une méthanobactine du groupe V. Les enzymes MNIO présentent dans leur site actif un cofacteur multinucléaire contenant deux ou trois atomes de Fe. La modélisation par AlphaFold2 et l'analyse des métaux de BufB1 purifié ont

confirmé que l'enzyme MNIO impliquée dans la biosynthèse des bufferines contenait 2 ions Fe. De la même manière que les enzymes MNIO impliquées dans les autres modifications, BufB1 utiliserait ces centres de fer à valence mixte afin de permettre l'abstraction de protons du C β de la cystéine, initiant ainsi la réaction (6,50–52). Nos travaux ont permis d'accroître encore l'extraordinaire diversité chimique générée par les enzymes MNIO.

Dans notre modèle, les deux cycles 5-thiooxazole formés par l'enzyme MNIO BufB et sa protéine partenaire BufC sont impliqués dans la liaison du cuivre. Mais les expériences de résonance magnétique nucléaire (NMR), suggèrent l'implication d'acides aminés supplémentaires dans la chélation du Cu $^{2+}$. Ainsi, les acides aminés Thr9 et Trp44-Met46-Lys48 sont sur la face du feuillet β qui est orientée vers la boucle contenant les thiooxazoles. La comparaison des spectres RMN de la forme apo-bufferine et du complexe bufferine-Cu $^{2+}$ montre que ces résidus semblent se rapprocher de l'ion métallique dans le complexe par rapport à leur position dans l'apo bufferine, suggérant un changement de conformation de la bufferine lors de la liaison du Cu $^{2+}$. L'étude de la liaison du Cu $^{+}$ reste nettement plus difficile à mettre en place, puisqu'il faudra travailler en anaérobiose, mais il n'est pas à exclure que vu les différences de géométrie de coordination du Cu $^{+}$ et du Cu $^{2+}$, les acides aminés impliqués dans la chélation, en plus des thiooxazoles qui sont adaptés à lier les deux ions, soient légèrement différents. Des études complémentaires sont à faire, par résonance paramagnétique électronique et par spectroscopie d'absorption de rayons X.

Les bufferines constituent les deux plus grandes familles de RiPPs modifiées par des enzymes MNIO et présentent des propriétés originales. Premièrement, la présence de peptides signaux N-terminaux Sec-dépendants, inhabituelles parmi les RiPPs bactériens, conditionne la biogénèse des bufferines. L'utilisation de ces systèmes généralistes pour l'exportation et la maturation protéolytique dispense les bufferines de la nécessité de recourir à des transporteurs et des protéases spécifiques, ce qui expliquerait la taille réduite de leurs BGC par rapport à la majorité des RiPPs. Deuxièmement, la présence de peptides signaux N-terminaux Sec-dépendants pourrait aussi entraîner une compétition entre l'installation de modifications post-traductionnelle dans le cytoplasme et l'exportation médiée par le complexe Sec.

Bien que nos résultats sur la biogénèse soient encore préliminaires, ils ont mis en évidence que BufB nécessite la présence de sa protéine partenaire BufC dans l'installation des modifications post-traductionnelle. MbnB, impliquée dans la biosynthèse des méthanobactines, nécessite la présence de MbnC, TgIH, impliquée dans la biosynthèse d'une pearline, la présence de TgII, ChrH impliquée dans la biosynthèse de la chryséobasine, la

présence de ChrI, et ApyH impliquée dans la biosynthèse des aminopyruvates, la présence d'ApyI. Parmi les cinq exemples de modifications induites par les MNIO, seule l'enzyme MovX impliquée dans la biosynthèse des méthánobactines du groupe V ne nécessite pas de protéine supplémentaire. En effet, alors que les protéines partenaires TgII, ApyI et BufC1 contiennent un domaine de reconnaissance RRE, une région constituée de trois hélices α et trois feuillets β (2) qui recrute leurs substrats respectifs, MovX contient seulement une courte extension C-terminale jouant probablement un rôle équivalent. MbnC, la protéine partenaire de MbnB, contient un domaine N-terminal en hélice alpha et un domaine C-terminal en feuillet beta. Bien que ce deuxième domaine ne soit pas un domaine RRE, la structure du complexe MbnABC montre que le leader peptide de MbnA se lie à la protéine partenaire MbnC de manière analogue à la reconnaissance d'autres leader-peptides par les domaines RRE de leurs systèmes respectifs, en position anti-parallèle du feuillet beta (31,52). Chez la méthánobactine de *M. trichosporium* OB3b, MbnC ne serait pas nécessaire pour la formation de l'oxazolone N-terminale. Toutes les méthánobactines connues présentent deux hétérocycles : alors que le second semble toujours être un cycle oxazolone, le cycle N-terminal peut être un cycle oxazolone, pyrazinedione ou imidazolone. Il a été suggéré que le complexe MbnBC était impliqué dans la formation du groupe oxazolone thioamide, tandis que le groupe oxazolone N-terminal serait formé via un processus alternatif impliquant une aminotransférase (32). Enfin, le mécanisme de liaison de ChrHI à son précurseur reste encore inconnu. Les protéines partenaires présentent également un domaine supplémentaire, qui diffère selon les familles de RiPPs : DUF2063 pour BufC, DUF1772 pour ChrI, et d'autres domaines pour MbnC, TgII et ApyI (52). Au vu de toutes les modifications possibles par les protéines MNIO et leur(s) partenaire(s), on peut imaginer que les protéines partenaires permettent à la fois la reconnaissance de BufA1 et l'orientation des modifications des précurseurs. On pourrait donc extrapoler les résultats obtenus pour le sous-groupe DUF2282 aux précurseurs des sous-groupe RiPP_6/12 Cys et EGKC. En effet, leurs résidus Cys conservés et la proximité de leurs protéines B et C avec BufB et BufC selon des analyses de similarité de séquence (SSN) suggèrent qu'ils subissent probablement des modifications similaires à celles des précurseurs DUF2282.

Mes expériences préliminaires et les prédictions de structure du complexe BufABC laissent penser que la reconnaissance du précurseur par les enzymes de modification impliquerait trois sites : une partie du peptide signal du précurseur, le premier brin β portant la première cystéine et la région centrale portant les Cys à modifier.

Chez *C. vibrioides*, lorsque que le leader peptide putatif est altéré de façon majeure, les modifications ne peuvent pas être installées. D'une manière plus détaillée, le signal peptide semble perméable à certaines modifications d'acides aminés, néanmoins la modification de la

partie N-terminale entrave la reconnaissance. Ainsi, la partie N-terminale du peptide signal est un déterminant qui jouerait un rôle crucial dans la reconnaissance des enzymes de modification. D'après notre prédiction de modèle 3D de l'interaction entre le précurseur BufA et la protéine de fusion BufBC ainsi que les résultats de co-précipitation, le peptide leader serait inclus dans la portion N-terminale du précurseur jusqu'au premier brin β , selon mes premiers résultats de polarisation de fluorescence. Ainsi, BufB et BufC camoufleraient le signal peptide, accordant le temps pour l'installation des modifications post-traductionnelles dans le cytoplasme avant l'exportation médiée par Sec. Cependant, le peptide signal et le premier brin β ne sont pas suffisants pour que le peptide puisse être modifié. Le peptide mature, le dernier déterminant, a un rôle dans la reconnaissance et/ou de la mise en place des modifications. En effet, une chimère entre le core de BufA2 et le signal peptide de BufA1 ne conférait pas de protection contre l'excès de cuivre. Il est possible que le nombre de cystéines et leur espacement jouent un rôle dans l'interaction entre le peptide et les enzymes de modification. Cependant lorsque le phénotype indique que le système est non fonctionnel, il sera important de vérifier si le RiPP non modifié est présent dans les extraits bactériens, au moyen d'un anticorps dirigé contre BufA, qui sera disponible d'ici peu. En effet, pour le moment on ne peut pas distinguer entre des mutations du précurseur qui augmenteraient la tendance à la protéolyse du produit final, et des mutations qui empêcheraient la reconnaissance du précurseur par le complexe BufBC. Nos tentatives de détecter le produit final par spectroscopie de masse n'ont pas nécessairement abouti. La bufferine non modifiée semble nettement plus sensible à la dégradation.

Concernant la biogénèse, il est important de noter que les résultats *in vivo* obtenus au laboratoire et les résultats obtenus par nos collaborateurs au MNHN dans un système d'expression hétérologue chez *E. coli* ne sont pas tout à fait en accord. Les résultats du MNHN ont montré que BufA1 pouvait être modifié en l'absence de signal peptide jusqu'au premier brin β , contrairement aux résultats chez *C. vibrioides* où le signal peptide est nécessaire. Cependant, alors que les résultats obtenus en système naturel chez *C. vibrioides* ont été obtenus dans un contexte cellulaire qui peut être limitant, notamment par l'exportation médiée par Sec, les résultats chez *E. coli* ont été obtenus dans un contexte de surexpression non limité par le temps de contact. En effet, il n'y a pas d'exportation du RiPP dans ce système, puisqu'il est en position C-terminale d'une fusion avec la protéine SUMO. Alors que l'approche hétérologue permettra de réaliser de la bioingénierie en vue d'obtenir des bufferines modifiées, pour comprendre la biogénèse des bufferines, il est important de travailler chez l'hôte naturel où existe une compétition entre les modifications post-traductionnelles catalysées par BufBC et l'exportation médiée par le système Sec. Une investigation plus poussée permettra de

déterminer les sites d'interaction en détail, du peptide précurseur mais aussi ceux des protéines BufB et BufC, ainsi que les acides aminés nécessaires pour l'activité catalytique.

La plasticité de la biogénèse des RiPPs est étudiée depuis les années 2000 dans un contexte d'effort d'ingénierie. En effet, les mutations ponctuelles et multiples des précurseurs et de leur peptide leader ont permis d'évaluer la tolérance des enzymes biosynthétiques au précurseur et ainsi de comprendre la biosynthèse des RiPPs. La production de nouveaux RiPPs hybrides par réaction *in vitro* ou en systèmes hétérologues est couramment utilisée car elle permet d'augmenter les temps de réaction et les ratios enzyme/peptide artificiellement, permettant de « forcer » des modifications post-traductionnelles sur des peptides qui sont faiblement homologues aux précurseurs naturels. Ainsi, la combinaison de fragments provenant de différents RiPPs et la sélection d'enzymes de modifications post-traductionnelles ont permis d'obtenir de nouveaux peptides et de nouvelles fonctions. L'étude de la biogénèse des bufferines permettra d'étoffer les connaissances sur la biogénèse des RiPPs et en particulier les RiPPs présentant des peptides signaux, et d'ajouter des paramètres à la conception de nouveaux peptides hybrides (6).

Chez *C. vibrioides* et *B. pertussis*, l'opéron bufferine du sous-groupe DUF2282 présente un quatrième gène codant pour une protéine de la membrane interne de la famille DoxX. Dans la rare littérature sur le sujet, DoxX est une protéine de la membranaire cytoplasmique qui aurait une fonction rédox impliquant des quinones, liée au métabolisme du soufre ou à l'homéostasie des thiols (81,82). Les études préliminaires sur le mutant de délétion de *doxX* par HPLC-MS n'ont pas permis d'identifier sa fonction dans cet opéron, puisque la bufferine reste modifiée et le système reste fonctionnel. Plusieurs hypothèses restent donc valides. Des analyses *in silico* effectuées au laboratoire montrent que les gènes *doxX* sont systématiquement présents dans les opérons hébergeant un gène de précurseur RiPP de la famille DUF2282. Une première hypothèse est que DoxX contribuerait à restaurer l'homéostasie des thiols dans le cytoplasme pour atténuer le stress causé par le Cu ou l'HOCl, en parallèle avec le RiPP dans le périplasme. Une deuxième hypothèse est qu'il permettrait de garder les bufferines sous une forme compétente, en réduisant le pont disulfure formé entre les deux groupes thiooxazoles. DoxX pourrait aussi simplement réduire le cuivre présent dans les bufferines. Une étude des potentielles protéines partenaires de DoxX pourrait aider à clarifier son rôle dans les opérons de bufferine.

De nombreuses questions perdurent sur les bufferines de *C. vibrioides* et de *B. pertussis* et celles-ci continueront d'être étudiées au laboratoire. Les travaux que j'ai menés pendant ma

thèse auront permis de caractériser à la fois une stratégie bactérienne complémentaire d'adaptation au cuivre, et une nouvelle famille de RiPP dérivée des opérons GIG. Ce nouveau mécanisme d'homéostasie du cuivre que nous avons identifié expérimentalement reste à être généralisé aux nombreuses autres bufferines des sous-familles DUF2282, RiPP_6/12 Cys et RiPP_EGKC. L'état des lieux de nos connaissances sur les bufferines chez *C. vibrioides* et *B. pertussis* à partir de l'ensemble des travaux menés au laboratoire, ainsi que nos hypothèses, sont résumés dans un modèle dans la Figure 86.

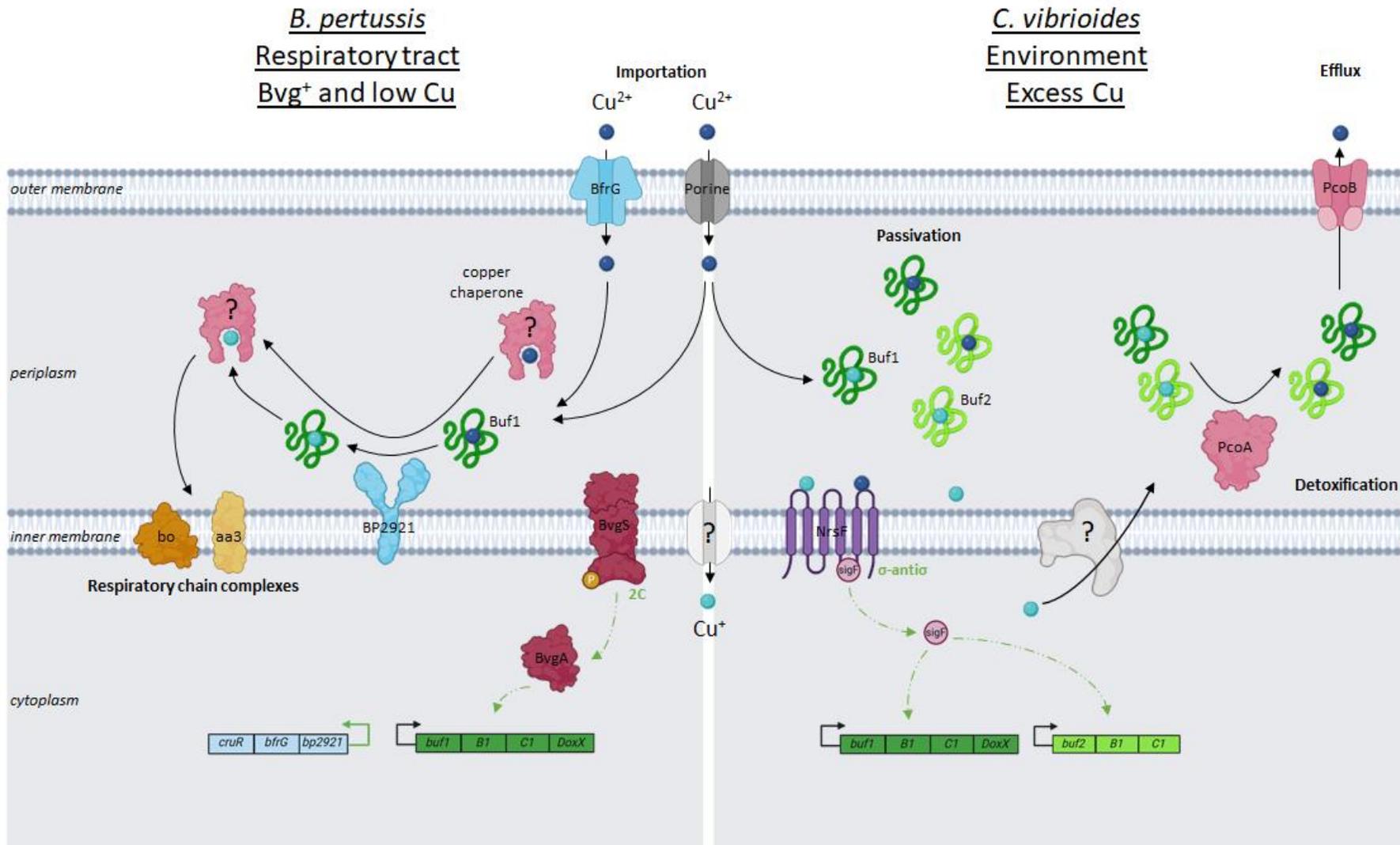


Figure 86. Modèle actuel de l'état des lieux de nos connaissances et de nos hypothèses sur les bufferines chez *C. vibrioides* et *B. pertussis*. Le cuivre sous forme $Cu(II)$ est représenté en bleu foncé, et sous forme $Cu(I)$ en bleu clair.

Matériels et Méthodes

Souches, plasmides, milieux et conditions de culture

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont décrits dans les tableaux 9 à 11 en Annexes.

C. crescentus NA1000. *C. crescentus* NA1000 a été cultivé à 30 °C dans un milieu riche complexe (PYE) ou un milieu pauvre défini (M2G) avec de l'acide nalidixique (30 µg/ml en milieu liquide et en PYE agar). Si nécessaire, le PYE a été complété avec de la kanamycine (5 µg/ml en milieu liquide et 20 µg/ml en PYE agar) ou de la gentamycine (0,5 µg/ml en milieu liquide et 5 µg/ml en PYE agar). Les plasmides ont été construits dans la souche *Escherichia coli* DH5α et mobilisés à partir de la souche *E. coli* S17 dans *C. crescentus* par conjugaison. Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37 °C dans du milieu LB.

B. pertussis BPSM. *B. pertussis* BPSM (souche sauvage) a été cultivé à 37 °C dans un milieu riche complexe (Stainer Scholte, SS), dans un milieu pauvre défini (THIJS) ou dans un milieu défini contenant des métaux (Milnez), avec de la streptomycine à 100 µg/ml. Si nécessaire, le milieu SS a été complété avec de la gentamycine à 10 µg/ml. Les plasmides ont été construits dans la souche *Escherichia coli* DH5α et mobilisés à partir de la souche *E. coli* SM10 dans *B. pertussis* par conjugaison.

Construction de mutants de *C. crescentus* NA1000

Construction de mutants de délétion des opérons RiPPs. Des souches contenant des délétions complètes des *buf1* et *buf2* ont été obtenues par échange allélique. Une souche double mutante pour les deux opérons (DKO) et deux souches mutantes simples pour *buf1* (*buf2*) et pour *buf2* (*buf1*) ont été construites. Dans les contextes génomiques d'un seul opéron restant, d'autres délétions ont été introduites de façon similaire. De façon générale, les deux fragments encadrant les régions à déléter ont été amplifiés par PCR et sous-clonés ensemble dans pNPTS138. La construction résultante a été transférée à *C. crescentus* par conjugaison, et l'échange allélique a été effectué par deux événements de recombinaison homologue avec d'abord une sélection sur antibiotique (intégration du plasmide) puis sur sucrose (éjection du plasmide). Les souches mutantes ont été vérifiées par PCR.

Construction de mutants par échange allélique. Pour réintroduire des versions des différents gènes des opérons modifiées (mutées ou portant des étiquettes), les deux fragments flanquant la région délétée ont été amplifiés par PCR. Différentes versions des gènes des opérons ont été générées grâce à des gènes synthétiques ou par mutagenèse dirigée. Les fragments flanquants et les séquences d'intérêt ont été sous-clonés dans pNPTS138 et introduits dans *C. crescentus* comme décrit précédemment.

Construction de fusions transcriptionnelles et surexpression de sigF. Un vecteur suicide pFUS2 (116) a été utilisé pour générer des fusions transcriptionnelles afin de placer le gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle des promoteurs de *buf1* et *buf2* par recombinaison homologue. Des fusions avec le dernier gène de chaque opéron, *bufD1-lacZ* et *bufC2-lacZ* ont aussi été construites dans des souches présentant ou non le précurseur en amont, et utilisées dans le cadre de l'étude sur la polarité des opérons.

Pour surexprimer *sigF* (CCNA_03362) chez *C. crescentus* (88), un fragment correspondant à la région codante du gène a été amplifié par PCR et introduite sous le contrôle du promoteur Plac du plasmide réplicatif pSRKKm par ligation. La construction a été introduite dans *C. crescentus* NA1000 par conjugaison et la présence du plasmide sélectionnée par l'ajout de kanamycine.

Construction de mutants de *B. pertussis* BPSM

Le vecteur suicide pFUS2 a été utilisé pour générer une inactivation du gène *copZ* par recombinaison homologue. Les souches BPSM, Δ BP2924 et BP24_{STOP} portant *copZ* inactivé ont été construites et utilisées dans des tests phénotypiques.

Mesure d'activité de la β -galactosidase chez *C. crescentus*

Des tests d'activité β -galactosidase ont été réalisés avec les mutants portant une fusion transcriptionnelle chromosomique avec le gène *lacZ*. Des cultures bactériennes en phase stationnaire de *C. crescentus* ont été diluées dans du milieu PYE ou du milieu M2G à une DO finale à 660 nm (DO₆₆₀) de 0.1-0.2 et cultivées jusqu'en phase exponentielle ou jusqu'en phase stationnaire avec différents stress ou inducteurs. Différents ions métalliques (Cu, Fe, Zn et Mn), différentes molécules générant du stress oxydant (acide hypochloreux HOCl, xanthine oxydase/hypoxanthine, diamide et peroxyde d'hydrogène H₂O₂), différentes concentrations de Cu ou différentes concentrations d'IPTG (pour les souches avec σ F) ont été testés. Pour tester

l'effet du Cu^+ , 200 μM d'acide ascorbique (réducteur du Cu^{2+}) ont été ajoutés à des cultures contenant CuSO_4 . L'hypoxanthine a directement été ajoutée dans le milieu de culture à une concentration de 500 μM , permettant de former de O_2^- et de H_2O_2 en présence de xanthine oxydase. Des cultures sans stress appliqué ont été utilisées comme contrôles dans toutes les expériences. La densité bactérienne a été estimée par des mesures de densité optique à 600 nm (DO_{600}). Les cultures ont été centrifugées et les culots ont été mis en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate pour obtenir une $\text{DO}_{600} = 10$. Les bactéries ont été soumises à une lyse rapide dans des tubes Lysing Matrix B (force 5, 30 sec, 2 fois). Les activités β -gal ont été déterminées par mesure de la DO initiale à 420 nm (DO_{420}) sur 1 min et calculées selon la formule : $(\text{DO}_{420} * 1000) / (\text{DO}_{600} * \text{volume de lysat cellulaire dans le mélange réactionnel})$.

