



HAL
open science

Etude du chaperon moléculaire Hsp90 chez la bactérie modèle *Shewanella oneidensis*

Flora Honore

► **To cite this version:**

Flora Honore. Etude du chaperon moléculaire Hsp90 chez la bactérie modèle *Shewanella oneidensis*. Biochimie, Biologie Moléculaire. 2017. hal-01623417

HAL Id: hal-01623417

<https://ephe.hal.science/hal-01623417>

Submitted on 25 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté et soutenu publiquement par

Flora HONORÉ

Soutenu le 24 octobre 2017

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Étude du chaperon moléculaire Hsp90 chez la bactérie
modèle *Shewanella oneidensis***

Devant le jury suivant :

M. Thierry DUPRESSOIR	–	Président
M. Olivier GENEST	–	Tuteur scientifique
M ^{me} Laurence MATHIEU	–	Tuteur pédagogique
M ^{me} Patricia BORDES	–	Rapporteur
M ^{me} Marika MIOT	–	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Olivier GENEST

Équipe « Réponses Adaptatives des Bactéries » dirigée par Vincent MÉJEAN

Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines

Directeur : Dr. Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI

CNRS-UMR 7281

Et de Dr. Laurence MATHIEU

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement

Directeur : Dr. Alain WALCARIUS

CNRS-UMR 7564

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté et soutenu publiquement par

Flora HONORÉ

Soutenu le 24 octobre 2017

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Étude du chaperon moléculaire Hsp90 chez la bactérie
modèle *Shewanella oneidensis***

Devant le jury suivant :

M. Thierry DUPRESSOIR	–	Président
M. Olivier GENEST	–	Tuteur scientifique
M ^{me} Laurence MATHIEU	–	Tuteur pédagogique
M ^{me} Patricia BORDES	–	Rapporteur
M ^{me} Marika MIOT	–	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Olivier GENEST

Équipe « Réponses Adaptatives des Bactéries » dirigée par Vincent MÉJEAN

Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines

Directeur : Dr. Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI

CNRS-UMR 7281

Et de Dr. Laurence MATHIEU

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement

Directeur : Dr. Alain WALCARIUS

CNRS-UMR 7564

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	2
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. La protéine chaperon Hsp90	6
1. Introduction générale sur les chaperons.....	6
2. Dynamique conformationnelle d’Hsp90	7
2.1 Structure d’Hsp90.....	7
2.2 Changements conformationnels et cycle d’Hsp90.....	8
2.3 Importance de l’ATP pour la fonction d’Hsp90	9
3. Hsp90 chez les eucaryotes	9
3.1 Physiologie.....	9
3.2 Rôle dans les cancers.....	10
3.3 Collaboration avec les co-chaperons.....	10
4. Hsp90 chez les procaryotes	11
4.1 Phénotypes associés à la mutation d’Hsp90	11
4.2 Interaction d’Hsp90 avec ses clients	12
4.3 Implication d’Hsp90 dans la virulence.....	13
II. <i>Shewanella oneidensis</i> , une nouvelle bactérie modèle pour l’étude des protéines chaperons	15
1. Historique	15
2. Génétique	15
3. Morphologie et physiologie	15
4. Environnement et capacités d’adaptation	15
5. Pathogénicité.....	16
6. Biotechnologie.....	16
7. Présence de protéines chaperons	17
PARTIE EXPERIMENTALE	18
I. Recherche de phénotypes du mutant $\Delta hsp90_{So}$	20
1. Construction du mutant de délétion du gène <i>hsp90</i> chez <i>S. oneidensis</i> ($\Delta hsp90_{So}$)	20
1.1 Amplification par PCR des régions encadrant le gène <i>hsp90</i> _{So}	20
1.2 Préparation de cellules compétentes et transformation du plasmide chez <i>E. coli</i>	22
1.3 Conjugaison et premier événement de recombinaison homologue	23
1.4 Deuxième événement de recombinaison	24
2. Croissance du mutant $\Delta hsp90_{So}$ dans différentes conditions de stress.	24