Enregistrement de courbes de croissance

C. crescentus NA1000. Des cultures de *C. crescentus* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE (ou dans le cas de la recherche de chalcophore, dans du milieu surnageant:PYE (50:50) à $\text{DO}_{600} = 0,05$ et inoculées dans des plaques à 96 puits. Les cultures ont été incubées sous agitation continue à 30 ° C dans un lecteur de plaques TECAN Spark, la DO_{660} étant mesurée toutes les 20 minutes pendant 28 h. Différents stress ont été appliqués.

B. pertussis BPSM. Des cultures de *B. pertussis* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu SS, THIJS ou Milnez à $\text{DO}_{660} = 0,1$ et inoculées dans des plaques à 96 puits. Les cultures ont été incubées sous agitation continue à 37 ° C dans un lecteur de plaques TECAN Spark, la DO_{660} étant mesurée toutes les 30 minutes pendant 72 h en SS ou toutes les 30 minutes pendant 28 heures en THIJS. Différentes concentrations de CuSO_4 , réduit ou non avec 1 mM d'acide ascorbique, ont été ajoutés comme indiqué.

Test de survie aux stress cuivrique et oxydant

C. crescentus NA1000. Des cultures de *C. crescentus* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à $\text{DO}_{660} = 0,1$ et incubées pendant 6 h, 15 h ou 24 h. La survie de *C. crescentus* a été évaluée après avoir soumis les bactéries à 1 mM CuSO_4 pendant 30 min, soit en phase exponentielle (6 h de culture) soit en début de phase stationnaire (cultures de 15 h). La survie des bactéries en fin de phase stationnaire (cultures de 24 h a été déterminée toutes les dix minutes pendant une heure d'exposition à 1 mM de CuSO_4 . Les bactéries ont été récupérées, diluées de façon sérielle et étalées sur PYE solide pour être

dénombrées. La survie de *C. crescentus* a été évaluée après exposition à différents stress oxydants. La survie de cultures en début de phase stationnaire (cultures de 15 h) a été mesurée après 30 minutes, 1 h et 1 h30 d'exposition à 50 mM de H₂O₂. La survie de cultures en phase stationnaire de 15 h a été mesurée après différents temps d'exposition à différentes concentrations de xanthine oxydase ou d'HOCl. Les bactéries ont été récupérées, diluées de façon sérielle et déposées sous forme de gouttes sur des boîtes PYE agar.

***B. pertussis* BPSM.** Des cultures de *B. pertussis* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu SS à DO₆₆₀ = de 0,1 et incubées pendant 15 h sous forte agitation. La survie de *B. pertussis* a été évaluée après un choc cuivrique (3 mM CuSO₄) de 2 h ou après un choc HOCl (10 à 200 µM) de 30 minutes ou 2 h. Les bactéries ont été récupérées, diluées de façon sérielle et déposées sous forme de gouttes sur des boîtes BG + sang solide pour être dénombrées.

Afin de prévenir d'un milieu SS trop protecteur vis à vis des stress, des chocs ont été effectués en tampon phosphate salin (PBS). Les bactéries provenant d'une boîte BG + sans solide ont été diluées dans du PBS afin d'obtenir 50 000 bactéries par mL. La survie a été évaluée après un choc O₂⁻/H₂O₂ de 1 h à différentes concentrations (0.01 à 0.05 U/mL de xanthine oxydase, avec de la xanthine à 0.5 mM) ou à un choc HOCl (1 à 250 µM) de 30 minutes.

Test d'inhibition par l'HOCl

Des cultures de *C. crescentus* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à une DO₆₆₀ = 0.1, cultivées jusqu'à obtenir DO₆₆₀ = 0.5 et étalés sur PYE solide. 25 µL de différentes concentrations de HOCl ont été déposées sur un disque au centre des boîtes. Les bactéries ont été incubées à 30°C pendant 2 jours et le diamètre des halos a été mesuré.

Test de quantification des ROS intracellulaires

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par le stress cuivrique a été quantifiée dans un premier temps par le réactif 2-7-dichlorofluoresceine diacétate. Les cultures bactériennes en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE ou du milieu M2G à DO₆₆₀ = 0,1 et cultivées jusqu'à DO₆₆₀ = 0.5 ou 1. Différentes concentrations de DCFH-DA ont été ajoutées pendant 30 minutes au milieu de culture. Les bactéries ont ensuite été lavées et resuspendues dans du PYE, du M2G ou 200 mM de tampon phosphate (pH 7.5), et exposées à différentes concentrations de Cu. Les bactéries ont été transférées dans une plaque à 96

puits à fond noir et la fluorescence a été mesurée à 485/530 nm avec un lecteur de plaque TECAN Spark.

La production de ROS générées lors du stress en phase stationnaire a été quantifiée par le réactif CellROX Deep Red. Les cultures bactériennes en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à $DO_{660} = 0,1$ et incubées pendant 24 h. 5 μM du réactif CellROX Deep Red (ThermoFisher) ont été ajoutés aux cultures pendant 30 min à 30°C sous agitation modérée, et les bactéries ont ensuite été lavées trois fois avec 200 mM de tampon phosphate (pH 7.5). Les bactéries ont été transférées dans une plaque à 96 puits à fond noir et la fluorescence a été mesurée à 640/690 nm avec un lecteur de plaque TECAN Spark.

Test de survie à la phagocytose

Test de survie de *B. pertussis* à la phagocytose par les THP1. Les cellules THP1 ont été cultivées dans du milieu RPMI + SVF 10%. 1.8 millions de cellules ont été déposées dans plaques 6 puits et 50 ng/ml de phorbol 12- myristate 13-acetate (PMA) ont été ajoutés durant 24 heures pour induire la différenciation ainsi que l'adhérence des cellules. Avant infection par *B. pertussis*, les cellules THP1 différenciées en macrophages ont été lavées 2 fois avec du RPMI pour éliminer le PMA. Les macrophages ont été infectés avec une MOI de 50 pendant 30 mn à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois au PBS et du milieu frais contenant de la polymyxine B à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, puis à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ après 1 h, a été ajouté. Aux temps 0, 1, 4 et 24 h, les cellules THP1 ont été lysées avec 0.1% de saponine et les bactéries ont été étalées sur BG sang solide pour être dénombrées.

Test de survie de *C. crescentus* à la phagocytose par les amibes *Acanthamoeba castellanii*. Les cellules d'*Acanthamoeba castellanii* ont été cultivées dans du milieu riche PYG. 1.8 millions d'amibes ont été déposées dans plaques 6 puits dans du milieu pauvre Mowat puis infectées avec une MOI de 100, 250 ou de 500 pendant 30 min, 1 h ou 3 h à 20°C. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois au PBS et du milieu PYG/Mowat (50:50) contenant de la gentamycine à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a été ajouté. Aux temps 0, 1, et 3 h, les amibes ont été lysées avec 0.3 % de triton et les bactéries ont été étalées sur PYE solide pour être dénombrées.

Test de survie de *C. crescentus* à la phagocytose par les amibes *Dictyostelium discoideum*. Les cellules de *D. discoideum* ont été cultivées jusqu'à une confluence de 80 % dans un milieu HL/5 à 20 °C. 1.8 millions d'amibes en milieu pauvre SorC ont été déposées dans des plaques 6 puits puis infectées avec une multiplicité d'infection (MOI) de 100, 250 ou

de 500 pendant 30 min, 1 h ou 3 h à 20°C. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois au PBS et du milieu HL5/SorC (50:50) contenant de la gentamycine à 5 µg/mL a été ajouté. Aux temps 0, 1, et 3h, les amibes ont été lysées avec 0.3% de triton et les bactéries ont été étalées sur PYE solide pour être dénombrées.

Dans un 2^{ème} test, les cellules de *D. discoideum* ont été cultivées jusqu'à une confluence de 80 % dans du milieu HL/5 à 20 °C et diluées pour obtenir 1 million d'amibes/mL. Les cultures exponentielles de *C. crescentus* ont été concentrées à une DO₆₆₀ = 1 et étalées sur PYE solide. Une goutte de 50 µL d'amibes a été déposée au centre des boîtes puis incubée à 20°C pendant trois jours. La densité bactérienne a été quantifiée par ImageJ.

Fractionnement cellulaire

Des cultures de *C. crescentus* WT en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à DO₆₆₀ = 0,1 et incubées avec 100 µM de CuSO₄ pendant 6 h ou 15 h pour induire l'expression des opérons *buf*. Les cellules ont été centrifugées à 6000 g pendant 5 min à 4°C afin de récupérer le surnageant. Les culots ont été resuspendus dans 8.25 mL (pour 25 mL de culture) de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 6.8) et 100 µM d'EDTA (Ice-cold Wash Buffer, ICWB). Après un deuxième lavage au ICWB, les cellules ont été centrifugées et les culots resuspendus dans 5 mL de tampon Tris-HCl 200 mM (pH 6.8). Les culots resuspendus ont ensuite été séparés en fractions de 1 mL, mixés avec 1 mL de Zwittergent 0.25%, incubés 10 mn à température ambiante avec inversion régulière des tubes, puis centrifugés 15 mn à 10 000 g à 4°C. Les surnageant contenant la fraction périplasmique et les membranes externes ont été récupérés. Les culots restants, correspondant aux sphéroplastes, ont été resuspendus dans 3.25 mL de tampon ICWB et les bactéries ont été lysées à l'aide d'une French press. Les cellules ont été centrifugées à 6000 g pendant 5 min à 4°C afin de récupérer le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique + membrane interne.

Après électrophorèse (SDS-PAGE) et transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la protéine cytoplasmique MreB et la protéine périplasmique PcoA ont été détectées par immunoblotting en utilisant des anticorps spécifiques produits chez le lapin à une dilution de 1:1000, suivi d'anticorps anti-lapin-HRP à une dilution de 1:2500. Les blots ont été révélés à l'aide du système de Western Blotting Amersham ECL Prime avec l'Amersham Imager 600 (GE).

Production et détection des peptides signaux de BufA1 et BufA2

Le plasmide pBBR1MCS-5 (117) a été utilisé pour générer des fusions traductionnelles plaçant le gène de la β -lactamase (sans la séquence codant son peptide signal) derrière le peptide signal de BufA1 ou de BufA2. Les fusions SP^{BufA1}-Bla et SP^{BufA2}-Bla ont produites chez *C. crescentus* DKO. Des cultures bactériennes en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à DO₆₆₀ nm = 0,1 et incubées avec 100 μ M de Cu pendant 15h.

Les culots bactériens provenant de ces cultures de 25 ml ont été remis en suspension dans 1 mL de tampon Tris-HCl 50 mM (pH. 7.5) et soumis à une lyse rapide dans des tubes Lysing Matrix B (force 6, 50 sec, 2 cycles). Après une centrifugation de 5 min à 10 000 g et à RT, le surnageant a été ultracentrifugé pendant 1 h à 100 000 g et à 4°C afin de séparer les fractions soluble et insoluble. Après une électrophorèse en SDS-PAGE et un transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la β -lactamase a été détectée par immunoblotting en utilisant un anticorps commercial à une dilution de 1:2500, suivi d'anticorps anti-lapin-HRP à une dilution de 1:6666.

Production et purification de BufA1 et BufA2 recombinantes

Buf1 et Buf2 ont été purifiés chez *C. crescentus* exprimant l'un ou l'autre des deux opérons avec les bufferines avec des étiquettes 6His ou TwinStrep à l'extrémité N-terminale (juste après le signal peptide des précurseurs BufA1 et BufA2) ou à l'extrémité C-terminale.

Vérification de la production de BufA1 et BufA2 recombinantes. Afin de vérifier la production de Buf1^{6His}, ^{6His}Buf1, Buf1^{6His} et ^{6His}Buf1, des cultures de *C. crescentus* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à DO₆₆₀ = 0,1 et incubées avec 100 μ M CuSO₄ pendant 15 h. Les culots bactériens provenant de ces cultures de 25 mL ont été remis en suspension dans 1 mL de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7.5). Les bactéries ont été soumises à une lyse rapide dans des tubes Lysing Matrix B (force 5, 30 sec, 2 fois). Après une centrifugation de 5 min à 10 000 g et à RT, le surnageant a été ultracentrifugé pendant 1 h à 45 000 g à 4°C afin de séparer les fractions soluble et insoluble. Après une électrophorèse en SDS-PAGE et un transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, les bufferines ont été détectées par immunoblotting en utilisant un anticorps anti-His-tag commercial à une dilution de 1 :2500, suivi d'un anticorps anti-souris-HRP à une dilution de 1:10000.

Purification des bufferines recombinante. Afin de purifier Buf1^{6His} et Buf2^{6His}, des cultures bactériennes de *C. crescentus* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à $DO_{660} = 0,1$ et incubées avec 100 μM de Cu ou d'IPTG (pour les souches exprimant σF sous contrôle d'un promoteur lac) pendant 15 h, ou avec 300 μM d'HOCl pendant 3 h. Afin de purifier Buf1^{Twstr}, Buf1^{Twstr(CIIS+CIIS)} et Buf2^{Twstr}, des cultures de *C. crescentus* (avec σF) en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à $DO_{660} = 0,1$ et incubées avec 100 μM d'IPTG pendant 15 h.

Les cellules ont été centrifugées à 6000 g. Pour les bufferines avec un tag 6His, les bactéries ont été remises en suspension dans 200 mM tampon phosphate (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 μM de DNase et un inhibiteur de protéase alors que pour les bufferines avec un tag twin strep, les bactéries ont été remises en suspension dans 100 mM Tris HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 10 μM de DNase et un inhibiteur de protéase. Dans les deux cas, les bactéries ont été lysées à l'aide d'une presse de French. Après une centrifugation de 20 min à 10 000 g et à 4 °C, le surnageant a été filtré, chargé sur une colonne de chromatographie HisPur™ Ni-NTA de 1 mL (ThermoFisher, pour les bufferines His taggées) ou sur une colonne de chromatographie StrepTrap XT de 1 mL (Cytiva), et après lavage dans les tampons de lyse respectifs, les protéines ont été éluées avec 400 mM d'imidazole ou avec 2.5 mM desthiobiotine dans ces mêmes tampons.

Les fractions de purification ont été analysées par coloration au bleu de Coomassie et les fractions contenant la protéine ont été concentrées à l'aide de colonne d'ultrafiltration Amicon 3 kDa et dialysées dans 25 mM Hepes (pH 8), 150 mM NaCl.

Pour les bufferines purifiées de cultures induites par le Cu ou l'HOCl, les fractions ont été analysées par immunoblotting α -His comme décrit au-dessus et par coloration au bleu de Coomassie colloïdal en vue d'analyser les bandes en spectrométrie de masse (Jean-Michel Saliou, CIIL).

Analyses de peptides par spectrométrie de masse (MS)

En collaboration avec le Dr Séverine Zirah, les peptides purifiés et les extraits cellulaires solubles ont été analysés par LC-MS directement (conditions natives) ou après réduction-alkylation et digestion à la chymotrypsine, la trypsine ou à l'élastase.

Traitement des peptides purifiés. Les fractions de purification après production par l'IPTG ont été amenées au MNHN en vue de les analyser en Chromatographie Liquide couplé à la Spectrométrie de Masse (LCMS), en collaboration avec Séverine Zirah. Le tampon des

différentes fractions de purification, contenant de l'imidazole, a été remplacé par 200 mM de Tris HCl (pH 8.6) à l'aide d'une colonne d'ultrafiltration Amicon 3 kDa avec une centrifugation de 20 minutes à 14 000 g et à 4°C. Les fractions ont été divisées en deux : une partie a été laissée intacte pour l'analyse en LC-MS en conditions natives et une partie a été réduite et alkylée.

Traitement d'extraits cellulaires solubles. Des cultures de *C. crescentus* DKO, buf1 et buf2 en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à $DO_{660} = 0,1$ et incubées avec 100 μ M d'IPTG pendant 15 h. Les culots bactériens provenant de ces cultures de 25 mL ont été remis en suspension dans 1 mL de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7.5). Les bactéries ont été soumises à une lyse rapide dans des tubes Lysing Matrix B (force 5, 30 sec, 2 fois). Après une centrifugation de 5 min à 10 000 g et à RT, les lysats ont été soumis à une extraction en phase solide (SPE) sur des cartouches Sep-Pak tC2 Plus Light (Waters) conditionnées avec 5 ml de méthanol et 5 ml d'acide formique (FA) à 0,01 %. Les cartouches ont été lavées avec 5 ml d'acide formique à 0,01 % et éluées avec 2 ml de méthanol. Les fractions éluées ont été divisées en deux, évaporées sous vide et dissoutes : les culots destinés à l'analyse en LC-MS en conditions natives ont été repris dans 50 μ L d'acétonitrile 30%, et les culots destinés à la réduction/alkylation ont été repris dans 200 μ L de Tris HCl (pH 8.6).

Analyses de peptides par MS. Les peptides purifiés et les extraits cellulaires solubles ont soit été laissés intacts (comme décrit ci-dessus) soit été traités avec 30 mM de dithiothréitol (DTT) et alkylés avec 60 mM de 2-bromoéthylamine pendant 1 h à 950 rpm, à 55°C et dans l'obscurité. Les échantillons correspondant aux extraits cellulaires ont été acidifiés à pH 6 avec 3 M HCl. Les différents tampons ont été remplacés par 50 mM de NH_4HCO_3 (pH 8) Les échantillons alkylés ont été divisés en deux : une partie a été laissée intacte pour l'analyse en LC-MS et une partie a été traitée avec 10 μ g/ μ L de trypsine, 40 μ g/ μ L de chymotrypsine ou 40 μ g/ μ L d'élatase (Gold, Promega) pendant une nuit à 37°C. Les digestions ont été arrêtées à l'aide de 2 μ L d'acide formique 10%.

Les échantillons ont été analysés par chromatographie liquide ultra-haute performance-MS sur un système Ultimate 3000-RSLC (Thermo Scientific) connecté à un instrument d'ionisation par électrospray et temps de vol quadripolaire (Maxis II ETD, Bruker Daltonics). Pour les échantillons intacts et les échantillons réduits/alkylés, la séparation a été réalisée à l'aide d'une colonne Aeris widepore C4 (3,6 μ m, 200 Å, 2,1 \times 100 mm, Phenomenex), et à l'aide d'une colonne RSLC Polar Advantage II Acclaim (2,2 μ m, 120 Å, 2. 1 \times 100 mm, Thermo Scientific) pour les échantillons digérés, avec un gradient linéaire (2-80 % en 15 min) des phases mobiles

A (FA 0,1 %) et B (acétonitrile (ACN) de qualité LC-MS + FA 0,08 %), à 300 µL/min. L'identification des peptides a été réalisée à l'aide de PEAKS Studio X Pro (Bioinformatics Solutions Inc.) sur la base de données UniProtKB de *C. crescentus*.

Etudes par spectrophotométrie

Etude des modifications de Buf1 par spectrophotométrie. L'étude des modifications a été faite en utilisant les protéines recombinantes Buf1^{6His}, Buf2^{6His} Buf1^{Twstr} et Buf1^{Twstr(CIIS+CIIS)}. A l'aide d'un spectrophotomètre UVICON et à concentrations équivalentes, les spectres UV-visible de 250 à 360 nm de protéines Buf1^{6His} et Buf2^{6His} ont été comparés, ainsi que les spectres UV-visible de 250 à 360 nm des protéines Buf1^{Twstr} et Buf1^{Twstr(CIIS+CIIS)}.

Etude de la fixation du cuivre par spectrophotométrie. La liaison de Cu(I) ou de Cu(II) à la bufferine 1 a été déterminée en utilisant la protéine recombinante Buf1^{Twstr} et des solutions de Cu générées à partir de CuSO₄.

La formation de complexe de Buf1-Cu(I) a été déterminée par des essais de compétition avec le ligand concurrent 2,2-bicinchoninic acid (BCA) (complexe (BCA)₂-(Cu)₁; K_A 10^{17,7} M⁻², ε_{562 nm} 7 900 M⁻¹ cm⁻¹). 20 µM Cu(I), 100 µM BCA dans un tampon 25 mM HEPES, pH 8, 150 mM NaCl et 10 mM acide ascorbique ont été titrés avec 2 à 30 µM de Buf1^{Twstr} et incubés de 1 à 6 h à température ambiante.

La formation de complexe de Buf1-Cu(II) a été déterminée par des essais de compétition avec le ligand concurrent 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) (rapport 1:1), K_A 10^{14,6} M⁻², ε_{505 nm} 41 500 M⁻¹ cm⁻¹. 8 µM Cu(II), 10 µM PAR dans un tampon 20 mM HEPES, pH 8 et 150 mM NaCl ont été titrés avec 5 à 40 µM de Buf1^{Twstr} et incubés de 1 à 6 h à température ambiante.

Les spectres d'absorption de 400 à 600 nm ont été enregistrés pour les deux complexes, Buf1-Cu(I) et Buf1-Cu(II), et les constantes de dissociation K_D ont été calculés en ajustant la courbe des données expérimentales à l'équilibre dans les équations 1 et 2 (109).

$$\text{Equation 1 (Cu(I))}: K_D \beta_2' = \frac{\left(\frac{[P]_{total}}{[MP]}\right) - 1}{\left\{\left(\frac{[L]_{total}}{[ML_2]}\right) - 2\right\}^2 [ML_2]}$$

$$\text{Equation 2 (Cu(II)) : } K_D K'_A = \frac{\left(\frac{[P]_{total}}{[MP]}\right) - 1}{\left(\frac{[L]_{total}}{[ML]}\right) - 1}$$

[P] : concentration de bufferine (μM), [MP] : concentration des complexes Buf1-Cu (μM), [L] : concentration de BCA ou de PAR (μM) et [ML] : concentration des complexes BCA-Cu ou PAR-Cu (μM)

Etude de la stabilité du Cu^+ dans des cultures par spectrophotométrie. La concentration du Cu^+ a été déterminée par des essais colorimétriques avec le ligand BCA. Des cultures de *C. crescentus* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à $\text{DO}_{660} = 0,2$ et cultivées pendant 8 h avec différentes concentrations de CuSO_4 et $200 \mu\text{M}$ d'acide ascorbique. Pour chaque point, les cellules ont été centrifugées à $10\,000 \text{ g}$ pendant 5 min à 4°C afin de récupérer le surnageant. Le surnageant a ensuite été filtré et incubé pendant 1 h avec $200 \mu\text{M}$ BCA, l'absorbance à 562 nm , correspondant à l'absorbance maximale du complexe Cu^+ -BCA, a été mesurée, et les concentrations ont été calculées.

Test de détection des chalcophores

Le test de détection des chalcophores se base sur la formation d'un complexe entre le chromazurol S et le Cu. Une solution du complexe ($0,5 \text{ mM}$ de CuCl_2 , $0,525 \text{ mM}$ de Chromazurol S, $1,05 \text{ mM}$ d'HDTMA) a été diluée 10 fois dans de l'agarose à 14 g/l en surfusion. Pour détecter les chalcophores dans le surnageant et les extraits cellulaires solubles, des boîtes de pétri entières CAS-Cu ont été préparées tandis que pour détecter les chalcophores sur cellules entières, des demi-boîtes de pétri ont été successivement coulées contenant une moitié d'agarose+ PYE et l'autre d'agarose + CAS-Cu.

Pour détecter les chalcophores sur cellules entières ou dans le surnageant, des cultures de *C. crescentus* en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu PYE à $\text{DO}_{660} = 0,2$ et incubées pendant 2 h. Les cultures ont ensuite été induites ou non avec $100 \mu\text{M}$ de Cu ou $300 \mu\text{M}$ d' HOCl pendant 3 h et centrifugées à 6000 g . Les bactéries ont été remises en suspension dans du PYE pour obtenir une $\text{DO}_{660} = 1$, $100 \mu\text{L}$ ont étéensemencés sur la partie PYE des boîtes PYE:CAS-Cu, et les boîtes ont été incubées à 30°C et photographiées après 1, 3 ou 7 jours. Quant au surnageant, il a été filtré et déposé dans les puits des boîtes CAS-Cu. Les boîtes ont été incubées à RT et photographiées 1 h après.

Pour détecter les chalcophores sur les extraits cellulaires solubles, des cultures en phase stationnaire de *C. crescentus* avec pσF ont été diluées dans du milieu PYE à DO₆₆₀ = 0,05 et incubées avec 100 μM d'IPTG pendant 15h. Les cellules ont été centrifugées à 10 000 g, remises en suspension dans 50 mM Tris HCl pH=7, 150 mM NaCl, et soumises à une lyse rapide dans des tubes Lysing Matrix B (force 5, 30 sec, 2 fois). Les protéines ont été fractionnées ou non à l'aide de colonne d'ultrafiltration Amicon 30 kDa, et déposées dans les puits des boîtes CAS-Cu. Les boîtes ont été incubées à RT et photographiées 1 h après.

Expression, purification et production d'anticorps α-BufC1

BufC1 a été purifié avec un tag 6His à l'extrémité N-terminale chez *E. coli* BL21 portant un plasmide recombinant pACYC-DUET (construit par S. Jünger, MNHN). Des cultures en phase stationnaire ont été diluées à DO = 0.05 dans 1 L de milieu Overnight Express™ Instant TB Medium (Novagen) contenant 10 μg/mL de chloramphénicol. Les bactéries ont été cultivées à 37 °C pendant 4 h dans un incubateur sous agitation avant d'être mises à 18°C pour la nuit. Les cellules ont été centrifugées à 10 000 g, remises en suspension dans Tris 20 mM (pH 7.6), 300 mM NaCl, 10 mM imidazole et 10 % de glycérol (tampon de lyse), 10 μM de DNase et un inhibiteur de protéase, et lysées à l'aide d'une French press. Après une centrifugation de 20 min à 10 000 g et à 4 °C, le surnageant a été filtré, chargé sur une colonne de chromatographie HisPur™ Ni-NTA de 1 mL (ThermoFisher) et les protéines ont été éluées avec 250 à 400 mM d'imidazole dans le tampon de lyse. L'anticorps α-BufC1 a été préparé chez Eurogentec (Seraing, Belgique) chez un cochon d'inde, avec environ 60 μg de protéine BufC1 recombinante dans chaque injection. L'anticorps α-BufC1 a été utilisé pour les expériences d'immunoblot à une dilution de 1:1000.

Vérification de la production de BufC1. Afin de vérifier la production de BufC1, les extraits cellulaires ont été préparés comme décrit plus haut. Après une électrophorèse en SDS-PAGE et un transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la protéine C1 a été détectée par immunoblotting en utilisant l'anticorps produit chez le cochon d'inde à une dilution de 1:1000, suivi d'anticorps anti-cochon d'inde-HRP à une dilution de 1:10000.

Co-précipitation

Expression et purification des protéines recombinantes. Plusieurs protéines recombinantes ont été construites, produites chez *E. coli* BL21 et purifiées :

Tableau 8. Liste des protéines recombinantes utilisées

Protéines recombinantes	Plasmide	Milieu de production	Résine de purification
Précurseur A1			
His-SUMO-BufA1	pET-SUMO (Kanamycine)	Overnight Express™ Instant TB Medium	Colonne Nickel
His-SUMO-BufA2	pET-SUMO (Kanamycine)	Overnight Express™ Instant TB Medium	Colonne Nickel
MBP-BufA1	pMAL (Ampiciline)	Terrific Growth	Non purifié
MBP-BufA1^{mid}	pMAL (Ampiciline)	Terrific Growth	Non purifié
MBP-BufA1^{short}	pMAL (Ampiciline)	Terrific Growth	Non purifié
Protéine C1			
GB1-BufC1	pGEV (Ampiciline)	Terrific Growth	IgG sepharose
GB1-RRE1	pGEV (Ampiciline)	Terrific Growth	Non purifié
GB1-BufC2	pGEV (Ampiciline)	Terrific Growth	Non purifié
MBP-BufC1	pMAL (Ampiciline)	Terrific Growth	Non purifié
MBP-RRE1	pGEV (Ampiciline)	Terrific Growth	Non purifié
His-C1	pACYC (Chloramphénicol) (MNHN)	Overnight Express™ Instant TB Medium	Non purifié
S-B1C1	pET-Duet (Ampiciline)	Terrific Growth	Non purifié

Les cultures en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu Overnight Express™ Instant TB Medium (Novagen) ou dans du milieu Terrific Growth contenant l'antibiotique correspondant. Pour le milieu Overnight Express™ Instant TB Medium, les bactéries ont été cultivées à 37 °C pendant 4h dans un incubateur sous agitation avant d'être mises à 18°C pour la nuit. Pour le milieu Terrific Growth, les bactéries ont été cultivées à 37 °C jusqu'à $DO_{600} = 0.06$ dans un incubateur sous agitation, mises sur glace pendant 30 minutes et induites avec 100 μ M d'IPTG avant d'être cultivées à 18°C pour la nuit.

Afin de récupérer les extraits totaux, les culots bactériens provenant de cultures de 25 mL ont été remis en suspension dans 1 mL de tampon Tris-HCl 20 mM (pH7), NaCl 100 mM. Les bactéries ont été soumises à une lyse rapide comme ci-dessus. Après une centrifugation de 5 min à 10 000 g et à RT, le surnageant a été ultracentrifugé pendant 1 h à 45 000 rpm et à 4°C afin de récupérer la fraction soluble.

Afin de purifier la protéine recombinante His-SUMO-BufA1, le culot de cellules a été resuspendu dans du Tris 20 mM (pH 7.6), 300 mM NaCl et 10 % de glycérol, 10 μ M de DNase et un inhibiteur de protéase (tampon de lyse), et les bactéries ont été lysées à l'aide d'une

presse de French. Après une centrifugation de 20 min à 10 000 g et à 4 °C, le surnageant clarifié a été chargé sur une colonne de chromatographie HisPur™ Ni-NTA de 1 mL (ThermoFisher) et la protéine d'intérêt a été éluée avec 250 mM d'imidazole et 1 mM de TCEP dans le même tampon. Les fractions contenant la protéine ont été concentrées à l'aide de colonne d'ultrafiltration Amicon 30 kDa et dialysées dans 20 mM Tris-HCl et 100 mM NaCl.

Afin de purifier la protéine GB1-BufC1, le culot de cellules a été resuspendu dans Tris 50 mM pH 7.6, 150 mM NaCl et 0.05% TWEEN20, 10 µM de DNase et un inhibiteur de protéase (tampon de lyse). Après lyse des bactéries à la presse de French, le surnageant clarifié a été chargé sur une colonne de chromatographie IgG Sepharose™ 6 Fast Flow (Sigma), la colonne a été lavée avec 5 mM d'acétate d'ammonium (pH 5.0) et la protéine d'intérêt a été éluée par de l'acide acétique à 500 mM. Les fractions contenant la protéine sur un filtre Amicon 30 kDa et dialysées contre 20 mM Tris-HCl et 100 mM NaCl.

Tests d'interaction par co-précipitation. Les protéines, en extraits totaux ou purifiées, ont été mises en contact à différentes concentrations ou ratios dans un volume réactionnel de 500 µL de tampon (20 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM NaCl) pendant 30 minutes à RT avec agitation. Les différentes résines, HisPur™ Ni-NTA pour précipiter le His-tag, SP Sepharose pour le domaine GB1 ou Amylose pour le domaine MBP, ont été lavées trois fois dans le même tampon. 25 µL de résine ont été ajoutés aux mélanges pendant 30 minutes à RT avec agitation. Les protéines non accrochées ont été éliminées avec trois lavages successifs avec le tampon, et les protéines accrochées aux résines ont été éluées en chauffant à 95°C dans du tampon de charge pour électrophorèse en conditions dénaturantes. Après électrophorèse et transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, les différentes protéines à révéler ont été détectées par immunoblotting comme décrit ci-dessus pour les protéines His-tagées. Les protéines avec un domaine GB1 ont été détectées en utilisant des IgG humaines à une dilution de 1:2500, suivi d'anticorps anti-humain-HRP à une dilution de 1:2500. Les protéines avec un domaine MBP ont été détectées en utilisant un anticorps commercial spécifique (dilution 1:2500), suivi d'anticorps anti-lapin-HRP à une dilution de 1:10000. Enfin, les protéines S-tagées ont été détectées en utilisant un anticorps anti-S-tag-HRP produit chez le lapin à une dilution de 1:10000.

Polarisation de fluorescence

Expression et purification des protéines recombinantes. Les trois protéines recombinantes BufB1, BufC1 et BufB1-C1 ont été produites dans *E. coli* BL21 avec des plasmides pET et purifiées grâce à des tags 6His à l'extrémité N-terminale (pour B1 et C1) ou C-terminale (pour la fusion B1-C1). Des cultures en phase stationnaire ont été diluées à DO =

0.05 dans du milieu Terrific Broth contenant l'antibiotique correspondant. Les bactéries ont été cultivées à 37 °C jusqu'à $DO_{600} = 0.6$ sous agitation, mises sur glace pendant 30 minutes et 100 μM d'IPTG a été ajouté avant de poursuivre la culture à 18°C pour la nuit. 250 μM de FeNH_4SO_4 ont été rajoutés pour la production de BufB1 et BufB1-C1. Les protéines ont été purifiées comme décrit plus haut.

Peptides utilisés. Plusieurs peptides ont été achetés auprès de GeneCust avec une pureté de 90 % :

Peptides	Séquence
Peptide 1 (tracer)	FITC-linker hexyl-GENDCKAGAGTSCAGTSKVD
Peptide 2	GENDCKAGAGTSCAGTSKVD
Peptide 3 (tracer)	FITC-linker hexyl-GADEHKAGAQTTEKCYGVSK
Peptide 4	GADEHKAGAQTTEKCYGVSK
Peptide 5 (tracer)	FITC-linker hexyl-GMTRTATTAATAGSSGS
Peptide 6	GMTRTATTAATAGSSGS

Tests d'interaction par polarisation de fluorescence. Le peptide tracer (5 nM ou 2.5 nM) a été incubé avec différentes concentrations de BufB1, BufC1 ou de BufB1C1 pendant 30 minutes dans un tampon contenant 50 mM Hepes pH7.5, 300 mM NaCl et 2.5% de glycérol dans une plaque à 96 demi-puits à fond noir (58). La liaison a été déterminée par le changement de polarisation du tracer mesurée sur un lecteur Mithras BERTHOLD LB940 en utilisant le filtre de polarisation de la fluorescéine. Les constantes de dissociation K_D pour la liaison des différents tracers à B1, C1 et B1C1 peuvent être obtenues en ajustant la courbe des données expérimentales à l'équilibre, selon Dunbar et al. (2015) (118).

Références

1. Luo S, Dong SH. Recent Advances in the Discovery and Biosynthetic Study of Eukaryotic RiPP Natural Products. *Molecules* [Internet]. 2019;24(8):1–15. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/8/1541>
2. Burkhart BJ, Hudson GA, Dunbar KL, Mitchell DA. A prevalent peptide-binding domain guides ribosomal natural product biosynthesis. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2015;11(8):564–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/nchembio.1856>
3. Chen J, Kuipers OP. Isolation and Analysis of the Nisin Biosynthesis Complex NisBTC: further Insights into Their Cooperative Action. *ASM mBio* [Internet]. 2021;12(5):1–20. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.02585-21>
4. Li Y, Rebuffat S. The manifold roles of microbial ribosomal peptide-based natural products in physiology and ecology. *J Biol Chem* [Internet]. 2020;295(1):34–54. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)49548-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)49548-2/fulltext)
5. Bartholomae M, Buivydas A, Viel JH, Montalbán-López M, Kuipers OP. Major gene-regulatory mechanisms operating in ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide (RiPP) biosynthesis. *Mol Microbiol* [Internet]. 2017;106(2):186–206. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.13764>
6. Montalbán-López M, Scott TA, Ramesh S, Rahman IR, Van Heel AJ, Viel JH, et al. New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2021;38(1):130–239. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/np/d0np00027b>
7. Hallen HE, Luo H, Scott-Craig JS, Walton JD. Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007;104(48):19097–101. Available from: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0707340104>
8. Santi L, Maggioli C, Mastroberto M, Tufoni M, Napoli L, Caraceni P. Acute liver failure caused by *amanita phalloides* poisoning. *Int J Hepatol* [Internet]. 2012;2012(1):1–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2012/487480>
9. Vetter J. Toxins of *amanita phalloides*. *Toxicon*. 1998;36(1):13–24.
10. Cao L, Do T, Link AJ. Mechanisms of action of ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides (RiPPs). *J Ind Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2021;48(3–4):1–27. Available from: <https://academic.oup.com/jimb/article/48/3-4/kuab005/6121428>
11. Ramm S, Krawczyk B, Mühlenweg A, Poch A, Mösker E, Süssmuth RD. A Self-Sacrificing N-Methyltransferase Is the Precursor of the Fungal Natural Product Omphalotin. *Angew Chemie - Int Ed* [Internet]. 2017;56(33):9994–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201703488>
12. Ding W, Liu WQ, Jia Y, Li Y, Van Der Donk WA, Zhang Q. Biosynthetic investigation of phomopsins reveals a widespread pathway for ribosomal natural products in Ascomycetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016;113(13):3521–6. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1522907113>
13. Umemura M, Nagano N, Koike H, Kawano J, Ishii T, Miyamura Y, et al. Characterization of the biosynthetic gene cluster for the ribosomally synthesized cyclic peptide ustiloxin B in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2014;68:23–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184514000656?via%3Dihub>

14. Ye Y, Ozaki T, Umemura M, Liu C, Minami A, Oikawa H. Heterologous production of asperipin-2a: Proposal for sequential oxidative macrocyclization by a fungi-specific DUF3328 oxidase. *Org Biomol Chem*. 2019;17(39):39–43.
15. Johnson RD, Lane GA, Koulman A, Cao M, Fraser K, Fleetwood DJ, et al. A novel family of cyclic oligopeptides derived from ribosomal peptide synthesis of an in planta-induced gene, *gigA*, in *Epichloë* endophytes of grasses. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2015;85:14–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1087184515300384?via%3Dihub>
16. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2013;30(1):108–60. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/np/c2np20085f>
17. Tian S, de Veer SJ, Durek T, Wang CK, Craik DJ. Nucleation of a key beta-turn promotes cyclotide oxidative folding. *J Biol Chem* [Internet]. 2024;300(4):107125. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(24\)01620-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(24)01620-X/fulltext)
18. Yahara S, Shigeyama C, Ura T, Wakamatsu K, Yasuhara T, Nohara T. Cyclic peptides, acyclic diterpene glycosides and other compounds from *Lycium chinense* Mill. *Chem Pharm Bull* [Internet]. 1993;41(4):703–9. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/41/4/41_4_703/_article
19. Chooi YH. RiPP-ing through the plant kingdom. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2022;18(1):2–3. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41589-021-00901-8>
20. Kersten RD, Weng JK. Gene-guided discovery and engineering of branched cyclic peptides in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2018;115(46):10961–9. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1813993115>
21. Oh DC, Poulsen M, Currie CR, Clardy J. Dentigerumycin: A bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2009;5(6):391–3. Available from: <https://www.nature.com/articles/nchembio.159>
22. Wyche TP, Ruzzini AC, Schwab L, Currie CR, Clardy J. Tryptorubin A: A Polycyclic Peptide from a Fungus-Derived Streptomycete. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2017;139(37):12899–902. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.7b06176>
23. Reisberg SH, Gao Y, Walker AS, Helfrich EJN, Clardy J, Baran PS. Total synthesis reveals atypical atropisomerism in a small-molecule natural product, tryptorubin A. *Science* (80-) [Internet]. 2020;367(6476):458–63. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aay9981>
24. Vasquez JK, Blackwell HE. Simplified Autoinducing Peptide Mimetics with Single- Nanomolar Activity Against the *Staphylococcus aureus* AgrC Quorum Sensing Receptor. *ACS Infect Dis* [Internet]. 2019;5(4):484–92. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfectdis.9b00002>
25. Schmidt EW, Nelson JT, Rasko DA, Sudek S, Eisen JA, Haygood MG, et al. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102(20):7315–20. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0501424102>
26. Pei ZF, Zhu L, Sarkisian R, Van Der Donk WA, Nair SK. Class v Lanthipeptide Cyclase Directs the Biosynthesis of a Stapled Peptide Natural Product. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2022;144(38):17549–57. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.2c06808>

27. Müller WM, Enslé P, Krawczyk B, Süßmuth RD. Leader peptide-directed processing of labyrinthopeptin A2 precursor peptide by the modifying enzyme LabKC. *Biochemistry* [Internet]. 2011;50(39):8362–73. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi200526q>
28. Ongpipattanakul C, Desormeaux EK, Dicaprio A, Van Der Donk WA, Mitchell DA, Nair SK. Mechanism of Action of Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptides. *Chem Rev* [Internet]. 2022;122(18):14722–814. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.2c00210>
29. Ren H, Shi C, Bothwell IR, Van Der Donk WA, Zhao H. Discovery and Characterization of a Class IV Lanthipeptide with a Nonoverlapping Ring Pattern. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2020;15(6):1642–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.0c00267>
30. Liang H, Lopez IJ, Sánchez-Hidalgo M, Genilloud O, Van Der Donk WA. Mechanistic Studies on Dehydration in Class v Lanthipeptides. *ACS Chem Biol*. 2022;17(9):2519–27.
31. Dou C, Long Z, Li S, Zhou D, Jin Y, Zhang L, et al. Crystal structure and catalytic mechanism of the MbnBC holoenzyme required for methanobactin biosynthesis. *Cell Res* [Internet]. 2022;32(3):302–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41422-022-00620-2>
32. Dershwitz P, Gu W, Roche J, Kang-Yun CS, Semrau JD, Bobik TA, et al. MbnC Is Not Required for the Formation of the N-Terminal Oxazolone in the Methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2022;88(2):1–10. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01841-21>
33. Kenney GE, Rosenzweig AC. Chemistry and biology of the copper chelator methanobactin. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2012;7(2):260–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cb2003913>
34. Dassama LMK, Kenney GE, Ro SY, Zielazinski EL, Rosenzweig AC. Methanobactin transport machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016;113(46):13027–32. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1603578113>
35. Park YJ, Roberts GM, Montaser R, Kenney GE, Thomas PM, Kelleher NL, et al. Characterization of a Copper-Chelating Natural Product from the Methanotroph *Methylosinus* sp. LW3. *Biochemistry* [Internet]. 2021;60(38):2845–50. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biochem.1c00443>
36. Kang-Yun CS, Liang X, Dershwitz P, Gu W, Schepers A, Flatley A, et al. Evidence for methanobactin “Theft” and novel chalkophore production in methanotrophs: impact on methanotrophic-mediated methylmercury degradation. *ISME J* [Internet]. 2022;16(1):211–20. Available from: <https://academic.oup.com/ismej/article/16/1/211/7474204?login=false>
37. Solioz M. *Copper and Bacteria Evolution, Homeostasis and Toxicity* [Internet]. Bern: Springer Cham; 2018. 88 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-94439-5>
38. Dershwitz P, Bandow NL, Yang J, Semrau JD, McEllistrem MT, Heinze RA, et al. Oxygen generation via water splitting by a novel biogenic metal ion-binding compound. *ASM Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2021;87(14):1–14. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.00286-21>
39. Severinov K, Nair SK. Microcin C: biosynthesis and mechanisms of bacterial resistance. *Future Microbiol* [Internet]. 2012;7(2):281–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fmb.11.148>
40. Martin T. Etude de nouvelles méthodologies d’hétéroarylation directe pallado-catalysées de

- liaison C-H et C-Br en série thiazolique : Application à la synthèse de cœurs thiazolylpyridiniques des thiopeptides antibiotiques de la série d [Internet]. Université de Rouen; 2010. Available from: <https://theses.hal.science/tel-00577166>
41. Yu Y, Van der Donk WA. Biosynthesis of 3-thia- α -amino acids on a carrier peptide [Internet]. Vol. 119, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2022. p. 1–8. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2205285119>
 42. O'Connor E, Shand R. Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J Ind Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2002;28(1):23–31. Available from: <https://academic.oup.com/jimb/article/28/1/23/5989522?login=false>
 43. Liang H, Song Z, Zhong Z, Zhang D, Yang W, Zhou L, et al. Mining of the biosynthetic potential of archaea reveals diverse anti-archaeal lanthipeptides. *Res Sq* [Internet]. 2023;11(74):1–21. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-023-01521-1>
 44. Makarova KS, Wolf YI, Karamycheva S, Zhang D, Aravind L, Koonin E V. Antimicrobial peptides, polymorphic toxins, and self-nonsel self recognition systems in archaea: An untapped armory for intermicrobial conflicts. *MBio* [Internet]. 2019;10(3):15–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00715-19>
 45. Besse A, Peduzzi J, Rebuffat S, Carré-Mlouka A. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie* [Internet]. 2015;118:344–55. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.4c00088>
 46. McIntosh JA, Donia MS, Schmidt EW. Ribosomal peptide natural products: Bridging the ribosomal and nonribosomal worlds. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2009;26(4):537–59. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/np/b714132g>
 47. Kouwen TRHM, Van Der Goot A, Dorenbos R, Winter T, Antelmann H, Plaisier MC, et al. Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* [Internet]. 2007;64(4):984–99. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2007.05707.x>
 48. Schwalen CJ, Hudson GA, Kosol S, Mahanta N, Challis GL, Mitchell DA. In Vitro Biosynthetic Studies of Bottromycin Expand the Enzymatic Capabilities of the YcaO Superfamily. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2017;139(50):18154–7. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.7b09899>
 49. Lewis JK, Jochimsen AS, Lefave SJ, Young AP, Kincannon WM, Roberts AG, et al. New Role for Radical SAM Enzymes in the Biosynthesis of Thio(seleno)oxazole RiPP Natural Products. *Biochemistry* [Internet]. 2021;60(45):3347–61. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.1c00469>
 50. Ayikpoe RS, Zhu L, Chen JY, Ting CP, Van der Donk WA. Macrocyclization and Backbone Rearrangement During RiPP Biosynthesis by a SAM-Dependent Domain-of-Unknown-Function 692. *ACS Cent Sci* [Internet]. 2023;9(5):1008–18. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.3c00160>
 51. Nguyen D, Zhu L, Gray DL, Woods TJ, Padhi C, Flatt KM, et al. Discovery of biaryl macrocyclic peptides with C-terminal β -amino- α -keto acid groups. *ACS* [Internet]. 2024;10(5):1022–32. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.4c00088>
 52. Chen JY, van der Donk WA. Multinuclear non-heme iron dependent oxidative enzymes (MNIOs) involved in unusual peptide modifications. *Curr Opin Chem Biol* [Internet].