3.	Construction du plasmide <i>phsp90₅₀</i> permettant de produire Hsp90 ₅₀ <i>in vivo</i>	26
4.	Inhibition de la croissance de la souche sauvage en présence d'inhibiteurs d'Hsp90.....	27
II.	Etude de mutants ponctuels dans les régions fonctionnelles d'Hsp90 ₅₀	29
1.	Mutagenèse dirigée sur Hsp90 ₅₀	29
2.	Etude du mutant Hsp90 ₅₀ E34A.....	30
2.1	Production des protéines Hsp90 ₅₀ et Hsp90 ₅₀ E34A	31
a.	Clonage du gène <i>hsp90₅₀</i> dans le vecteur pET24b	31
b.	Vérification de la surproduction de la protéine 6His Hsp90 ₅₀	32
c.	Culture des cellules de <i>S. oneidensis</i> et préparation des extraits de la protéine 6His Hsp90 ₅₀	32
d.	Purification de 6His Hsp90 ₅₀ par chromatographie d'affinité	33
e.	Dessalage de la protéine 6His Hsp90 ₅₀ purifiée	33
f.	Dosage des protéines	34
2.2	Mesure de l'activité ATPase	34
3.	Etude du mutant Hsp90 ₅₀ W476R-L563A	35
III.	Recherche de protéines clientes du chaperon Hsp90 ₅₀	37
1.	Construction d'une banque plasmidique permettant la surproduction des protéines de <i>S. oneidensis</i>	37
1.1	Digestion partielle du chromosome de <i>S. oneidensis</i>	37
1.2	Suppression du 2 ^{ème} site de restriction BamHI du pBAD33.....	38
1.3	Obtention de clones après digestion, ligation et transformation.....	38
2.	Utilisation de la banque plasmidique pour identifier des protéines clientes de Hsp90 ₅₀	39
2.1	Sélections de clones en conditions de stress sur milieu gélosé	39
2.2	Isolement de plasmides et séquençage	39
2.3	Clonage du gène identifié : le gène <i>tilS</i>	39
IV.	Etude de la protéine TilS, un client du chaperon Hsp90 ₅₀ à haute température	41
1.	Introduction sur la protéine TilS.....	41
2.	Test d'activité de la protéine TilS <i>in vivo</i> en absence d'Hsp90 ₅₀	41
3.	Etude de la quantité de TilS en absence d'Hsp90 ₅₀ à haute température	43
4.	Etude des interactions <i>in vivo</i> entre la protéine Hsp90 ₅₀ et la protéine cliente TilS.....	45
4.1	Interaction en double hybride bactérien	45
a.	Protocole expérimental.....	46
b.	Interprétation des résultats	46
4.2	Co-purification de Hsp90 ₅₀ par CBP-TilS.....	47
a.	Protocole expérimental.....	47
b.	Interprétation des résultats	48

5. Rôle de Hsp90 _{so} dans la protection de l'agrégation de TiIS	48
5.1 Obtention de la protéine purifiée TiIS.....	48
5.2 Expérience de « light scattering »	49
5.3 Interprétation des résultats	49
5.4 Vérification de la conformation de la protéine mutante Hsp90 _{so} W476R-L563A.....	49
V. YbbN un co-chaperon putatif d'Hsp90 _{so}	51
1. Introduction sur la protéine YbbN.....	51
2. Interaction <i>in vivo</i> entre Hsp90 _{so} et YbbN.....	51
3. Interaction <i>in vitro</i> entre Hsp90 _{so} et YbbN.....	52
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	53
I. Vers une meilleure compréhension du fonctionnement de Hsp90 chez les bactéries.....	54
II. Vers la découverte d'autres protéines clientes de Hsp90 _{so}	58
III. Hsp90 _{so} , une protéine solitaire ou œuvrant avec d'autres chaperons et co-chaperons ?.....	61
IV. Conclusion scientifique.....	63
V. Conclusion personnelle	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64
ANNEXES.....	71