- 2024;80:1–9. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593124000437?via%3Dihub>
53. Kenney GE, Rosenzweig AC. Chalkophores. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2018;87:645–76. Available from: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-biochem-062917-012300>
 54. Chen J, Van Heel AJ, Kuipers OP. Subcellular Localization and Assembly Process of the Nisin Biosynthesis Machinery in *Lactococcus lactis*. *ASM mBio* [Internet]. 2020;11(6):1–22. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.02825-20>
 55. Chandrapati S, O’Sullivan DJ. Characterization of the promoter regions involved in galactose- and nisin-mediated induction of the *nisA* gene in *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002;46(2):467–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2002.03163.x>
 56. Stein T, Heinzmann S, Solovieva I, Entian KD. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisl* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*. 2003;278(1):89–94.
 57. Manesis AC, Jodts RJ, Hoffman BM, Rosenzweig AC. Copper binding by a unique family of metalloproteins is dependent on kynurenine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021;118(23):1–8. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2100680118>
 58. Chekan JR, Ongpipattanakul C, Nair SK. Steric complementarity directs sequence promiscuous leader binding in RiPP biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2019;116(48):24049–55. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1908364116>
 59. Raffatellu M. Learning from bacterial competition in the host to develop antimicrobials. *Nat Med* [Internet]. 2018;24(8):1097–103. Available from: articles
 60. Thomas X, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Afonso C, Blond A, Birlirakis N, et al. Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(27):28233–42. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)73262-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)73262-X/fulltext)
 61. Besse A. Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d’archées halophiles [Internet]. Sorbonne Universités; 2016. Available from: <https://theses.hal.science/tel-01592394>
 62. Tan S, Ludwig KC, Müller A, Schneider T, Nodwell JR. The Lasso Peptide Siamycin-I Targets Lipid II at the Gram-Positive Cell Surface. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2019;14(5):966–74. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.9b00157>
 63. González C, Langdon GM, Bruix M, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M, et al. Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000;97(21):11221–6. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.210301097>
 64. Thennarasu S, Lee DK, Poon A, Kawulka KE, Vederas JC, Ramamoorthy A. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilosin A. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2005;137:38–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009308405001040>
 65. Hamada T, Matsunaga S, Fujiwara M, Fujita K, Hirota H, Schmucki R, et al. Solution structure of polytheonamide B, a highly cytotoxic nonribosomal polypeptide from marine sponge. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2010;132(37):12941–5. Available from:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja104616z>

66. Benabad Z. Rôle de la sous-unité sigma de l'ARN polymérase bactérienne dans la tolérance aux antibiotiques [Internet]. Université de Montpellier; 2017. Available from: <https://theses.hal.science/tel-01557507>
67. Vassilyev DG, Vassilyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature* [Internet]. 2007;448(7150):157–62. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature05932>
68. Braffman NR, Piscotta FJ, Hauver J, Campbell EA, James Link A, Darst SA. Structural mechanism of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2019;116(4):1273–8. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1817352116>
69. Metelev M, Arseniev A, Bushin LB, Kuznedelov K, Artamonova TO, Kondratenko R, et al. Acinetodin and Klebsidin, RNA Polymerase Targeting Lasso Peptides Produced by Human Isolates of *Acinetobacter gyllenbergii* and *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2017;12(3):814–24. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.6b01154>
70. Brueckner F, Cramer P. Structural basis of transcription inhibition by α -amanitin and implications for RNA polymerase II translocation. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2008;15(8):811–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nsmb.1458>
71. Spieß T, Korn SM, Kötter P, Entian KD. Autoinduction specificities of the lantibiotics subtilin and nisin. *ASM Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2015;81(22):7914–23. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.02392-15>
72. Ali L, Goraya MU, Arafat Y, Ajmal M, Chen JL, Yu D. Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: Its role in virulence and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017;18(5):1–19. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/960>
73. Špacapan M, Danevčič T, Štefanič P, Porter M, Stanley-Wall NR, Mandić-Mulec I. The ComX quorum sensing peptide of *Bacillus subtilis* affects biofilm formation negatively and sporulation positively. *Microorganisms* [Internet]. 2020;8(8):1–20. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1131>
74. Hoover SE, Perez AJ, Tsui HCT, Sinha D, Smiley DL, Dimarchi RD, et al. A new quorum-sensing system (TprA/PhrA) for *Streptococcus pneumoniae* D39 that regulates a lantibiotic biosynthesis gene cluster. *Mol Microbiol* [Internet]. 2015;97(2):229–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.13029>
75. Kodani S, Lodato MA, Durrant MC, Picart F, Willey JM. SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes. *Mol Microbiol* [Internet]. 2005;58(5):1368–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2005.04921.x>
76. Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HAB. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* [Internet]. 2006;14(7):313–9. Available from: [https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X\(06\)00128-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X06001284%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(06)00128-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X06001284%3Fshowall%3Dtrue)
77. Popp PF, Mascher T. Coordinated Cell Death in Isogenic Bacterial Populations: Sacrificing Some for the Benefit of Many? *J Mol Biol* [Internet]. 2019;431(23):4656–69. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283619302311?via%3Dihub>

78. Li Y, Ma Y, Xia Y, Zhang T, Sun S, Gao J, et al. Discovery and biosynthesis of tricyclic copper-binding ribosomal peptides containing histidine-to-butyryne crosslinks. *Nat Commun* [Internet]. 2023;14(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-38517-2>
79. Coutte L, Antoine R, Slupek S, Solans L, Derop J, Bonnefond A, et al. Combined RNAseq and ChIPseq Analyses of the BvgA Virulence Regulator of *Bordetella pertussis*. *ASM mSystems* [Internet]. 2020;5(3):1–15. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/msystems.00208-20>
80. Cranford-Smith T, Huber D. The way is the goal: How SecA transports proteins across the cytoplasmic membrane in bacteria. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2018;365(11):1–16. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article/365/11/fny093/4969678?login=false>
81. Müller FH, Bandejas TM, Urich T, Teixeira M, Gomes CM, Kletzin A. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: Characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol* [Internet]. 2004;53(4):1147–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2004.04193.x>
82. Nambi S, Long JE, Mishra BB, Baker R, Murphy KC, Olive AJ, et al. The Oxidative Stress Network of *Mycobacterium tuberculosis* Reveals Coordination between Radical Detoxification Systems. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2015;17(6):829–37. Available from: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(15\)00212-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312815002127%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(15)00212-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312815002127%3Fshowall%3Dtrue)
83. Clark IC, Melnyk RA, Iavarone AT, Novichkov PS, Coates JD. Chlorate reduction in *Shewanella algae* CDC is a recently acquired metabolism characterized by gene loss, suboptimal regulation and oxidative stress. *Mol Microbiol* [Internet]. 2014;94(1):107–25. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.12746>
84. Wiesemann N, Mohr J, Grosse C, Herzberg M, Hause G, Reith F, et al. Influence of copper resistance determinants on gold transformation by *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Bacteriol* [Internet]. 2013;195(10):2298–308. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.01951-12>
85. Jwanoswki K, Wells C, Bruce T, Rutt J, Banks T, McNealy TL. The *Legionella pneumophila* GIG operon responds to gold and copper in planktonic and biofilm cultures. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(5):1–17. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0174245>
86. Hu P, Brodie EL, Suzuki Y, McAdams HH, Andersen GL. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* [Internet]. 2005;187(24):8437–49. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.187.24.8437-8449.2005>
87. Reith F, Etschmann B, Grosse C, Moors H, Benotmane MA, Monsieurs P, et al. Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(42):17757–62. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0904583106>
88. Kohler C, Lourenço RF, Avelar GM, Gomes SL. Extracytoplasmic function (ECF) sigma factor F is involved in *Caulobacter crescentus* response to heavy metal stress. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012;12:1–14. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-210>

89. Maertens L, Cherry P, Tilquin F, Van Houdt R, Matroule JY. Environmental conditions modulate the transcriptomic response of both *Caulobacter crescentus* morphotypes to copper stress. *Microorganisms* [Internet]. 2021;9(6):1–25. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/6/1116>
90. Alvarez-Martinez CE, Baldini RL, Gomes SL. A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. *J Bacteriol* [Internet]. 2006;188(5):1835–46. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.188.5.1835-1846.2006>
91. Govers SK, Jacobs-Wagner C. *Caulobacter crescentus*: model system extraordinaire. *Curr Biol* [Internet]. 2020;30(19):1151–8. Available from: [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(20\)31025-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982220310253%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(20)31025-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982220310253%3Fshowall%3Dtrue)
92. Collier J. Cell division control in *Caulobacter crescentus*. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* [Internet]. 2019;1862(7):685–90. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187493991730408X?via%3Dihub>
93. Poindexter JS. Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. *Bacteriol Rev* [Internet]. 1964;28(3):231–95. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/br.28.3.231-295.1964>
94. Marks ME, Castro-Rojas CM, Teiling C, Du L, Kapatral V, Walunas TL, et al. The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* [Internet]. 2010;192(14):3678–88. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00255-10>
95. Dalecki AG, Crawford CL, Wolschendorf F. Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications. *Adv Microb Physiol* [Internet]. 2017;70:193–260. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065291117300073?via%3Dihub>
96. Rivera-Millot A, Slupek S, Chatagnon J, Roy G, Saliou JM, Billon G, et al. Streamlined copper defenses make *Bordetella pertussis* reliant on custom-made operon. *Commun Biol* [Internet]. 2021;4(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42003-020-01580-2>
97. Yang J, Gao M, Wang J, He C, Wang X, Liu L. Structural basis of copper binding by a dimeric periplasmic protein forming a six-helical bundle. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2022;229:1–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0162013422000174?via%3Dihub>
98. Lawaré E, Gillet S, Louis G, Tilquin F, Le Blastier S, Cambier P, et al. *Caulobacter crescentus* intrinsic dimorphism provides a prompt bimodal response to copper stress. *Nat Microbiol* [Internet]. 2016;1(9):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201698>
99. Nasreen M, Fletcher A, Hosmer J, Zhong Q, Essilfie AT, McEwan AG, et al. The Alternative Sigma Factor RpoE2 Is Involved in the Stress Response to Hypochlorite and in vivo Survival of *Haemophilus influenzae*. *Front Microbiol* [Internet]. 2021;12:1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.637213/full>
100. Ahearn CP, Kirkham C, Chaves LD, Kong Y, Pettigrew MM, Murphy TF. Discovery and Contribution of Nontypeable *Haemophilus influenzae* NTHI1441 to Human Respiratory Epithelial Cell Invasion. *Infect Immun* [Internet]. 2019;87(11):1–21. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.00462-19>

101. Manley OM, Shriver RJ, Xu T, Melendrez IA, Palacios P, Robson SA, et al. A multi-iron enzyme installs copper-binding oxazolone/thioamide pairs on a nontypeable *Haemophilus influenzae* virulence factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2024;121(28):1–10. Available from: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2408092121>
102. Rivera-Millot A. Mécanismes de l'homéostasie du cuivre chez un pathogène strictement humain, *Bordetella pertussis* [Internet]. Université de Lille; 2020. Available from: <https://theses.fr/2020LILUS009>
103. Hawkins CL. Hypochlorous acid-mediated modification of proteins and its consequences. *Essays Biochem* [Internet]. 2021;64(1):75–86. Available from: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article-abstract/64/1/75/221697/Hypochlorous-acid-mediated-modification-of?redirectedFrom=fulltext>
104. Louis G, Cherry P, Michaux C, Rahuel-Clermont S, Dieu M, Tilquin F, et al. A cytoplasmic chemoreceptor and reactive oxygen species mediate bacterial chemotaxis to copper. *J Biol Chem* [Internet]. 2023;299(10):1–11. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(23\)02235-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(23)02235-4/fulltext)
105. Corpe WA, Jensen TE. The diversity of bacteria, eukaryotic cells and viruses in an oligotrophic lake. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 1996;46(5–6):622–30. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530050872>
106. Hao X, Lüthje F, Rønn R, German NA, Li X, Huang F, et al. A role for copper in protozoan grazing – two billion years selecting for bacterial copper resistance. *Mol Microbiol* [Internet]. 2016;102(4):628–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.13483>
107. Dallaire-Dufresne S, Paquet VE, Charette SJ. *Dictyostelium discoideum*: Un modèle pour l'étude de la virulence bactérienne. *Can J Microbiol* [Internet]. 2011;57(9):699–707. Available from: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/w11-072>
108. Yoon S, Kraemer SM, DiSpirito AA, Semrau JD. An assay for screening microbial cultures for chalkophore production. *Environ Microbiol Rep* [Internet]. 2010;2(2):295–303. Available from: <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1758-2229.2009.00125.x>
109. Novoa-Aponte L, Xu C, Soncini FC, Argüello JM. The Two-Component System CopRS Maintains Subfemtomolar Levels of Free Copper in the Periplasm of *Pseudomonas aeruginosa* Using a Phosphatase-Based Mechanism. *mSphere* [Internet]. 2020;5(6):1–15. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/msphere.01193-20>
110. Montero Llopis P, Jackson AF, Sliusarenko O, Surovtsev I, Heinritz J, Emonet T, et al. Spatial organization of the flow of genetic. *Nature* [Internet]. 2010;466(7302):77–81. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature09152>
111. Farrant K V., Spiga L, Davies JC, Williams HD. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to the innate immune system-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid. *J Bacteriol* [Internet]. 2021;203(2):1–23. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00300-20>
112. Melvin JA, Scheller E V., Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: Current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2014;12(4):274–88. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3235>
113. Roy G. Étude d'un système d'acquisition du cuivre chez *Bordetella pertussis* : nouveau mécanisme de régulation post-transcriptionnelle et caractérisation fonctionnelle préliminaire [Internet]. Université de Lille; 2022. Available from: <https://theses.fr/2022ULILS058>

114. Farman MR, Petráčková D, Kumar D, Držmíšek J, Saha A, Čurnová I, et al. Avirulent phenotype promotes *Bordetella pertussis* adaptation to the intramacrophage environment. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2023;12(1). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2022.2146536>
115. Josts I, Veith K, Normant V, Schalk IJ, Tidow H. Structural insights into a novel family of integral membrane siderophore reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021;118(34):1–7. Available from: <https://www.pnas.org/doi/epub/10.1073/pnas.2101952118>
116. Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, et al. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* [Internet]. 2000;182(20):5902–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC94716/>
117. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* [Internet]. 1995;166(1):175–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0378111995005841?via%3Dihub>
118. Dunbar KL, Tietz JI, Cox CL, Burkhardt BJ, Mitchell DA. Identification of an Auxiliary Leader Peptide-Binding Protein Required for Azoline Formation in Ribosomal Natural Products. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2015;137(24):7672–7. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.5b04682>
119. Huth JR, Bewley CA, Jackson BM, Hinnebusch AG, Clore GM, Gronenborn AM. Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR. *Protein Sci*. 1997;6(11):2359–64.

Annexes

Matériels et Méthodes supplémentaires

Tableau 9. Liste des souches de *C. vibrioïdes* construites et utilisées dans ce travail

Souches de <i>C. vibrioïdes</i>	Caractéristiques génétiques
WT	Souche sauvage de <i>C. vibrioïdes</i> NA1000
DKO	Délétion de <i>buf1</i> et <i>buf2</i>
<i>buf1</i>	Délétion de <i>buf2</i>
<i>buf2</i>	Délétion de <i>buf1</i>
<i>buf1(A)</i>	Dans un contexte <i>buf1</i> , délétion de <i>buf1(B)</i> , <i>buf1(C)</i> et <i>buf1(D)</i>
<i>buf2(A)</i>	Dans un contexte <i>buf2</i> , délétion de <i>buf2(B)</i> et <i>buf2(C)</i>
<i>buf1(BCD)</i>	Dans un contexte <i>buf1</i> , délétion de <i>buf1(A)</i>
<i>buf1(ACD)</i>	Dans un contexte <i>buf1</i> , délétion de <i>buf1(B)</i>
<i>buf1(ABD)</i>	Dans un contexte <i>buf1</i> , délétion de <i>buf1(C)</i>
<i>buf1(ABC_{DUF2063}D)</i>	Dans un contexte <i>buf1</i> , délétion du domaine RRE de <i>buf1(C)</i>
<i>buf1(ABC)</i>	Dans un contexte <i>buf2</i> , délétion de <i>buf1(D)</i>
<i>buf1</i> ^{CysI Ser+CysIV Ser}	Dans un contexte <i>buf1</i> , substitution de CysI et CysIV par Ser
<i>buf1</i> ^{CysII Ser+CysIII Ser}	Dans un contexte <i>buf1</i> , substitution de CysII et CysIII par Ser
<i>buf1</i> ^{CysII Ser}	Dans un contexte <i>buf1</i> , substitution de CysII par Ser
<i>buf1</i> ^{CysIII Ser}	Dans un contexte <i>buf1</i> , substitution de CysIII par Ser
<i>buf1(A)+buf2(BC)</i>	Délétion de <i>buf2(A)</i> , <i>buf1(B)</i> , <i>buf1(C)</i> et <i>buf1(D)</i>
<i>buf1(BCD)+buf2(A)</i>	Délétion de <i>buf1(A)</i> , <i>buf2(B)</i> et <i>buf2(C)</i>
<i>buf1(A2BCD)</i>	Dans un contexte <i>buf1</i> , substitution de <i>buf1(A)</i> par <i>buf2(A)</i>

<i>buf2</i>(A1BC)	Dans un contexte <i>buf2</i> , substitution de <i>buf2</i> (A) par <i>buf1</i> (A)
<i>buf1</i>(A^{ΔHySP}BCD)	Dans un contexte <i>buf1</i> , délétion de la partie hydrophobe du signal peptide de BufA1
<i>buf1</i>(A^{SPA2}BCD)	Dans un contexte <i>buf1</i> , substitution du signal peptide de BufA1 par celui de BufA2
<i>buf1</i>(A^{SPX}BCD)	Dans un contexte <i>buf1</i> , substitution du signal peptide de BufA1 par celui de la lipocaline
<i>buf1</i>(A^{ΔTEKCY}BCD)	Dans un contexte <i>buf1</i> , délétion du β-sheet de BufA1
<i>buf1</i>(A^{AAACA}BCD)	Dans un contexte <i>buf1</i> , substitution du β-sheet par des Alanines
<i>buf1</i>(A^{6His}BCD)	Dans un contexte <i>buf1</i> , insertion d'un 6His-tag à l'extrémité 3' du gène précurseur
<i>buf2</i>(A^{6His}BC)	Dans un contexte <i>buf2</i> , insertion d'un 6His-tag à l'extrémité 3' du gène précurseur
<i>buf1</i>(A^{Twnstr}BCD)	Dans un contexte <i>buf1</i> , insertion d'un Twin-strep-tag à l'extrémité 3' du gène précurseur
<i>buf1</i>(A^{Twnstr(CIIS+CIIS)}BC)	Dans un contexte <i>buf1</i> , insertion d'un Twin-strep-tag à l'extrémité 3' du gène précurseur <i>buf1</i> ^{CysI^{Ser}+CysIV^{Ser}}
<i>buf1</i>(A-LacZ)+<i>buf2</i>(ABC)	Fusion transcriptionnelle de <i>buf1</i> (A) avec Lac-Z
<i>buf1</i>(ABCD)+<i>buf2</i>(A-LacZ)	Fusion transcriptionnelle de <i>buf2</i> (A) avec Lac-Z
<i>buf1</i>(ABCD-LacZ)+<i>buf2</i>(ABC)	Fusion transcriptionnelle de <i>buf1</i> (D) avec Lac-Z
<i>buf1</i>(ABCD)+<i>buf2</i>(ABC-LacZ)	Fusion transcriptionnelle de <i>buf2</i> (C) avec Lac-Z
<i>buf1</i>(BCD-LacZ)+<i>buf2</i>(ABC)	Fusion transcriptionnelle de <i>buf1</i> (D) avec Lac-Z en absence de <i>buf1</i> (A)
<i>buf1</i>(ABCD)+<i>buf2</i>(BC-LacZ)	Fusion transcriptionnelle de <i>buf2</i> (C) avec Lac-Z en absence de <i>buf2</i> (A)
DKO pMR10(A1B1C1)	Complémentation de la souche DKO avec l'opéron <i>buf1</i> sur plasmide pMR10
DKO <i>buf2</i>(A1B1C1) V1	Complémentation de la souche DKO avec l'opéron <i>buf1</i> dans le locus <i>buf2</i> avec le promoteur <i>buf2</i>
DKO <i>buf2</i>(A1B1C1) V2	Complémentation de la souche DKO avec l'opéron <i>buf1</i> dans le locus <i>buf2</i> avec le promoteur <i>buf1</i>

Tableau 10. Liste des souches de *B. pertussis* utilisées dans ce travail

Souche de <i>B. pertussis</i>	Caractéristiques génétiques
BPSM	Souche sauvage de <i>B. pertussis</i>
BPEL	Délétion de l'opéron <i>bp2924-2927</i>
BPΔ26	Délétion du gène <i>bp2926</i>
BPOP	Couplage traductionnel des 4 gènes <i>bp2924-2927</i>
BPΔ24	Délétion du gène <i>bp2924</i>
BP24_{STOP}	Insertion d'un codon STOP au début du gène <i>bp2924</i>
BPSM-ΔcopZ	Dans un contexte BPSM, insertion du plasmide suicide pFus dans le gène <i>copZ</i>
BP24_{STOP}-ΔcopZ	Dans un contexte BP24 _{STOP} , insertion du plasmide suicide pFus dans le gène <i>copZ</i>

Tableau 11. Liste des plasmides utilisés dans ce travail

Plasmides	Caractéristiques génétiques	Caractéristiques phénotypiques
pCR4-TOPO (commercial)	Kan ^R et Amp ^R <i>lacZ</i> TOPO binding site	Résistance à la kanamycine et à l'ampicilline Screening blanc/bleu Insertion des produits de PCR par topo- isomérisation
pUC19 (commercial)	Amp ^R <i>lacZ</i>	Résistance à l'ampicilline Screening blanc/bleu Haut nombre de copies
pNPTS138 (don de J-Y Matroule)	Kan ^R <i>sacB</i> <i>traJ</i> et <i>oriT</i>	Résistance à la kanamycine Plasmide suicide sensible au sucrose Conjugaison (pour échange allélique chez <i>C. vibrioïdes</i>)
pFUS2 (Antoine et. al (2000) (116))	Gen ^R <i>lacZ</i> sans promoteur	Résistance à la gentamycine Plasmide suicide chez <i>C. vibrioïdes</i> Fusion transcriptionnelle avec <i>lacZ</i>
pSRKKm (don de JY Matroule)	Kan ^R T7 <i>lac</i>	Résistance à la kanamycine Plasmide répliatif chez <i>C. vibrioïdes</i> à moyen nombre de copies Inductible à l'IPTG (promoteur Lac)
pMR10 (don de JY Matroule)	Kan ^R	Résistance à la kanamycine Plasmide répliatif chez <i>C. vibrioïdes</i> à faible nombre de copies
pBBR1MCS-5+ (Kovach et. al (1995) (116))	Gen ^R	Résistance à la gentamycine

Plasmide réplcatif chez <i>C. vibrioides</i>		
pACYC-Duet (commercial)	Cm ^R T7/ <i>lac</i>	Résistance au chloramphénicol Inductible à l'IPTG (promoteur T7)
pET-Duet (commercial)	Amp ^R T7/ <i>lac</i>	Résistance à l'ampicilline Inductible à l'IPTG (promoteur T7)
pET-SUMO (commercial)	Kan ^R T7/ <i>lac</i> SUMO	Résistance à la kanamycine Inductible à l'IPTG Fusion SUMO
pMALC2X (commercial)	Amp ^R T7/ <i>lac</i> MPB	Résistance à l'ampicilline Inductible à l'IPTG Fusion traductionnelle avec la protéine MBP
pGEV2 (Huth et. al (1997) (119))	Amp ^R T7/ <i>lac</i>	Résistance à l'ampicilline Inductible à l'IPTG Fusion traductionnelle avec le domaine GB1

1 Article : A widespread family of ribosomal peptide
2 metallophores involved in bacterial adaptation to metal stress
3
4

5 Laura Leprevost^{#1}, Sophie Jünger^{#2}, Guy Lippens³, Céline Guillaume², Giuseppe Sicoli⁴,
6 Lydie Oliveira⁵, Enrico Falcone⁶, Emiliano de Santis⁷, Alex Rivera-Millot^{1&}, Gabriel Billon⁴,
7 Francesco Stellato⁷, Céline Henry⁵, Rudy Antoine^{£1}, Séverine Zirah^{£2}, Svetlana Dubiley^{£*3},
8 Yanyan Li^{£*2}, Françoise Jacob-Dubuisson^{£*1}

9
10 ¹ Univ. Lille, U1018-UMR9017-CIIL-Center for infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille,
11 FRANCE

12 ² Unit Molecules of Communication and Adaptation of Microorganisms (MCAM), UMR 7245
13 CNRS, MNHN, 75005 Paris, FRANCE

14 ³ Toulouse Biotechnology Institute, CNRS/INRAE/INSA/UPS, 31077 Toulouse, FRANCE

15 ⁴ Univ. Lille, CNRS, UMR 8516 - LASIRE, Laboratoire de Spectroscopie pour les Interactions, la
16 Réactivité et l'Environnement F-59000 Lille, FRANCE

17 ⁵ INRAE-AgroParisTech-Univ. Paris-Saclay, MICALIS, 78352 Jouy-en Josas, FRANCE

18 ⁶ Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC), CNRS UPR 8241, 31077 Toulouse, FRANCE

19 ⁷ Department of Physics, University of Rome Tor Vergata & INFN, 00133 Rome, ITALY

20
21 [#] contributed equally

22 [&] current address: INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Bacterial Symbionts
23 Evolution, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada

24 [£] senior authors

25 ^{*} correspondence: francoise.jacob@ibl.cnrs.fr; yanyanli@mnhn.fr; svetlana.dubiley@gmail.com

26
27
28 Author contributions: GL, RA, SD, SZ, YL, FJD designed research; LL, SJ, GL, CG, GS, LO, EF,
29 ES, ARM, GB, FS, CH, RA, SD performed research; LL, SJ, GL, CG, GS, LO, EF, ES, ARM,
30 GB, FS, CH, RA, SZ, SD, YL, FJD analyzed data; LL, SJ, GL, SD, SZ, YL, FJD wrote the paper.

31
32 **Competing interest statement:** The authors declare no competing interests.

33 **Classification:** Biological Sciences - Biochemistry - Microbiology

34 **Keywords:** RiPP, metallophore, MNIO enzyme

35
36 This article was deposited as a preprint in BioRxiv (BIORXIV/2024/585515)

37
38 **Abstract**

39 Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) are a structurally
40 diverse group of natural products that bacteria employ in their survival strategies. Herein, we
41 characterized the structure, the biosynthetic pathway and the mode of action of a new RiPP
42 family called bufferins. With thousands of homologous biosynthetic gene clusters throughout
43 the bacterial phylogenetic tree, bufferins form by far the largest family of RiPPs modified by
44 multinuclear non-heme iron-dependent oxidases (MNIO, DUF692 family). Using *Caulobacter*
45 *vibrioides* bufferins as a model, we showed that the conserved Cys residues of their precursors
46 are transformed into 5-thiooxazoles, further expanding the reaction range of MNIO enzymes.
47 This rare modification is installed in conjunction with a partner protein of the DUF2063 family.
48 Bufferin precursors are rare examples of bacterial RiPPs found to feature an N-terminal Sec
49 signal peptide allowing them to be exported by the ubiquitous Sec pathway. We reveal that
50 bufferins are involved in copper homeostasis, and their metal-binding propensity requires the
51 thiooxazole heterocycles. Bufferins enhance bacterial growth under copper stress by
52 complexing excess metal ions in the periplasm. Our study thus describes a large family of RiPP
53 metallophores and unveils a widespread but overlooked metal homeostasis mechanism in
54 bacteria.

55

56 **Significance statement**

57 Copper is both essential and toxic in excess. Bacteria face copper in their environments, notably
58 in phagocytes, hence they have developed several defense mechanisms. We discovered a new
59 strategy of protection from copper, through the biosynthesis of natural products that we named
60 bufferins. Bufferins are ribosomally synthesized post-translationally modified peptides
61 (RiPPs), natural products with key roles in bacterial physiology and ecology. Model bufferins
62 enhance bacterial growth under copper stress by complexing with the metal using thiooxazole
63 heterocycles that result from enzymatic modification of cysteine residues. With thousands of

64 homologs throughout the bacterial phylogenetic tree, bufferins represent a highly prevalent
65 strategy for maintaining the homeostasis of copper, and possibly of other metals.

66

67 **Main text**

68 **Introduction**

69 Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) are natural
70 products with a tremendous variety of structures and biological activities (1-3). They are
71 synthesized from a gene-encoded precursor peptide, generally composed of an N-terminal
72 leader sequence and a core sequence where post-translational modifications (PTMs) occur. In
73 many cases, a pathway-specific RiPP recognition element (RRE) domain interacts with the
74 leader sequence and mediates recruitment of the modification enzymes (4-6). RRE domains are
75 thus a hallmark of RiPP biosynthesis. The vast structural diversity of RiPPs is conferred by
76 virtually unlimited possibilities of chemical transformations. An emerging family of PTM
77 enzymes is the DUF692 family of multinuclear non-heme iron dependent oxidases (MNIOs)
78 that catalyze various reactions in the biosynthesis of diverse RiPPs, mostly but not exclusively
79 on Cys residues (7-13). These reactions include oxazolone coupled to thioamide formation,
80 excision of cysteine β -methylene, Cys-involved macrocyclization, and C-C and C-N cleavages
81 (7, 8, 11-13). However, the full spectrum of MNIO activities remains far from being fully
82 appreciated.

83 Four-gene *gig* operons (*gig* for gold-induced genes) encoding DUF692 (MNIO) family
84 proteins were identified in the genomes of several microbial species (SI Fig. S1). In *Cupriavidus*
85 *metallidurans* (RMET_RS24090-RS24075), *Legionella pneumophila* (LPG_RS10595-
86 LPG_RS10580), and *Caulobacter vibrioides* (CCNA_03363-CCNA_03366), the expression of
87 these operons is induced under various transition metal stresses that include gold, cadmium,
88 copper etc., whereas in *Bordetella pertussis* (BP_RS14685-BP_RS14700) it is controlled by

89 the master regulator of virulence BvgAS (14-18). Orthologous operons were notably found in
90 methane-oxidizing bacteria (19). However, despite genetic evidence for an involvement in the
91 copper-resistant phenotype in *C. metallidurans* (20), the function of these operons remains
92 elusive. Based on their composition, we speculated that they are biosynthetic gene clusters
93 (BGCs) whose products could represent a new RiPP family. Unlike most previously described
94 RiPPs however, these putative precursors have predicted Sec signal peptides. Using genetic,
95 structural, and bioinformatic analyses, we questioned the function, the mode of action, and the
96 prevalence of *gig*-like operons in bacteria.

97 We report the characterization of the products of the *C. vibrioides* *gig*-like BGCs, the first
98 representative of bufferins, a new family of RiPPs. We revealed that bufferins are small protein
99 metallophores containing rare 5-thiooxazole modifications of Cys residues. The joint action of
100 the DUF692 (MNIO) and DUF2063 proteins is required to install this post-translational
101 modification, which is new to the MNIO family of enzymes. We showed that the *C. vibrioides*
102 bufferins protect bacteria against toxic concentrations of copper by binding the excess metal in
103 the periplasm. Our bioinformatic study suggests that bufferins represent an overlooked copper
104 defense mechanism very common in Hydrobacteria and Terrabacteria.

105

106 **Results**

107 ***Large new RiPP family involving MNIOs.*** We performed an *in-silico* analysis of the
108 CCNA_03363-03366 operon of *C. vibrioides*, hereafter named *buf1*, to gain insight into gene
109 functions. CCNA_03363 encodes a DUF2282-family protein (BufA1), whose members are 80-
110 120 residues long and harbor four Cys residues (Cys^I to Cys^{IV}) and a predicted Sec signal
111 peptide (Fig. 1A). We hypothesized that BufA1 is an unusually long precursor peptide whose
112 translocation across the cytoplasmic membrane would rely on the ubiquitous Sec export
113 pathway rather than on a specialized export system as is often the case for secreted RiPPs (21).

114 The AlphaFold2 model predicts that the 68-residue long BufA1 peptide - after removal of the
115 predicted Sec signal peptide - contains a 2-stranded β sheet, some α -helical structure, and a
116 disulfide (S-S) bond between the first β strand and the short α helix (*SI Fig. S1*). Mature BufA1
117 is predicted with good confidence to fold as a small protein rather than being a totally
118 unstructured peptide (*SI Figs. S1 and S2*).

119 The product of CCNA_03364 (BufB1) belongs to the MNIO family, whereas
120 CCNA_03365 codes for a protein (BufC1) with an uncharacterized N-terminal DUF2063
121 domain. The predicted structural model of BufC1 revealed that its C-terminal domain is related
122 to RRE domains (4-6) (*SI Fig. S1*). In light of recent discoveries of MNIOs involved in RiPP
123 biosynthesis (7-13), we hypothesized that BufB1 and BufC1 would install modifications on Cys
124 residues of BufA1. Finally, CCNA_03366 encodes a putative DoxX-type oxido-reductase,
125 BufD1 (22-23).

126 Inspection of the *C. vibrioides* genome identified a second operon, the *buf2* BGC
127 (CCNA_02999-03001) (Fig. 1A) which encodes homologs of BufB1 (CCNA_03000) and
128 BufC1 (CCNA_02999) but lacks a *bufD1*-like gene. Like BufA1, its putative precursor peptide
129 BufA2 (CCNA_03001) possesses a predicted Sec signal peptide. Its 61-residue core peptide
130 contains six Cys residues (Cys^I to Cys^{VI}) (Fig. 1A). Although its predicted 3D structure is very
131 similar to that of BufA1 (*SI Figs. S1 and S2*), this small protein does not have a corresponding
132 profile in the databases of protein families.

133 To evaluate the abundance of homologous BGCs, we collected >14,000 MNIO protein
134 sequences from the NCBI non-redundant database. The retrieved sequences are widely
135 distributed throughout Pseudomonadota, Terrabacteria, Myxococcota,
136 Fibrobacteres/Chlorobi/Bacteroidetes, Planctomycetes/Verrucomicrobia/Chlamydia, and
137 Acidobacteriota. We analyzed their genomic contexts and collected associated genes coding for
138 putative bufferin-like precursors, i.e., small proteins with Cys residues and a predicted Sec

139 signal peptide. Thousands of these were collected, some of which are markedly larger than
140 typical RiPP precursors and harbor numerous Cys residues (detailed *in silico* analyses will be
141 published separately). In a sequence similarity network (SSN) constructed with these proteins,
142 the largest cluster corresponds to the DUF2282 signature, including *C. vibrioides* BufA1 (Fig.
143 1B). BufA2 of *C. vibrioides* belongs to the second largest cluster of proteins characterized by
144 six or twelve conserved Cys residues, which we named BUF_6/12Cys (Fig. 1B,C). Of note,
145 BUF_6/12Cys proteins were previously identified in Antarctic soil metagenomes (24). Parallel
146 SSN analyses of the MNIO superfamily (Fig. 1D) showed that those coded in the DUF2282
147 and BUF_6/12Cys BGCs belong to the most populated sequence cluster, distinct from small
148 clusters of MNIOs involved in the biosynthesis of other RiPP types (7, 9-11, 13). Together our
149 data indicate that bufferins currently form the largest group of MNIO-associated RiPPs.

150

151 ***Bufferins mediate adaptation to copper stress.*** In *C. vibrioides*, *buf1* and *buf2* BGCs belong to
152 the SigF-controlled, core regulon of copper stress (15, 17, 25). To test if they could be up-
153 regulated by other biologically relevant metals, we generated reporter fusions within *bufA1* and
154 *bufA2* and confirmed that both are induced by high concentrations of Cu^{2+} , but not by Fe^{2+} , Zn^{2+}
155 or Mn^{2+} (Fig. 2A; *SI* Fig. S3).

156 To determine if bufferins, the putative RiPP products of the *buf* BGCs, contribute to
157 adaptation to excess copper, we prepared *C. vibrioides* deletion mutants that express a single
158 (C_{Vbuf1} and C_{Vbuf2}) or neither BGC (C_{VDKO}). C_{VDKO} grew more slowly than the parental C_{VWT}
159 strain when CuSO_4 was added to the growth medium, unlike C_{Vbuf1} or C_{Vbuf2} (Fig. 2B). Thus,
160 *C. vibrioides* bufferins enhance growth under copper stress and are functionally redundant. To
161 confirm that a single BGC is sufficient to protect bacteria from excess copper, we performed
162 gain-of-function experiments. Expression of *buf1ABCD* in an *Escherichia coli* laboratory strain
163 enhanced survival of *bacteria* exposed to a bactericidal concentration of Cu^{2+} (Fig. 2C). In

164 reducing, microaerobic conditions, expression of the operon also protected *E. coli* from Cu⁺
165 (Fig. 2D).

166 We then asked whether the bufferins would confer an advantage on *C. vibrioides* in biotic
167 interactions. Since amoeba notably use copper against their bacterial preys (26), a predation
168 assay was performed. We attempted to measure survival of *C. vibrioides* after ingestion by
169 *Dictyostelium discoïdum*, a well-established model organism for the study of phagocytosis.
170 However, as these attempts were unsuccessful, we tested if the presence of the *buf* BGCs might
171 slow down bacterial killing by performing phagocytic plaque assays on agar plates (26). In this
172 assay, bacteria tolerant to copper are killed more slowly by amoeba than copper-sensitive
173 bacteria, and because amoeba have a limited phagocytic capacity a lower rate of intracellular
174 killing implies a lower rate of ingestion (26). The relative survival rates of C_{VWT} and C_{VDKO}
175 were compared by placing amoebal suspensions onto bacterial lawns and measuring bacterial
176 densities in the contact zones via densitometry scanning after incubation (Fig. 2E). Weaker
177 bacterial densities with larger zones of complete clearance were observed for the C_{CDKO}
178 compared to the C_{CWT} strain, consistent with a protective role of bufferins in this context.

179
180 **Characterization of bufferin PTMs.** To identify the PTMs of bufferins, we engineered an
181 IPTG-inducible version of SigF to control expression of their BGCs in *C. vibrioides*. The
182 metabolic profiles of IPTG-treated C_{Vbuf1}(pSigF) and C_{Vbuf2}(pSigF) were analyzed by liquid
183 chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) and compared to that of C_{VDKO}(pSigF)
184 to reveal peptide species only present in the *buf*-expressing strains. In C_{Vbuf1}(pSigF), a major
185 species exhibited a mass matching that of BufA1 with the predicted Sec signal peptide cleaved
186 off and a -10 Da mass shift (Fig. 3A; SI Fig. S4 and Table S1), suggesting that the core peptide
187 accumulates in the periplasm and contains post-translational modifications of one or more
188 residues. A second form with a -12 Da mass shift was also detected, but not systematically, as
189 its presence varied according to storage conditions. The major product with a -10 Da mass shift

190 is considered the mature peptide product and was named bufferin 1 (Buf1). Similarly,
191 C_V_{buf2}(pSigF) produced a major peptide product with a -18 Da mass shift, called bufferin 2
192 (Buf2), and a minor species with a -20 Da mass shift (*SI* Fig. S4 and Table S1).

193 To test the hypothesis that mature bufferins contain modified Cys residues and/or disulfide
194 (S-S) bonds, we performed reduction and alkylation treatment of the peptides. Both the -10 Da
195 and the -12 Da species were converted by this treatment into species with a mass shift of -8 Da
196 and three or four alkyl groups for Buf1 (*SI* Fig. S5). The conversion to a -8 Da species indicated
197 the reduction of one and two S-S bonds for the -10 Da and -12 Da forms, respectively, with the
198 -8 Da mass shift caused by PTM(s). The presence of three or four alkyl groups in reduced Buf1
199 indicates that the PTM(s) do not affect Cys residues or result in alkylation-sensitive groups.
200 Similarly, for Buf2, both the -18 Da and the -20 Da species were converted into species with a
201 mass shift of -16 Da and four, five or six alkyl groups (*SI* Fig. S6). MS analyses of trypsin-
202 digested, alkylated Buf1 revealed that Cys^I (Cys12) and Cys^{IV} (Cys52) (numbering according
203 to the core peptide, see Fig. 1) had mass increments corresponding to alkylation only, indicative
204 of unmodified residues (*SI* Fig. S7). By contrast, in the central tryptic peptide containing Cys^{II}
205 (Cys23) and Cys^{III} (Cys31), both Cys residues carry mass increments corresponding to
206 alkylation with additional -4.03 Da mass shifts (Fig. 3B), as proposed by the untargeted PTM
207 search solution SpecGlobX (27).