ABREVIATIONS

A	Ampère
aa	Acide aminé
ADP	Adénosine-diphosphate
ATP	Adénosine-triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Sérum albumine bovin
CBP	Peptide de liaison à la calmoduline
Da	Dalton
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
<i>g</i>	Unité d'accélération
HEPES	2-[4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-yl]éthanesulfonic acide
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LDH	Lactate déshydrogénase
ONPG	O-nitrophényl- β -D-galactoside
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEP	Phosphoénolpyruvate
PK	Pyruvate kinase
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
SDS	Dodécylsulfate de sodium
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UV	Ultra-violet
V	Volt
WT	Sauvage (Wild Type)
Δ	Délétion d'un gène

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Tableau 1 : Exemple de protéines chaperons de la famille des « Heat shock proteins » (Hsp).

Tableau 2 : Souches utilisées lors de cette étude.

Tableau 3 : Caractéristiques des gènes et des protéines correspondantes de *S. oneidensis* utilisés lors de cette étude.

Figure 1 : Modèle schématique montrant l'implication des protéines chaperons au cours de la synthèse, du repliement, de l'agrégation et de la dégradation des protéines.

Figure 2 : Structures et organisation en domaines de la protéine Hsp90.

Figure 3 : Cycle de l'ATPase de la protéine chaperon Hsp90 eucaryote en présence de différents co-chaperons permettant l'activation et le bon repliement de la protéine cliente.

Figure 4 : Structure de Hsp90 d'*E. coli* en conformation fermée, montrant des résidus importants pour l'hydrolyse de l'ATP (E34) et la liaison aux protéines clientes (W467 et L553).

Figure 5 : Planisphère associant les différentes souches du genre *Shewanella* à leur lieu de découverte.

Figure 6 : Photographie d'une cellule de *Shewanella oneidensis* observée par microscopie électronique à transmission sur laquelle on peut observer la présence du flagelle.

Figure 7 : Schéma résumant les buts, les approches et les principaux résultats obtenus au cours de cette étude.

Figure 8 : Représentation schématique de la technique permettant la délétion du gène *hsp90_{so}* par recombinaison homologue chez *S. oneidensis*.

Figure 9 : Amplifications par PCR pour la délétion du gène *hsp90_{so}*.

Figure 10 : Amplifications par PCR des 5 clones CC118λpir/pKNG101-insert(A+B).

Figure 11 : Représentation schématique de la technique employée lors de l'étape de conjugaison (premier événement de recombinaison homologue) ainsi que lors de la seconde étape de recombinaison pour permettre la délétion d'un gène.

Figure 12 : Amplifications par PCR pour vérifier l'excision du plasmide sur le chromosome de *S. oneidensis*.

Figure 13 : Recherche de conditions de stress pour observer un phénotype de la souche $\Delta hsp90_{so}$ à 28°C.

Figure 14 : Croissance de la souche sauvage ou $\Delta hsp90_{so}$ en anaérobiose à 28°C.

Figure 15 : Recherche d'une température stressante pour observer un phénotype de la souche $\Delta hsp90_{so}$ à différentes températures, en milieu liquide ou solide.

Figure 16 : Amplifications par PCR pour le clonage du gène *hsp90_{So}* dans le pBAD33.

Figure 17 : Amplifications par PCR des 5 clones C600/*phsp90_{So}*.

Figure 18 : La souche Δ *hsp90_{So}/phsp90_{So}* est capable de pousser à 35°C.

Figure 19 : Inhibition de la croissance de la souche sauvage à 38°C en présence de geldanamycine et de radiciol en milieu liquide.

Figure 20 : Représentation schématique de la méthode utilisée pour engendrer une mutation dirigée sur un plasmide.

Figure 21 : La production des protéines mutantes Hsp90_{So} E34A et Hsp90_{So} W476R-L563A ne permet pas de restaurer le phénotype de croissance à 35°C de la souche Δ *hsp90_{So}*.

Figure 22 : La protéine Hsp90_{So} est surproduite en même quantité dans la souche sauvage que dans les souches Δ *hsp90_{So}/phsp90_{So}*, Δ *hsp90_{So}/phsp90_{So}E34A* et Δ *hsp90_{So}/phsp90_{So}W476R-L563A*.

Figure 23 : Amplifications par PCR pour la construction du plasmide pET24 6His Hsp90_{So}.

Figure 24 : Amplifications par PCR des 5 clones BL21(DE3)/pET24 6His Hsp90_{So}.

Figure 25 : Surproduction de la protéine 6His Hsp90_{So}.

Figure 26 : Visualisation de la protéine 6His Hsp90_{So} après purification sur colonne d'affinité HisTrap.

Figure 27 : La protéine mutante Hsp90_{So}E34A ne possède pas d'activité ATPase.

Figure 28 : Digestion partielle du chromosome de *S. oneidensis*.

Figure 29: Représentation schématique pour identifier les protéines permettant de rétablir la croissance de la souche Δ *hsp90_{So}/p* à 35°C lorsqu'elles sont surproduites grâce à la banque plasmidique.

Figure 30 : Sélection des colonies de la souche Δ *hsp90/p(banque)* pouvant pousser à 35°C.

Figure 31 : Représentation schématique des gènes présents dans les plasmides identifiés avec la banque plasmidique.

Figure 32 : Les plasmides de la banque plasmidique permettent de restaurer la croissance de la souche Δ *hsp90_{So}* à 35°C.

Figure 33 : La présence du gène *tis* dans la souche Δ *hsp90_{So}* permet de restaurer la croissance à 35°C en présence d'arabinose.

Figure 34 : Représentation schématique du rôle de la protéine Tis, modification de l'ARNt^{Met} en ARNt^{Ile}.

Figure 35 : Représentation schématique de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique de Tis *in vivo*.

Figure 36 : Mesure des activités β -galactosidase *in vivo*; l'activité de Tis est diminuée en absence de Hsp90_{So} à 34°C.

Figure 37 : Mesure des activités β -galactosidase *in vivo*; la surproduction de la protéine TiIS restaure la diminution de l'activité β -galactosidase mesurée en absence de Hsp90_{S_o}.

Figure 38 : La protéine TiIS est dégradée en absence de Hsp90_{S_o} à 34°C.

Figure 39 : La protéine TiIS est dégradée dans la souche sauvage en présence de radicicol à 34°C.

Figure 40 : Les protéines Hsp90_{S_o} et TiIS interagissent *in vivo* par double hybride bactérien.

Figure 41 : La protéine Hsp90_{S_o} est co-purifiée avec CBP-TiIS.

Figure 42 : Visualisation de la protéine TiIS 6His avant et après la purification sur colonne d'affinité HisTrap.

Figure 43 : La protéine Hsp90_{S_o} empêche l'agrégation de la protéine TiIS à 42°C par une expérience de « light scattering ». La protéine mutante Hsp90_{S_o}W476R-L563A perd cette capacité.

Figure 44 : Les profils de digestion ménagée à la trypsine des protéines Hsp90_{S_o} WT et Hsp90_{S_o} W476R-L563A sont identiques.

Figure 45 : Représentation schématique des gènes *hsp90_{S_o}* et *ybbN* de *S. oneidensis*.

Figure 46 : Les protéines Hsp90_{S_o} et YbbN interagissent *in vivo* par double hybride bactérien.

Figure 47 : Interaction *in vitro* par pontage chimique: les protéines Hsp90_{S_o} et YbbN interagissent.

Figure 48 : Représentation schématique de 3 plasmides ne contenant pas le gène *tiIS* et obtenus à partir de la banque plasmidique présente dans la souche Δ *hsp90_{S_o}* après sélection à 35°C.