208 To confirm that Cys residues are required for Buf1 function, we constructed strains with
209 the four conserved Cys residues replaced with Ser, separately or in combinations. Consistent
210 with the proposed modifications of Cys^{II} and Cys^{III} and the presence of an S-S bond between
211 Cys^I and Cys^{IV}, the substitution of either of Cys^{II} or Cys^{III} yielded peptides with mass shifts of
212 -6 Da relative to the calculated mass of the mutated peptide (*SI* Fig. S8). We tested the ability
213 of the mutated BufA1 to protect *C. vibrioides* from excess copper. All mutant strains grew more
214 slowly than the parental C_V_{buf1} in the presence of CuSO₄ (*SI* Fig. S9), indicating the importance

215 of both modified and unmodified Cys residues for function. However, the Buf1^{CysISer+CysIVSer}
216 variant was not detected in cell extracts by MS, suggesting that it was proteolyzed
217 intracellularly. Altogether, the data are consistent with the presence of an S-S bond between
218 Cys^I and Cys^{IV} that stabilizes the tertiary structure of the bufferin, and Cys^{II} and Cys^{III} being
219 targets of 4-electron oxidation reactions that generate alkylation-sensitive, presumably thiol-
220 containing groups. The Buf1 congener product with a -12 Da mass shift could correspond to a
221 form with a labile S-S bond between the modified residues. Similarly, in Buf2, in addition to
222 the unmodified Cys^I (Cys24) and Cys^{VI} (Cys50) likely forming an S-S bond (*SI* Fig. S1), the
223 central Cys residues carry -4.03 Da shifts (*SI* Fig. S10).

224 To facilitate bufferin purification and characterization, we added C-terminal tags to BufA1
225 and BufA2 (*SI* Table S1). The affinity-purified tagged Buf1 was fully modified, with a -10 Da
226 mass shift (*SI* Fig. S11). Similarly, Buf1 purified from a *C. vibrioides* culture induced with
227 copper showed a -10 Da mass shift (*SI* Fig. S12). To probe if the modified Cys residues may
228 be part of heterocycles as in other MNIO-modified RiPPs (7, 10), we recorded UV-visible
229 absorption spectra of Buf1 and the Buf1^{CysIISer+CysIIISer} variant. Consistent with the presence of
230 aromatic heterocycles (28), the spectrum of the former showed a broad absorbance peak
231 extending to 310 nm, unlike that of the latter (Fig. 3C). The spectrum of recombinant Buf2
232 similarly showed an absorbance maximum around 305 nm (*SI* Fig. S13).

233

234 ***PTM identification by NMR.*** To increase the yield of bufferin for structural elucidation by
235 NMR, we co-expressed *bufA1* encoding an N-terminal His₆-SUMO-tag with *bufB1* and *bufC1*
236 in *E. coli*. Purification of modified BufA1 followed by trypsin digestion and preparative HPLC
237 allowed the preparation of the Cys^{II}- and Cys^{III}-containing 19-mer peptide at a milligram scale
238 (*SI* Fig. S14). Of note, this peptide was not cleaved by trypsin after Lys24 that immediately
239 follows Cys^{II}, suggesting that the PTM on Cys^{II} somehow impacts the recognition of this Lys

240 residue. The ^1H spectrum of the 19-mer peptide indicated two groups of anomalous resonances
241 (*SI Fig. S15*). By combining homonuclear ROESY and TOCSY experiments (29), they were
242 assigned to the amide protons of Lys24 and Ala32 that follow the modified Cys^{II} and Cys^{III}
243 residues, respectively, and to the H α protons of Asp22 and Ser30 that precede them (Fig. 3D).
244 Further analysis of these spectra showed the absence of both H α and NH protons for the
245 modified Cys residues. The absence of the latter was verified on a natural abundance ^1H , ^{15}N
246 HSQC spectrum (*SI Fig. S15*). These data suggest that their N and C α atoms are part of
247 heterocycles.

248 A ^1H , ^{13}C HSQC experiment showed correlations from the Asp22 and Ser30 H α atoms to
249 their own C α carbons at 48.1 and 52.4 ppm, respectively, 6 ppm higher than their random coil
250 values (30). The ^1H , ^{13}C HMBC spectrum connected the same H α protons to carbon atoms at
251 161.1 and 159.8 ppm, respectively (*SI Fig. S15*). We produced a uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled
252 modified BufA1 molecule in *E. coli* and used its central tryptic peptide to obtain further carbon
253 assignments on the basis of triple-resonance NMR experiments (31, 32). In the HNCACB
254 experiment, we found no resonances that could correspond to upstream neighbors for Lys24 or
255 Ala32, confirming that the C α carbons of modified Cys^{II} and Cys^{III} do not resonate at the typical
256 50-ppm value expected for Cys residues (Fig. 3E). In a HNCOC experiment starting from the
257 amide groups of Lys24 or Ala32, we found values around 184 ppm for the C=O carbon atoms
258 of both modified Cys residues (Fig. 3F), far from 175-ppm and 200-ppm values expected for
259 such atoms in random-coil and thio-amide peptides, respectively (33-36). By increasing the
260 resolution and varying the offset of the decoupling pulse during the C=O evolution period, we
261 determined a 90-Hz coupling constant of both carbonyls with carbon atoms whose chemical
262 shift is ~ 120 ppm, consistent with their absence in the HNCACB experiment (Fig. 3G). Both
263 parameters point to the C=O carbon atoms of the modified Cys residues connected to carbon
264 atoms in aromatic rings (37).

265 Comparisons of the chemical shifts assigned on the modified BufA1 peptide with those
266 found for a 5-thioxazole-containing peptide (28) showed the same 6-ppm up-field shift of the
267 C α carbon of the preceding residue, the presence of similar carbon resonances at 120 and 160
268 ppm, and the 90-Hz coupling constant of the following carbonyl towards an aromatic ring
269 carbon. Together with the MS data and the characteristic spectrophotometric spectrum (28),
270 we conclude that the Buf1 modification implies cyclization of its central Cys residues to form
271 thioxazole groups (Fig. 3H; *SI Fig. S16*).

272
273 ***Copper binding by bufferin 1.*** Since heterocycles can be involved in copper binding (38), we
274 interrogated if bufferins can complex with copper, which could be the basis for their protective
275 effect. We first investigated complex formation *in vivo* by treating cultures of *bufIABCD*-
276 expressing bacteria with CuSO₄ prior to bufferin purification. Native MS analysis showed that
277 purified Buf1 thus produced was fully loaded with copper, with a 1:1 stoichiometry (Fig. 4A).
278 When *E. coli* producing Buf1^{str} was exposed to a mixture of metals, native MS analysis of the
279 purified peptide identified the Buf1-Cu²⁺ complex, showing that the bufferin is selective for
280 copper (*SI Fig. S17*).

281 To gain insight into the mode of binding, we performed pulsed electron paramagnetic
282 resonance (EPR) spectroscopy, X-ray absorption (XAS) spectroscopy and NMR experiments.
283 EPR spectra confirmed the stoichiometry and showed that Buf1 binds Cu²⁺. The spectrum of
284 the complex could be well reproduced by simulations involving 4 N atoms or 2 S and 2 N atoms
285 in the first sphere of coordination of Cu²⁺ (39) (Fig. 4B; *SI Figs. 18 and 19 and Tables S2 to*
286 *S4*). For the XAS experiments on the bufferin-Cu²⁺ complex (Fig. 4C) a good fit of the
287 experimental data was obtained using a model with 2 N and 2 S atoms in the first coordination
288 shell (*SI Table S5 and Supplemental text*). By contrast, alternative models not including S atoms

289 led to an unsatisfactory agreement between simulated and experimental data, leading us to
290 discard the 4 N model.

291 To gain further insight into the binding site, we produced a ^{15}N , ^{13}C -labeled Buf1 sample
292 and recorded triple resonance spectra to assign its resonances. Simultaneously, we used the ^1H ,
293 ^{15}N HSQC plane as a basis for HSQC-NOESY and TOCSY experiments to confirm the
294 assignments and gain some knowledge on structural aspects of Buf1. The sequential assignment
295 was interrupted by the modified Cys residues, as expected. Amide resonances of the tryptic
296 peptide and of the same segment in the full-length bufferin did not correspond at all, suggesting
297 that the full-length sequence imposes structural constraints on the thiooxazole-containing loop.
298 Part of these likely come from the β sheet spanning two short strands in the structural model,
299 Thr9-Tyr13 and Trp44-Lys48 (*SI Fig. S1*), that we confirmed experimentally through the strong
300 $\text{H}\alpha(i-1) - \text{HN}(i)$ NOE contacts between residues in these segments and the cross-strand NOE
301 contacts between the amide protons of Lys45 and Cys12, and of Val47 and Glu10, respectively
302 (*SI Fig. S20*). Further analyses of the NOE spectrum also showed the characteristic amide $i/i+1$
303 proton contacts that characterize the short predicted α helix (*SI Fig. S20*). PTMs of the Cys^{II}
304 and Cys^{III} residues hence do not interfere with the predicted 3D structure. We confirmed that
305 Buf1 contains stable secondary structure by performing a Hydrogen/Deuterium exchange
306 experiment. Labeled Buf1 was lyophilized from phosphate buffer and dissolved back in D_2O .
307 After one hour a TOCSY spectrum showed remaining protons of the β strand (*SI Fig. S21*).
308 Amide protons of the first β strand comprising Cys12 hardly exchanged at all, whereas
309 exchange was more pronounced for residues in the rest of the protein. This points to the β sheet
310 as the major secondary structure element conferring stability to the bufferin.

311 A comparison of the spectra of Buf1 produced with or without copper showed many peaks
312 unchanged, some experiencing a shift and a signal reduction, and yet others disappearing
313 altogether (*Fig. 4D*). The latter most probably concern residues close to the paramagnetic Cu^{2+}

314 ion. In particular, disappearance of the peaks corresponding to direct neighbors of the
315 heterocycles, such as Lys24, Ser30 and Ala32, supports the model that the thiooxazoles are
316 involved in Cu²⁺ coordination. Interestingly, signals of Thr9, Trp44, Met46 and Lys48 predicted
317 on the β -sheet face oriented towards the thiooxazole-containing loop also disappeared,
318 indicating that residues of the β sheet may also contribute to the binding of copper.

319 Finally, we determined the binding affinities of Buf1 for Cu²⁺ and Cu⁺ by performing
320 spectrophotometric competition assays as described (40). A K_D value of $\sim 6 \times 10^{-15}$ M was
321 determined for the formation of a Buf1-Cu²⁺ complex (SI Fig. S22). Using anaerobic conditions
322 with Cu⁺, we determined a K_D value of $\sim 7 \times 10^{-20}$ M for the Buf1-Cu⁺ complex. Buf1 can thus
323 chelate both ions, with greater affinity for the more toxic Cu⁺ species (41).

324

325 ***BufB1 and BufC1 are required for post-translational modification of bufferin 1.*** To dissect
326 the role of individual *buf* genes, we constructed C_V_{buf1} derivatives that lack one or several genes
327 and tested their growth phenotypes in the presence of CuSO₄. All deletion strains except for
328 that lacking *bufD1* (*doxX*) displayed slow-growth phenotypes, showing that BufA1, BufB1 and
329 BufC1, but not DoxX, are required for the function (Fig. 5A). LC-MS analysis confirmed that
330 Buf1 is produced in the absence of the latter, indicating that DoxX is not necessary for installing
331 PTMs (SI Fig. S23).

332 To reveal the role of BufB1 and BufC1 in the bufferin maturation, we reconstituted the
333 modification reaction *in vitro* using the purified proteins (SI Fig. S24). Since MNIO enzymes
334 require Fe^{II} and Fe^{III} ions for activity (9, 12), purified BufB1 was first analyzed by inductively
335 coupled plasma - optical emission spectrometry, showing the presence of two Fe ions per BufB1
336 molecule. LC-MS analyses of the *in vitro* reactions showed that BufA1 was converted to a
337 species with a -8 Da mass shift only when BufB1 and BufC1 were present (Fig. 5B). This mass
338 shift corresponds to a species with two PTMs (-4 Da each) and lacking the S-S bond, due to the

339 high concentration of reducing agent used in the *in vitro* assay. Indeed, trypsin digestion of thus
340 modified BufA1 yielded the 19-residue peptide harboring two thiooxazole groups as confirmed
341 by MS/MS analyses (Fig. 5C). Together with the gene inactivation data, these experiments
342 established that BufB1 and BufC1 are required and sufficient to install the PTMs on BufA1.

343

344 ***The Sec signal peptide is dispensable for heterocycle formation.*** A notable feature of bufferin
345 biosynthesis is that the precursor peptide harbors a predicted Sec signal peptide, which is rare
346 in bacterial RiPPs precursors. As shown by the MS data, the sequences of the bufferins are
347 derived from cleavage of their BufA precursor at the predicted signal-peptidase cleavage site.
348 To confirm the function of the BufA1 Sec signal peptide, we fused it to leaderless β -lactamase
349 (Bla), which becomes enzymatically active only after export to the periplasm. As a control, the
350 first 7 residues of the BufA1 were also fused to Bla (SI Fig. S25). *C. vibrioides* expressing the
351 BufA1 signal peptide-Bla fusion displayed high levels of enzymatic activity in a
352 spectrophotometric assay, unlike bacteria producing the control fusion, although both chimeric
353 proteins were detected by immunoblotting (SI Fig. S25).

354 To determine if the signal peptide also acts as a leader peptide required for Cys
355 transformation we used the SUMO-*bufA1/bufB1/bufC1* *E. coli* co-expression system. The
356 *bufA1* gene was mutated to generate variant precursors with the signal peptide truncated eight
357 residues from the N-terminus (BufA1(-8 aa)) or completely removed (BufA1(CP)). Subsequent
358 LC-MS analysis of purified BufA1 after SUMO-tag cleavage indicated that both truncated
359 precursors were still modified with a -10 Da shift, consistent with the presence of two
360 thiooxazoles and one S-S bond (Fig. 5D). Thus, upon overexpression of the system without
361 export of the bufferin, the Sec signal peptide is dispensable for PTMs, indicating that precursor
362 recognition involves at least part of the core peptide. Nevertheless, this does not rule out the

363 need for a leader sequence in natural conditions, which might partially overlap with the Sec
364 signal peptide.

365

366 **Discussion**

367 Here we report a new bacterial strategy for copper homeostasis based on the synthesis of
368 periplasmic RiPP metallophores. Incidentally, we also solved the conundrum of the gold-
369 induced genes found in environmental and pathogenic bacteria (14-16). Bufferins form a new
370 RiPP family with original features and a new function. We showed that they harbor a rare
371 modification, 5-thiooxazole, installed by an MNIO enzyme. With thousands of homologs,
372 bufferins are highly prevalent in bacteria and represent the largest family of MNIO-modified
373 RiPPs.

374 The biosynthesis of bufferins involves unique features. To our knowledge they are the first
375 RiPPs known to exploit Sec signals for efficient translocation to the periplasm in the native
376 producer. The presence of signal peptides in other RiPP systems were recently reported, namely
377 chryseobasins and oxazolins (7, 42), however these natural products were produced in a
378 heterologous host. Peptides with bulky modifications or macrocycles would be poor substrates
379 of the Sec machinery due to the pore size of SecY (43). Although bufferins harbor an S-S bond
380 formed macrocycle, it is most likely installed in the oxidizing periplasmic environment after
381 export. The use of ‘generalist’ systems, Sec and signal-peptidase, for export and proteolytic
382 maturation is a new paradigm in the RiPP field.

383 The precursors and mature forms of bufferins are large compared to those of most RiPPs.
384 Our structural analyses indicated that Buf1 contains stable secondary structure and is therefore
385 a small protein rather than a peptide. In addition, our *in-silico* analyses identified larger
386 bufferin-like precursors of more than 200 residues with numerous Cys residues and large

387 predicted core sequences that might be called ‘RiPProteins’. Thus, the bufferin family appears
388 to harbor a continuum ranging from modified peptides to *bona fide* proteins.

389 The conversion of Cys to 5-thiooxazole represents a new reaction catalyzed by MNIOs,
390 further highlighting their chemical versatility. This rare PTM has been reported thus far only
391 once in a natural product, catalyzed by a radical-SAM enzyme (28). Intense efforts have been
392 made recently to explore the chemical space of MNIO-catalyzed transformations (7, 8, 11, 13,
393 44). In line with previous work on Cys-modifying MNIO enzymes, BufB would similarly make
394 use of the mixed-valent iron center and proceed by an intermediate step of proton abstraction
395 from the C β of cysteine (9, 10, 12, 13) (*SI Fig. S26*).

396 We demonstrated that model bufferins are involved in copper homeostasis by complexing
397 with the metal in the periplasm. Notably, *in vivo* formation of the bufferin-Cu²⁺ complex most
398 likely occurs while the unfolded bufferin emerges from the Sec machinery in the periplasm and
399 folds around copper. This novel function for RiPPs contrasts with that of other MNIO-modified
400 metallophores, methanobactins, a phylogenetically restricted family of RiPPs which essentially
401 scavenge copper ions in the extracellular milieu for its provision to cuproprotein clients (45-
402 48). The bufferin can bind both copper species, with greater affinity for the more toxic Cu⁺ ion,
403 and copper binding involves the thiol groups of the thiooxazole cycles as well as N atoms. The
404 defensive role of bufferins is reminiscent of those of non-ribosomal peptides, anthrochelin and
405 yersiniabactin (49, 50). The putative multiple metal binding sites of large bufferins lead us to
406 speculate that some of them might serve as intracellular metal reservoirs or contribute to
407 transport of copper for disposal or storage. We believe that future studies on this large, diverse
408 family might also unveil roles for bufferins in the homeostasis of other transition metals.

409 Copper is a major metal pollutant from anthropic sources (51, 52), and bufferins represent
410 a previously unknown but highly prevalent mechanism of bacterial adaptation likely relevant
411 in the environment, agriculture and healthcare. In *C. vibrioides*, their expression is induced at

412 high copper concentrations, suggesting that they come into play after other defense systems are
413 overwhelmed. Genetic determinants that provide environmental species with protection against
414 transition metals can contribute to the emergence of opportunistic pathogens (53), as
415 exemplified by *Legionella pneumophila* which harbors up to six bufferin BGCs. Bufferins are
416 most likely beneficial to bacteria in host-pathogen interactions notably in phagosomal
417 compartments (26, 41, 54), which might account for their presence notably in *Bordetella*
418 *pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa*. From
419 a more applied perspective, it should be possible in the long term to engineer bufferin variants
420 for bioremediation purposes (3).

421

422 **Materials and methods**

423 ***Genetic constructs and growth conditions.*** Construction details, plasmids, recombinant strains,
424 primers and synthetic genes are described in *SI Text* and Tables S6 to S8, respectively.

425 ***Functional experiments.*** *C. vibrioides* growth curves were recorded using a TECAN Spark
426 plate reader, with OD₆₀₀ measurements every 20 min. Gain-of-function experiments were
427 performed in *E. coli* expressing the *buf1* operon under the control of an IPTG-inducible
428 promoter. The bacteria were challenged with 0.3 mM CuSO₄ for 4 hours in M9 medium (Cu²⁺
429 challenge), or with 2.7 mM CuSO₄ and 2 mM ascorbate in microaerobic conditions for 2 hours
430 in 2YT medium (Cu⁺ challenge). For the predation experiments, *Dictyostelium discoideum* was
431 placed at the center of bacterial lawns before incubation at 20°C for three days, and the densities
432 of bacteria in the contact zones were determined with ImageJ. Experimental details are in *SI*
433 *Text*.

434 ***Bufferin production and purification.*** For Buf1 or Buf2 production in *C. vibrioides*, strains
435 harboring the pSigF plasmid were grown overnight in PYE medium containing 100 μM IPTG,
436 and the bufferins were purified on Streptactin or Ni-NTA columns using standard procedures.

437 Production of isotopically labeled Buf1 was performed in *E. coli* BL21. For the *in vitro* assays,
438 N-His₆-SUMO-BufA1, N-His₆-BufB1 and N-His₆-BufC1 were produced in BL21(DE3),
439 purified on Ni-NTA columns, with 10 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride added
440 to all buffers for BufA1. Production of the tryptic peptide for NMR studies was performed in
441 BL21(DE3) co-expressing Sumo-BufA1, BufB1 and BufC1. The iron content of His₆-BufB1
442 was measured using an inductively coupled plasma - optical emission spectrometer (ICP-OES
443 5110 VDV, Agilent Technologies). Experimental details are provided in *SI Text*.

444 **Peptide analyses by MS.** All experimental details are given as *SI text*.

445 **NMR analyses.** The central tryptic peptide was purified by preparative HPLC. All NMR spectra
446 were recorded at 293 K on an 800-MHz NEO Bruker spectrometer equipped with a QCP
447 cryogenic probe head. Experimental details are in *SI Text*.

448 **EPR experiments.** Pulsed EPR experiments were performed on the Buf1^{twstr}-copper complex
449 using an ELEXSYS E-580 spectrometer (Bruker). Experimental details are in *SI Text*.
450 Numerical simulation of the spectra was conducted using the Matlab toolbox Easyspin 5.2.36.

451 **XAS experiments.** XAS data on the Buf1^{str}-copper complex were acquired at the European
452 Synchrotron Radiation Facility. Details on the experiments and simulations are provided in *SI*
453 *Text*.

454 **Spectrophotometric copper binding assays.** This was performed as described (40). Details are
455 in *SI text*.

456 **Enzymatic assays in vitro.** Purified His-SUMO-BufA1 was digested with SUMO protease
457 before adding either or both N-His₆-BufB1 and N-His₆-BufC1. After incubation the mixtures
458 were analyzed by LC-MSMS. β -lactamase assays were performed using spectrophotometry,
459 with nitrocefin as a substrate. Details are presented as *SI Text*.

460 **In silico analyses.** The search for putative bufferin precursors and the SSN analyses are detailed
461 in *SI Text*.