Figure 49 : Représentation schématique de la collaboration de Hsp90_{EC} avec le système DnaK lors de la réactivation de substrats inactifs.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

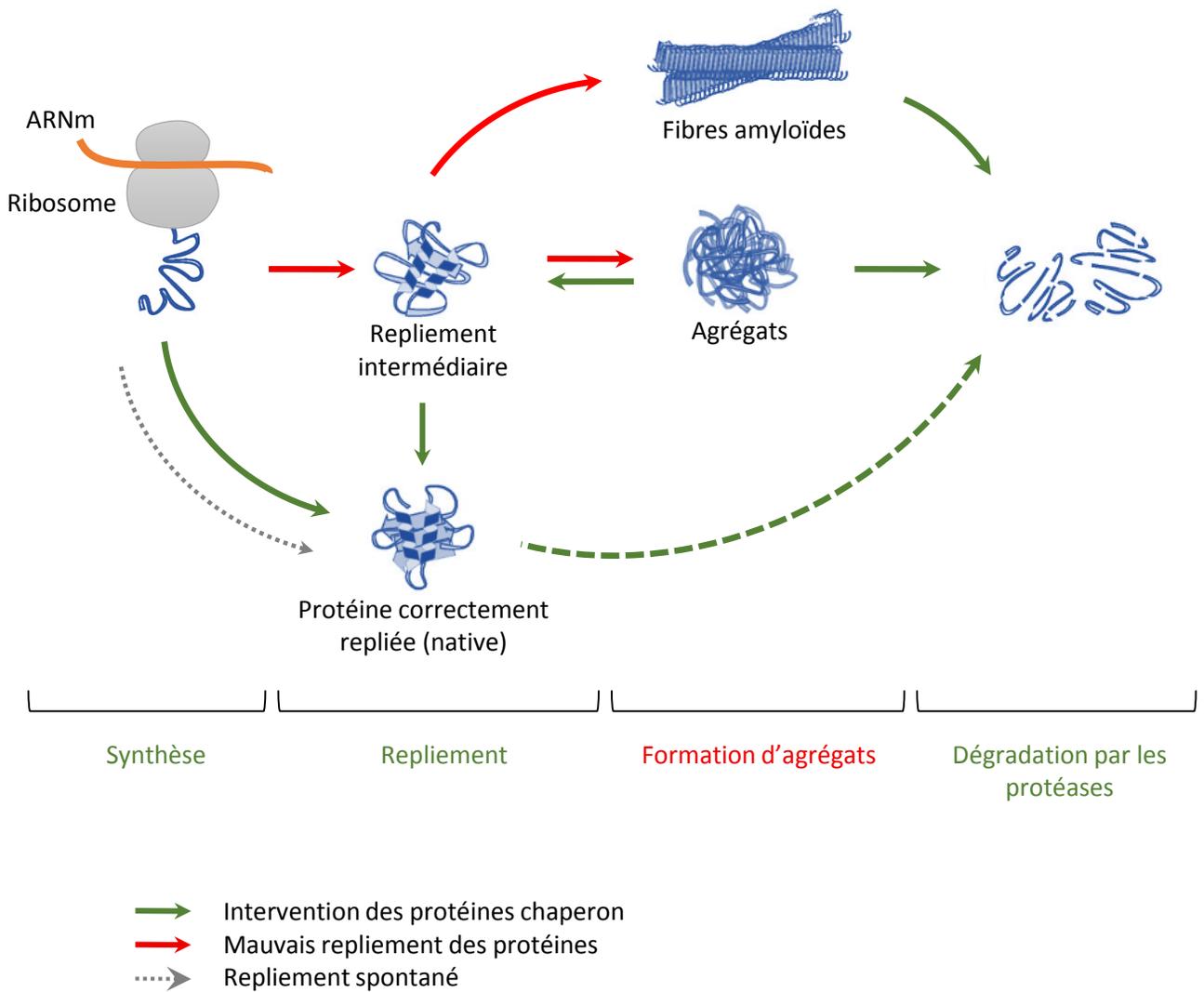


Figure 1 : Modèle schématique montrant l'implication des protéines chaperons au cours de la synthèse, du repliement, de l'agrégation et de la dégradation des protéines.

D'après Balchin *et al.*, 2016

I. La protéine chaperon Hsp90

1. Introduction générale sur les chaperons

La machinerie cellulaire permet de transformer en protéines l'information génétique portée par l'ADN. Les protéines sont les composants essentiels de toutes les cellules vivantes et sont présentes dans la plupart des processus biologiques. Elles sont synthétisées par les ribosomes à partir des ARNm, qui par ajout d'acides aminés de l'extrémité N-terminale à C-terminale, permettent ainsi de constituer une chaîne polypeptidique linéaire. Les chaînes polypeptidiques se replient sur elles-mêmes et donnent à la protéine une structure tridimensionnelle unique essentielle à sa fonction (Balchin *et al.*, 2016). On parle alors de conformation native de la protéine (Figure 1).