462

463 **Acknowledgments.** We thank E. Lesne and G. Roy for initiating this work long ago, J.-M.
464 Saliou for preliminary MS analyses, J.-Y. Matroule and P. Cherry for providing *C. vibrioides*
465 strains, plasmids and protocols, and P. Faller for helpful discussions. This project was funded
466 by the ANR grant CuRiPP (ANR-22-CE44-0001-02) to FJD. L. Leprevost and S. Jünger were
467 supported by PhD fellowships of Lille University and of the French Ministry of Education (ED
468 227 MNHN-SU), respectively. S. Dubiley was supported as a Visiting Scientist by a fellowship
469 of the Collège de France. We thank the NMR facility of MetaToul (www.metatoul.fr). Metatoul
470 is part of the French National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics MetaboHUB-
471 AR-11-INBS-0010 (www.metabohub.fr), and is supported by the Région Midi-Pyrénées, the
472 ERDF, the SICOVAL and the French Minister of Education & Research, who are all gratefully
473 acknowledged. The LC-MS data were acquired at the MNHN bioorganic mass spectrometry
474 platform and the PAPPSO platform (<http://pappso.inra.fr/en>). For the EPR experiments the
475 financial support from the IR INFRANALYTICS FR2054 is acknowledged. ICP-OES
476 measurements were performed by V. Alaimo on the Chevreul Institute Platform (U-Lille /
477 CNRS). The Region Hauts de France and the French government are acknowledged for funding
478 this apparatus. We thank the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) for provision of
479 synchrotron radiation facilities under proposal number LS-3308 and Olivier Proux for
480 assistance and support in using Beamline BM16 (FAME-UHD).

481

482

483 **References**

- 484 1. P. G. Arnison et al., Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural
485 products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* **30**, 108-160 (2013).
- 486 2. Y. Li, S. Rebuffat, The manifold roles of microbial ribosomal peptide-based natural products in
487 physiology and ecology. *J Biol Chem* **295**, 34-54 (2020).

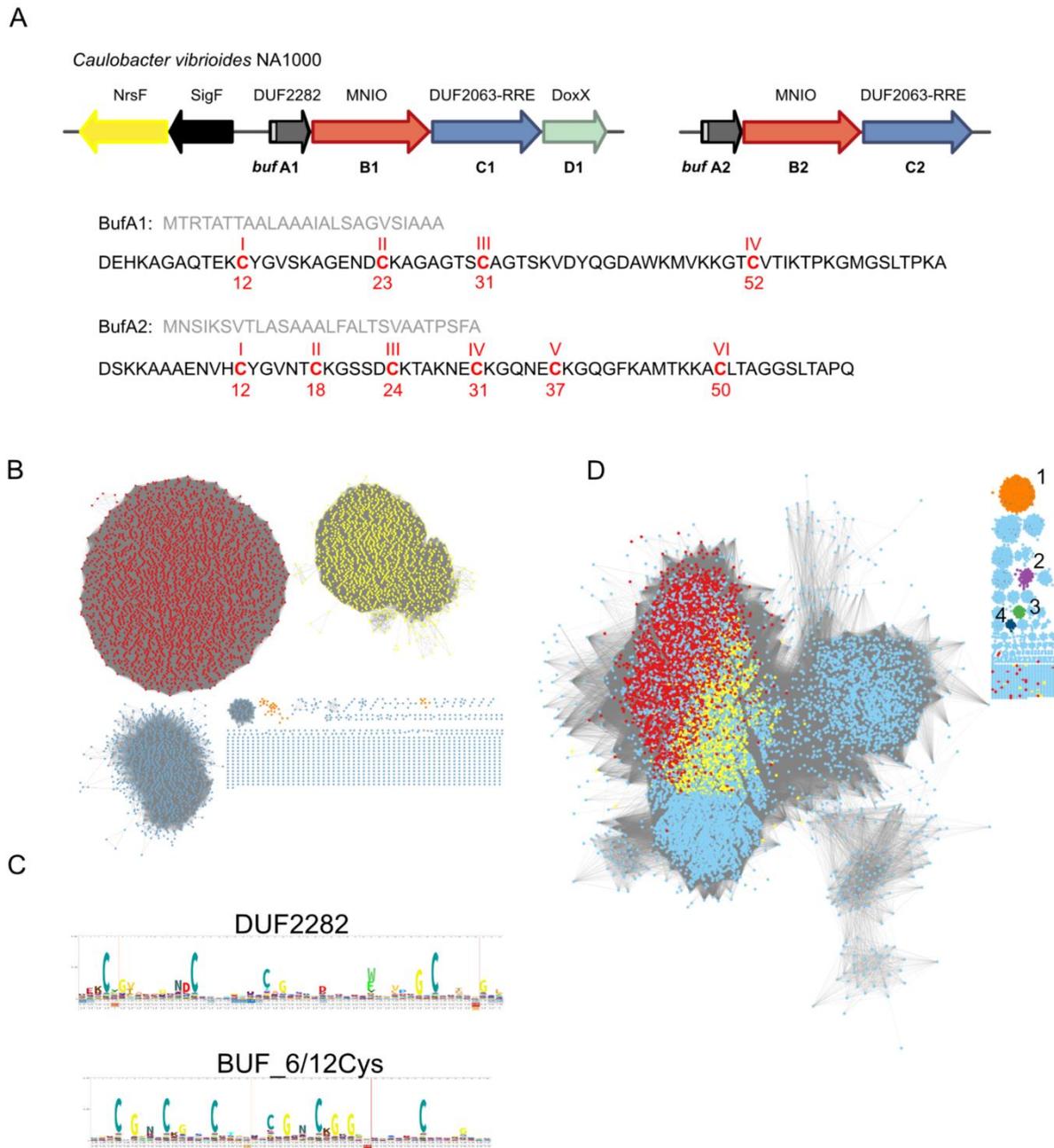
- 488 3. M. Montalban-Lopez et al., New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering.
489 *Nat Prod Rep* **38**, 130-239 (2021).
- 490 4. B. J. Burkhart, G. A. Hudson, K. L. Dunbar, D. A. Mitchell, A prevalent peptide-binding domain
491 guides ribosomal natural product biosynthesis. *Nat Chem Biol* **11**, 564-570 (2015).
- 492 5. J. R. Chekan, C. Ongpipattanakul, S. K. Nair, Steric complementarity directs sequence promiscuous
493 leader binding in RiPP biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 24049-24055 (2019).
- 494 6. A. M. Kloosterman, K. E. Shelton, G. P. van Wezel, M. H. Medema, D. A. Mitchell, RRE-Finder:
495 a Genome-Mining Tool for Class-Independent RiPP Discovery. *mSystems* **5** (2020).
- 496 7. R. S. Ayikpoe, L. Zhu, J. Y. Chen, C. P. Ting, W. A. van der Donk, Macrocyclization and Backbone
497 Rearrangement During RiPP Biosynthesis by a SAM-Dependent Domain-of-Unknown-Function 692. *ACS*
498 *Cent Sci* **9**, 1008-1018 (2023).
- 499 8. V. T. Chioti, K. A. Clark, J. G. Ganley, E. J. Han, M. R. Seyedsayamdost, N-Calpha Bond Cleavage
500 Catalyzed by a Multinuclear Iron Oxygenase from a Divergent Methanobactin-like RiPP Gene Cluster. *J*
501 *Am Chem Soc* 10.1021/jacs.3c11740 (2024).
- 502 9. C. Dou et al., Crystal structure and catalytic mechanism of the MbnBC holoenzyme required for
503 methanobactin biosynthesis. *Cell Res* **32**, 302-314 (2022).
- 504 10. G. E. Kenney et al., The biosynthesis of methanobactin. *Science* **359**, 1411-1416 (2018).
- 505 11. D. T. Nguyen et al., Biosynthesis of macrocyclic peptides with C-terminal beta-amino-alpha-keto
506 acid groups by three different metalloenzymes. *ACS Central Science* 10.1021/acscentralsci.4c00088 (2024).
- 507 12. Y. J. Park et al., A mixed-valent Fe(II)Fe(III) species converts cysteine to an oxazolone/thioamide
508 pair in methanobactin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2123566119 (2022).
- 509 13. C. P. Ting et al., Use of a scaffold peptide in the biosynthesis of amino acid-derived natural
510 products. *Science* **365**, 280-284 (2019).
- 511 14. K. Jwanoswki et al., The *Legionella pneumophila* GIG operon responds to gold and copper in
512 planktonic and biofilm cultures. *PLoS One* **12**, e0174245 (2017).
- 513 15. C. Kohler, R. F. Lourenco, G. M. Avelar, S. L. Gomes, Extracytoplasmic function (ECF) sigma
514 factor sigmaF is involved in *Caulobacter crescentus* response to heavy metal stress. *BMC Microbiol* **12**, 210
515 (2012).
- 516 16. N. Wiesemann et al., Influence of copper resistance determinants on gold transformation by
517 *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Bacteriol* **195**, 2298-2308 (2013).
- 518 17. L. Maertens, P. Cherry, F. Tilquin, R. Van Houdt, J. Y. Matroule, Environmental Conditions
519 Modulate the Transcriptomic Response of Both *Caulobacter crescentus* Morphotypes to Cu Stress.
520 *Microorganisms* **9** (2021).
- 521 18. L. Coutte et al., Combined RNAseq and ChIPseq Analyses of the BvgA Virulence Regulator of
522 *Bordetella pertussis*. *mSystems* **5** (2020).
- 523 19. A. T. Tveit et al., Widespread soil bacterium that oxidizes atmospheric methane. *Proc Natl Acad Sci*
524 *U S A* **116**, 8515-8524 (2019).
- 525 20. N. Hirth et al., Full Copper Resistance in *Cupriavidus metallidurans* Requires the Interplay of Many
526 Resistance Systems. *Appl Environ Microbiol* **89**, e0056723 (2023).
- 527 21. E. Severi, G. H. Thomas, Antibiotic export: transporters involved in the final step of natural
528 product production. *Microbiology (Reading)* **165**, 805-818 (2019).
- 529 22. F. H. Müller et al., Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction:
530 characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol* **53**, 1147-
531 1160 (2004).

- 532 23. S. Nambi et al., The Oxidative Stress Network of Mycobacterium tuberculosis Reveals
533 Coordination between Radical Detoxification Systems. *Cell Host Microbe* **17**, 829-837 (2015).
- 534 24. V. Waschulin et al., Biosynthetic potential of uncultured Antarctic soil bacteria revealed through
535 long-read metagenomic sequencing. *ISME J* **16**, 101-111 (2022).
- 536 25. C. E. Alvarez-Martinez, R. L. Baldini, S. L. Gomes, A Caulobacter crescentus extracytoplasmic
537 function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. *J Bacteriol* **188**, 1835-
538 1846 (2006).
- 539 26. X. Hao et al., A role for copper in protozoan grazing - two billion years selecting for bacterial
540 copper resistance. *Mol Microbiol* **102**, 628-641 (2016).
- 541 27. G. Prunier et al., Fast alignment of mass spectra in large proteomics datasets, capturing
542 dissimilarities arising from multiple complex modifications of peptides. *BMC Bioinformatics* **24**, 421 (2023).
- 543 28. J. K. Lewis et al., New Role for Radical SAM Enzymes in the Biosynthesis of Thio(seleno)oxazole
544 RiPP Natural Products. *Biochemistry* **60**, 3347-3361 (2021).
- 545 29. K. Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids* (Wiley, New York, 1986).
- 546 30. D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, 1H, 13C and 15N random coil
547 NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J Biomol*
548 *NMR* **5**, 67-81 (1995).
- 549 31. M. Sattler, Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of
550 proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **34**, 93-158 (1999).
- 551 32. T. Yamazaki, W. Lee, C. H. Arrowsmith, D. R. Muhandiram, L. E. Kay, A Suite of Triple Resonance
552 NMR Experiments for the Backbone Assignment of 15N, 13C, 2H Labeled Proteins with High Sensitivity.
553 *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11655-11666 (1994).
- 554 33. D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, (1)H, (13)C and (15)N random
555 coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J Biomol*
556 *NMR* **5**, 332 (1995).
- 557 34. K. E. Fiore et al., Structural impact of thioamide incorporation into a beta-hairpin. *RSC Chem Biol*
558 **3**, 582-591 (2022).
- 559 35. O. D. Hensens, G. Albers-Schönberg, Total structure of the peptide antibiotic components of
560 thiopeptin by 1H and 13C. *Tetrahedron Lett* **19**, 3649-3652 (1978).
- 561 36. H. O. Kalinowski, H. Kessler, Correlation of the 13C-NMR chemical shifts of carbonyl and
562 thiocarbonyl groups. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **13**, 90-91 (1974).
- 563 37. V. Wray, "Progress in NMR Spectroscopy". (1979), vol. 13, pp. 177-256.
- 564 38. G. E. Kenney, A. C. Rosenzweig, Chalkophores. *Annu Rev Biochem* **87**, 645-676 (2018).
- 565 39. B. Bennett, J. M. Kowalski, EPR Methods for Biological Cu(II): L-Band CW and NARS. *Methods*
566 *Enzymol* **563**, 341-361 (2015).
- 567 40. L. Novoa-Aponte, C. Xu, F. C. Soncini, J. M. Arguello, The Two-Component System CopRS
568 Maintains Subfemtomolar Levels of Free Copper in the Periplasm of Pseudomonas aeruginosa Using a
569 Phosphatase-Based Mechanism. *mSphere* **5** (2020).
- 570 41. K. S. Chaturvedi, J. P. Henderson, Pathogenic adaptations to host-derived antibacterial copper.
571 *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 3 (2014).
- 572 42. O. M. Manley et al., A multi-iron enzyme installs copper-binding oxazolone/thioamide pairs on a
573 nontypeable Haemophilus influenzae virulence factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **121**, e2408092121 (2024).

- 574 43. F. Bonardi et al., Probing the SecYEG translocation pore size with preproteins conjugated with
575 sizable rigid spherical molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7775-7780 (2011).
- 576 44. K. A. Clark, M. R. Seyedsayamdost, Bioinformatic Atlas of Radical SAM Enzyme-Modified RiPP
577 Natural Products Reveals an Isoleucine-Tryptophan Crosslink. *J Am Chem Soc* **144**, 17876-17888 (2022).
- 578 45. A. A. DiSpirito et al., Methanobactin and the Link between Copper and Bacterial Methane
579 Oxidation. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**, 387-409 (2016).
- 580 46. G. E. Kenney, A. C. Rosenzweig, Methanobactins: Maintaining copper homeostasis in
581 methanotrophs and beyond. *J Biol Chem* **293**, 4606-4615 (2018).
- 582 47. Y. Li et al., Discovery and biosynthesis of tricyclic copper-binding ribosomal peptides containing
583 histidine-to-butyrine crosslinks. *Nat Commun* **14**, 2944 (2023).
- 584 48. J. D. Semrau, A. A. DiSpirito, P. K. Obulisamy, C. S. Kang-Yun, Methanobactin from
585 methanotrophs: genetics, structure, function and potential applications. *FEMS Microbiol Lett* **367**, fnaa045
586 (2020).
- 587 49. H. Büttner, J. Hörl, J. Krabbe, C. Hertweck, Discovery and biosynthesis of anthrochelin, a growth-
588 promoting metallophore of the human pathogen *Luteibacter anthropi*. *ChemBioChem* **24**, e202300322 (2023).
- 589 50. E. I. Koh, A. E. Robinson, N. Bandara, B. E. Rogers, J. P. Henderson, Copper import in
590 *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. *Nat Chem Biol* **13**, 1016-1021 (2017).
- 591 51. B. M. Staehlin, J. G. Gibbons, A. Rokas, T. V. O'Halloran, J. C. Slot, Evolution of a Heavy Metal
592 Homeostasis/Resistance Island Reflects Increasing Copper Stress in Enterobacteria. *Genome Biol Evol* **8**, 811-
593 826 (2016).
- 594 52. Z. Yu, L. Gunn, P. Wall, S. Fanning, Antimicrobial resistance and its association with tolerance to
595 heavy metals in agriculture production. *Food Microbiol* **64**, 23-32 (2017).
- 596 53. C. Baker-Austin, M. S. Wright, R. Stepanauskas, J. V. McArthur, Co-selection of antibiotic and
597 metal resistance. *Trends Microbiol* **14**, 176-182 (2006).
- 598 54. J. R. Sheldon, E. P. Skaar, Metals as phagocyte antimicrobial effectors. *Curr Opin Immunol* **60**, 1-9
599 (2019).

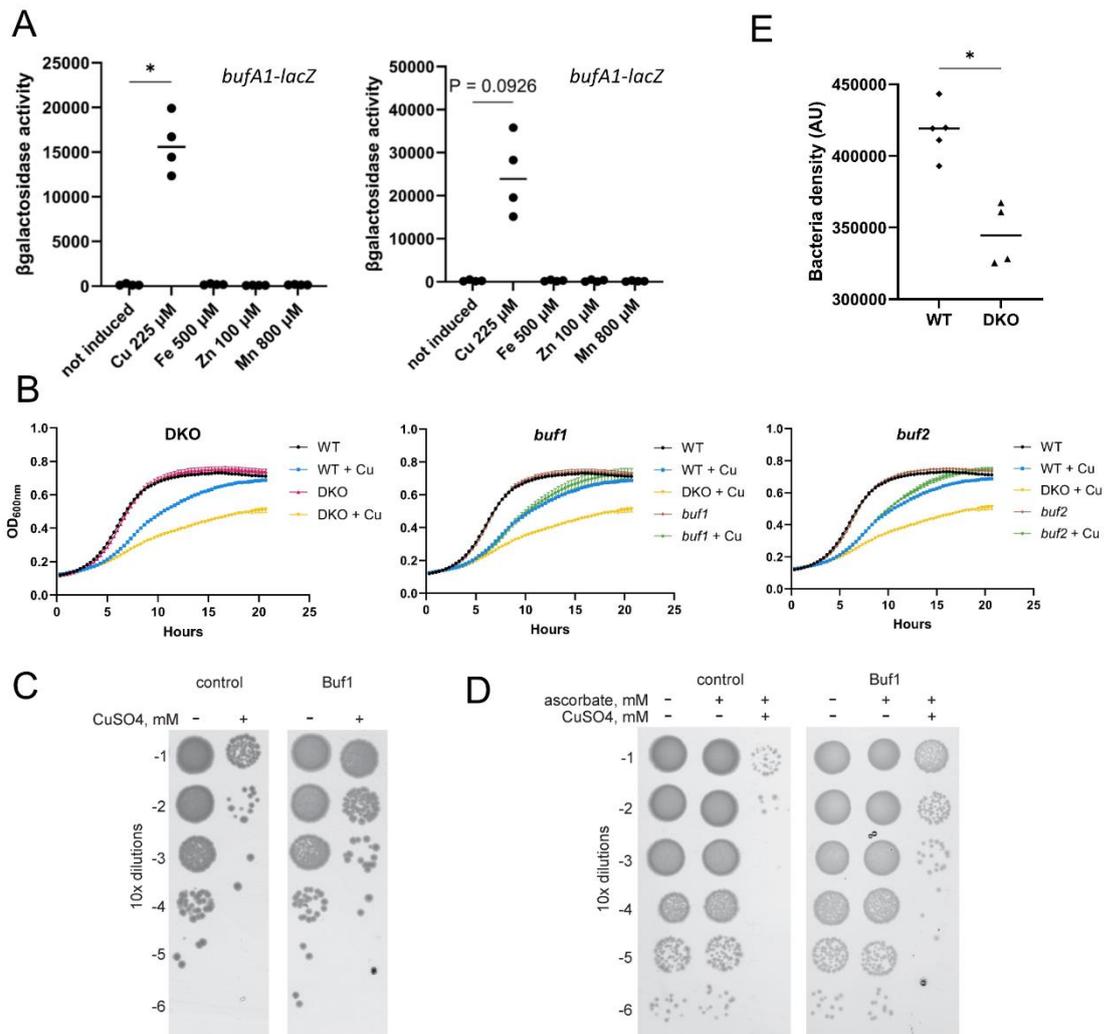
600

601 **Figures**



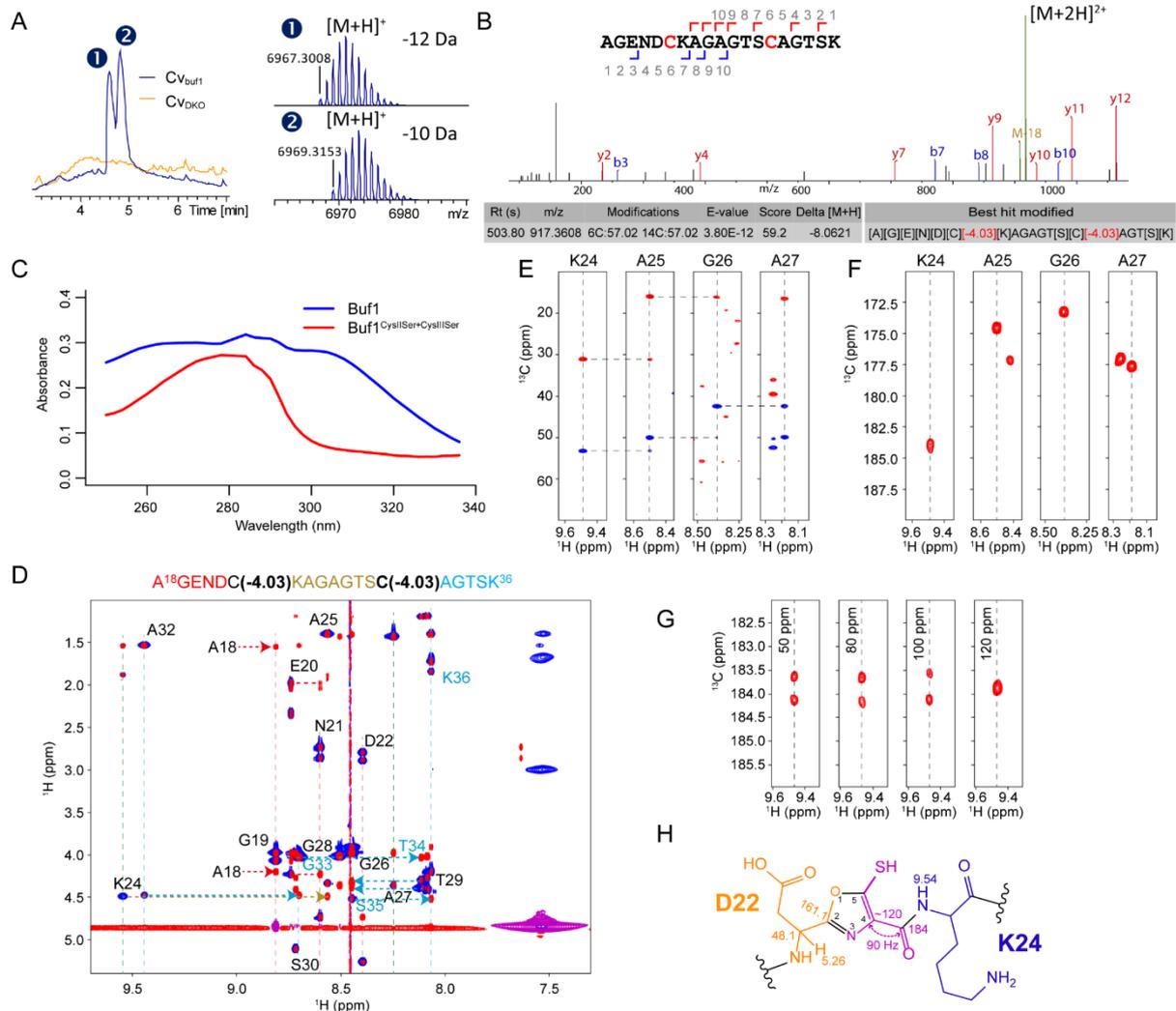
602
 603 **Figure 1. *In silico* analyses of the bufferin family.** A. Gene composition of the *buf1* and *buf2* BGCs
 604 and sequences of BufA1 and BufA2 with the Cys residues labeled (numbering according to the core
 605 peptides). The signal peptide and core peptide sequences are in pale and dark grey, respectively. In the
 606 vicinity of *buf1ABCD* are genes coding for SigF and the anti-sigma factor NrsF that regulate *buf1* and
 607 *buf2* expression. B. SSN analysis of bufferin-like precursors genetically associated with MNIOs.
 608 DUF2282 and BUF_6/12Cys proteins, including BufA1 and BufA2 of *C. vibrioides*, belong to the
 609 largest two clusters (red and yellow dots), respectively. Small clusters in orange contain chryseobasins
 610 (7) that are predicted to harbor signal peptides. C. Weblogos for the DUF2282 and BUF_6/12Cys

611 bufferins. **D.** SSN analysis of MNIOs (at 80% identity). MNIOs genetically associated with DUF2282
 612 and BUF_6/12Cys proteins, including BufB1 and BufB2 of *C. vibrioides*, are in red and yellow,
 613 respectively. MNIOs associated with PTMS on methanobactins, chryseobasins, TglA-type pearlins and
 614 aminopyruvatides are found in small clusters numbered 1 to 4.
 615



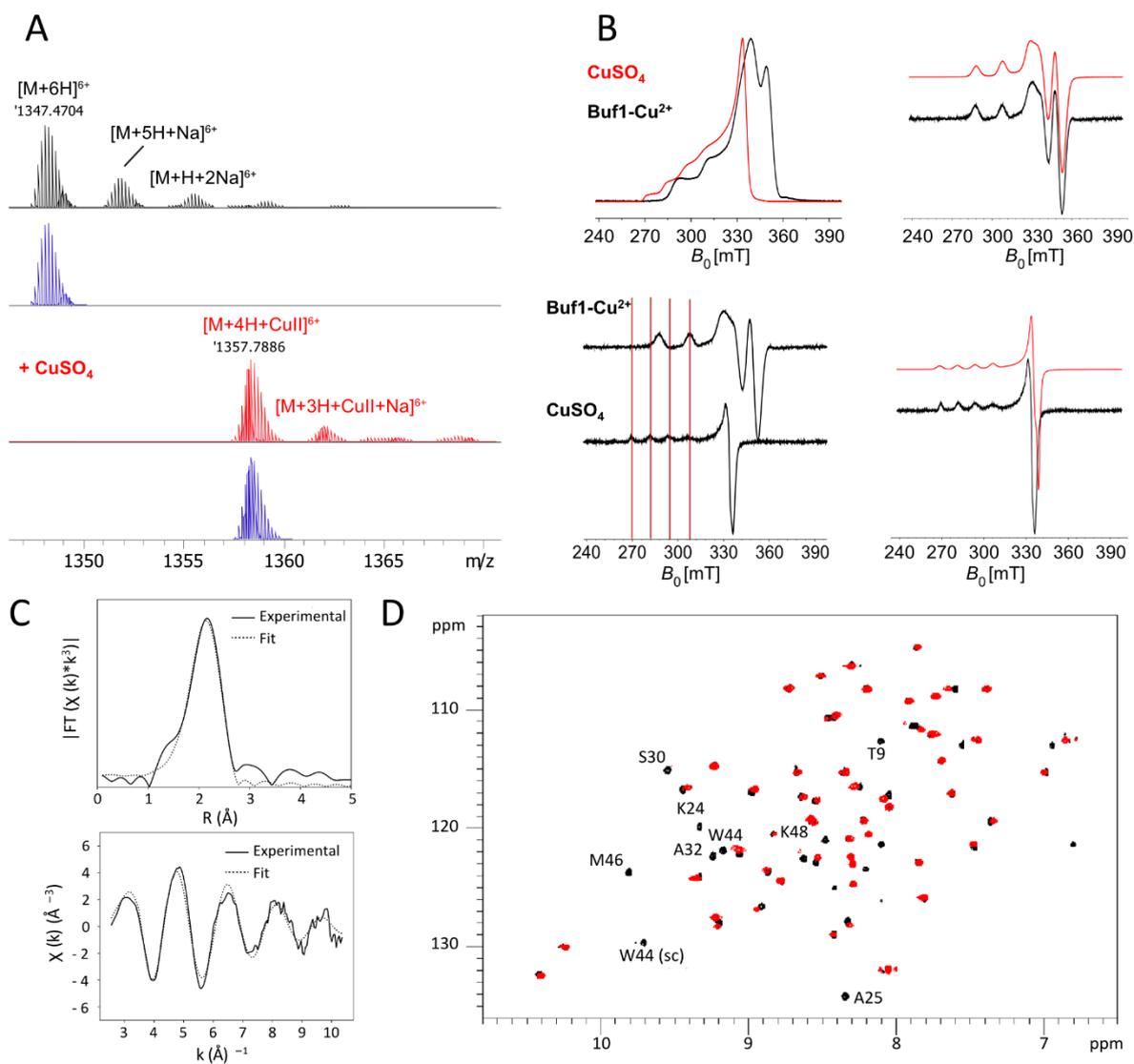
616
 617 **Figure 2. Regulation and function of the bufferins.** **A.** Reporter assays with *bufA1-lacZ* and *bufA2-*
 618 *lacZ* transcriptional fusions. Bacteria were grown for 16 h with the indicated concentrations of CuSO₄,
 619 FeSO₄, ZnSO₄ or MnCl₂. Non-parametric, one-way analysis of variance Kruskal-Wallis (two-sided) test
 620 followed by a Dunn's multiple-comparison tests were used to analyze the differences between treated
 621 cultures and the control (n=4; * in the upper left graph indicates p=0.047). **B.** Effect of copper on
 622 bacterial growth. The C_V_{DKO}, C_V_{buf1ABCD} (*buf1*) and C_V_{buf2ABC} (*buf2*) strains were grown without or with

623 225 μM CuSO_4 . In **C**, expression of *buf1* in *E. coli* BL21(pCA24-buf1A^{str}BCD) grown in minimal
 624 medium was induced by IPTG, and the bacteria were challenged with 0.3 mM CuSO_4 for three hours
 625 before serial dilutions. BL21(pCA24-psmCA) expressing a non-relevant RiPP BGC was used as a
 626 control. In **D**, expression of *buf1* in *E. coli* BL21(pCA24-buf1A^{str}BCD) grown in rich medium was
 627 induced by IPTG, followed by 2 h in microaerobic conditions with CuSO_4 and Cu^{2+} -reducing ascorbate
 628 as indicated, before serial dilutions. The control was as in **C**. **E**. Assay of bacterial lysis by *D. discoïdum*.
 629 Bacterial densities in the zones of contact were determined using ImageJ analyses. A non-parametric
 630 Mann-Whitney test (two-sided) was used to analyze the differences between the Cv_{WT} strain (n=5) and
 631 the Cv_{DKO} strain (n=4; * indicates $p = 0.0159$). The medians are shown.
 632



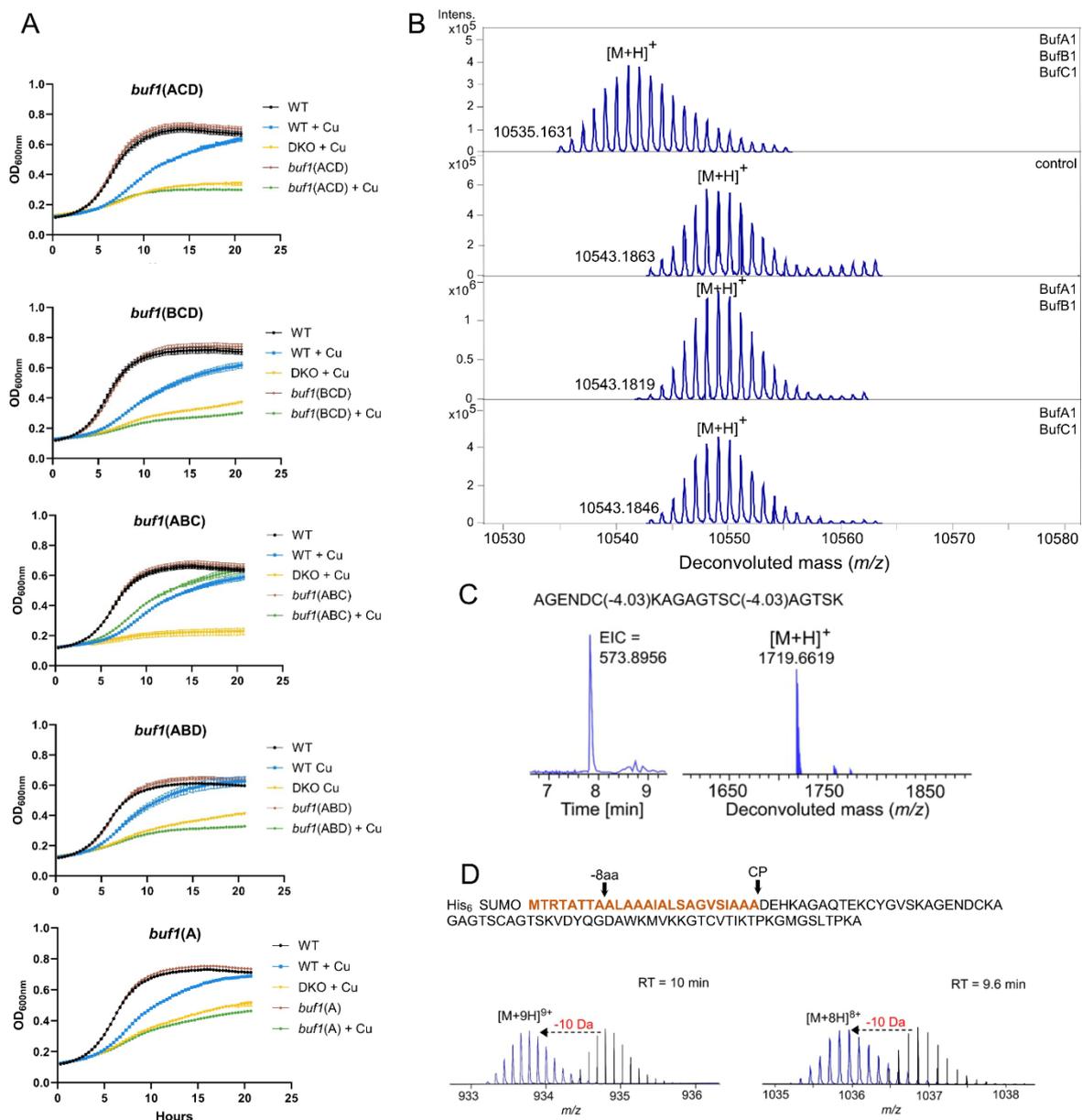
634 **Figure 3. Post-translational modifications of bufferin 1.** **A.** Top-down LC-MS analyses of cell
635 extracts of C_V^{buf1}(pSigF) compared with C_V^{DKO}(pSigF). Left panel: total ion chromatograms, right
636 panels: deconvoluted mass spectra of the compounds detected for C_V^{buf1}(pSigF). Their Mw correspond
637 to the core peptide (*i.e.*, without signal peptide; calculated monoisotopic Mw=6978.35 Da), with mass
638 shifts of -10 Da ([M+H]⁺ at *m/z* 6969.32) and -12 Da ([M+H]⁺ at *m/z* 6967.30). **B.** Bottom-up analysis
639 of Buf1. MS/MS spectrum of the central tryptic peptide ([M+2H]²⁺ at *m/z* 917.36). The two Cys residues
640 carry carbamidomethyl groups resulting from alkylation with iodoacetamide (+ 57.02 Da), together with
641 -4.03 Da mass shifts. **C.** UV/vis spectra of affinity-purified Buf1 and the Cys^{II}Ser+Cys^{III}Ser mutant. **D.**
642 NMR ROESY/TOCSY experiments to assign the resonances of the 19-mer peptide. **E.** HNCACB
643 experiment on the uniformly ¹³C, ¹⁵N-labeled peptide: sequential walk for the sequence following Cys^{II}.
644 **F.** The HNCO planes at the ¹⁵N frequency of the indicated residues show classical ~175-ppm values for
645 all carbonyl resonances, except for that downstream of a modified Cys, whose carbonyl carbon resonates
646 at 184 ppm. **G.** HNCO planes through the resonance of Lys24 that follows Cys^{II} while modifying the
647 offset of the ¹³C decoupling pulse during the C=O evolution period. Only when centered at 120 ppm is
648 the 90-Hz carbon-carbon coupling refocused. **H.** Measured NMR parameters and proposed structure for
649 the Buf1 post-translational modifications (shown for Cys^{II}).

650



651
 652 **Figure 4. Analyses of the bufferin 1-copper complex formed *in vivo*.** **A.** Native MS analysis of the
 653 purified complex: isotopic patterns of the major charge state (6+) species. The spectra in black and red
 654 show Buf1 from a non-supplemented culture and from cultures supplemented with CuSO₄, respectively.
 655 The calculated isotopic patterns for [M+6H]⁶⁺ and [M+4H+CuII]⁶⁺ species are shown underneath. **B.**
 656 Evidence for Cu²⁺ binding to Buf1 by EPR spectroscopy. Spectra of Echo-Detected Field-Swept of
 657 CuSO₄ (red) and of the Buf1-Cu²⁺ complex (black) are shown with the pseudo-modulation of the spectra
 658 underneath. The right panels show the Easypin fits (red) and the experimental spectra (black) for the
 659 Buf1-Cu²⁺ complex (top) and for CuSO₄ (bottom). **C.** Experimental and fitted EXAFS spectra of the
 660 Buf1-Cu²⁺ complex (upper panel), and corresponding Fourier transforms (lower panel). **D.**

661 Superposition of the ^1H , ^{15}N HSQC spectra of apo Buf1 (black) and the Buf1- Cu^{2+} complex (red). sc =
 662 side chain.
 663



664

665 **Figure 5. Biosynthesis of bufferin 1.** **A.** Effect of Cu on the growth of *C. vibrioides* strains expressing
 666 the indicated genes. **B.** *In vitro* reconstitution of Buf1 biosynthesis. The deconvoluted mass spectra for
 667 the products of the *in vitro* reactions are shown, with the added proteins indicated in the corresponding
 668 panels. Heat-denatured BufB1 and BufC1 were used for the control reaction. **C.** LC-MS analysis of the
 669 19-residue peptide of *in vitro* modified SUMO-Buf1. The extracted ion chromatogram (EIC) of

670 $[M+3H]^{3+}$ (at m/z 573.8945) and the deconvoluted mass are shown. **D.** Role of the signal peptide for the
671 PTMs. A schematic representation of BufA1 variants with signal peptide truncations is shown on top.
672 LC-MS analyses of modified BufA1(-8 aa) (left) and modified BufA1(CP) (right): the MS spectra of
673 the most abundant charge states $[M+9H]^{9+}$ and $[M+8H]^{8+}$, corresponding to deconvoluted monoisotopic
674 masses $[M+H]^+$ of 8391.1281 and 8277.9398 (blue), respectively, are compared to the theoretical spectra
675 of the unmodified peptides (black)

More than 40 families of RiPPs, ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, have been identified. In particular, bacterial RiPPs involving MNIO enzymes (multinuclear non-heme iron-dependent oxidative enzymes) constitute a fast-expanding group. MNIO enzymes are involved in the biosynthesis of various types of RiPPs, where they catalyze unusual and chemically diverse modifications, generally on cysteine residues. A new class of RiPPs involving a subfamily of MNIO enzymes, which we have called «bufferins», has been the subject of this thesis. Bufferins harbour conserved Cys residues. In addition, they have original features, notably the large size of their precursors and the presence of Sec-dependent N-terminal signal peptides, which are unusual among bacterial RiPPs.

We have characterized two model bufferins in the environmental bacterium *Caulobacter vibrioides*. We discovered that these bufferins belong to the largest two families of RiPPs modified by MNIO enzymes, and that they are prevalent in several bacterial phyla. It has been reported in the literature that the *C. vibrioides* bufferin operons are regulated by copper. Copper is an essential metal used for its redox properties in various biological processes including respiration. It is also toxic in excess because it causes oxidative stress, inactivates some proteins, and thus it plays a role in host-pathogen interactions. Bacteria have therefore developed finely regulated mechanisms of copper homeostasis. Our work allowed to identify a role in the protection against copper for the bufferins of *C. vibrioides*, which represents an original strategy of adaptation to excess copper. We showed that the bufferins chelate copper in both oxidation states. This work has also revealed a new modification catalyzed by MNIO enzymes. The conserved cysteines of bufferins are modified into thiooxazole heterocycles, a rare modification in natural products and essential for the function of the members of this new family of RiPPs. Finally, we have initiated the characterization of the biogenesis of the bufferins in *C. vibrioides*. The presence of a signal-peptide necessarily impacts their biogenesis, as bufferins are modified in the cytoplasm before their export. Our preliminary results indicate that recognition of the bufferin precursor by the MNIO enzyme and its partner involves several regions of the precursor including the signal peptide, which may delay export to allow installation of the post-translational modifications.

Intriguingly, we could not establish that the bufferin produced by *Bordetella pertussis*, a human respiratory pathogen, is involved in protection against copper. This suggests that the functions of bufferins might depend on the lifestyles of the producing bacteria. Its role in *B. pertussis* remains to be elucidated.

Plus de 40 familles de RiPPs, des produits naturels peptidiques synthétisés par voie ribosomale et modifiés post-traductionnellement, ont été identifiées à ce jour. En particulier, les RiPPs bactériens impliquant des enzymes MNIO (multinuclear non-heme iron-dependent oxidative enzymes) constituent un groupe en pleine expansion. Les enzymes MNIO sont impliquées dans la biosynthèse de divers types de RiPPs où ils catalysent des modifications chimiques très inhabituelles et diverses, fréquemment sur des résidus cystéine. Une nouvelle classe de RiPPs impliquant une sous-famille d'enzymes MNIO, que nous avons appelée « bufferines », a fait l'objet de ces travaux de thèse. Les bufferines possèdent des cystéines conservées. Elles présentent aussi des propriétés originales, notamment la grande taille de leurs précurseurs et la présence de peptides signaux N-terminaux Sec-dépendants, qui sont inhabituelles parmi les RiPPs bactériens.

Nous avons caractérisé deux bufferines modèles chez la bactérie environnementale *Caulobacter vibrioides*. Nous avons découvert que ces bufferines font partie des deux plus grandes familles de RiPPs modifiées par des enzymes MNIO, largement répandues dans différents phyla bactériens. Des travaux antérieurs rapportés dans la littérature avaient montré une régulation par le cuivre des opérons de biosynthèse des bufferines chez *C. vibrioides*. Le cuivre est un métal essentiel utilisé pour ses propriétés d'oxydo-réduction dans divers processus biologiques dont la respiration. Il est également toxique en excès car il cause indirectement du stress oxydant, inactive certaines protéines et joue ainsi un rôle dans les interactions hôte-pathogène. Les bactéries ont donc développé des mécanismes très bien régulés d'homéostasie du cuivre. Nos travaux ont permis d'identifier le rôle des deux bufferines produites par *C. vibrioides* pour la protection contre un excès de cuivre, ce qui représente une stratégie d'homéostasie originale. Nous avons montré que les bufferines chélatent le cuivre dans ses deux états d'oxydation. Nos travaux ont aussi permis de mettre en évidence une nouvelle modification catalysée par les enzymes MNIO. Les cystéines conservées des bufferines sont modifiées en hétérocycles thiooxazole, une modification rare dans les produits naturels et essentielle pour la fonction des membres de cette nouvelle famille de RiPPs. Enfin, nous avons commencé à caractériser la biogenèse des deux bufferines de *C. vibrioides*. La présence de peptides-sigaux N-terminaux conditionne nécessairement la biogenèse des bufferines, qui sont modifiées dans le cytoplasme avant leur export. Nos premiers résultats indiquent que la reconnaissance du précurseur de bufferine par l'enzyme MNIO et son partenaire implique plusieurs régions du précurseur, dont le peptide signal, ce qui pourrait retarder l'export pour permettre la mise en place des modifications post-traductionnelles.

De façon intrigante, nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle de la bufferine produite par *Bordetella pertussis*, un pathogène respiratoire humain, dans la protection contre le cuivre. Ceci suggère que les bufferines pourraient exercer différentes fonctions selon le style de vie des bactéries productrices. Son rôle chez *B. pertussis* reste à élucider.