Alors que quelques protéines peuvent se replier correctement *in vitro* dans des conditions idéales de pH, température, force ionique, le repliement des protéines n'est généralement pas spontané dans les conditions physiologiques (Anfinsen, 1973; Dobson et Ellis, 1998). En effet, la forte concentration en protéines et macromolécules dans la cellule (encombrement moléculaire) ainsi que de nombreux stress environnementaux (température, stress oxydants, etc.) compliquent fortement le processus de repliement. Par exemple, lorsque les protéines sont en cours de synthèse ou de repliement, elles exposent des régions qui devraient normalement être enfouies dans la structure native. Ces régions sont généralement hydrophobes et peuvent interagir avec d'autres régions hydrophobes de la même protéine ou d'une autre, entraînant ainsi le phénomène d'agrégation des protéines (Figure 1) (Ellis et Minton, 2006). Ces agrégats peuvent parfois être toxiques pour la cellule, comme par exemple lors de la formation de complexes fibrillaires (amyloïdes) dans le cas de la maladie d'Alzheimer ou d'autres maladies neurodégénératives (Lackie *et al.*, 2017).

Pour contrer ces problèmes de repliement des protéines, la cellule possède une machinerie complexe de chaperons moléculaires (Balchin *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013). Les chaperons sont des protéines qui aident les autres protéines à se replier jusqu'à leur conformation native et permettent ainsi leur fonction physiologique, mais sans intervenir dans la structure finale de la protéine ou du complexe protéique. Le terme de « protéine cliente » ou « protéine substrat » est utilisé pour parler de la protéine nécessitant l'intervention d'une protéine chaperon. Ainsi, la protéine cliente est libérée par la protéine chaperon lorsque cette

Tableau 1 : Exemple de protéines chaperons de la famille des « Heat shock proteins » (Hsp).

Sous famille	Nom chez les bactéries	Poids moléculaire	Fonction
Hsp33	Hsp33	33 kDa	Protection et réparation des protéines lors de stress oxydant
Hsp40	DnaJ	40 kDa	Prévention de l'agrégation des protéines et co-chaperon de DnaK
Hsp60	GroEL	57 kDa	Repliement post-traductionnel, protection et réparation des protéines
Hsp70	DnaK	69 kDa	Repliement co- et post-traductionnel, protection et réparation des protéines
Hsp90	HtpG	71 kDa (86 kDa chez les eucaryotes)	Repliement et activation des protéines
Hsp100	ClpA	84 kDa	Dépliement pour permettre la dégradation des protéines. S'associe à la protéine ClpB
	ClpX	46 kDa	
	ClpB	96 kDa	Solubilisation des agrégats protéiques
s-Hsp « Small Hsp »	IbpA	16 kDa	Prévention de l'agrégation et réparation des protéines
	IbpB		

dernière a rempli sa fonction et peut alors interagir avec une autre protéine cliente. Les protéines chaperons sont impliquées dans l'intégralité de la vie des protéines (Figure 1). En effet, certaines protéines chaperons interviennent dès que le peptide est en cours de synthèse par le ribosome. D'autres interviennent en conditions de stress ou bien pour diriger la protéine dans les bons compartiments cellulaires. Certaines permettent également de désagréger les agrégats protéiques et de dégrader les protéines. Enfin, il existe des chaperons spécifiques, spécialisés dans le repliement d'une seule protéine. Afin de conserver l'homéostasie des protéines (protéostasie), les protéines chaperons collaborent, formant ainsi le réseau protéostasique (Balchin *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013).

La quantité de protéine chaperon découverte est en constante augmentation et on ne cesse de mieux comprendre leur fonctionnement. Certains chaperons sont très conservés dans tout le règne vivant, comme par exemple ceux de la famille des « heat shock proteins » ou Hsp (Tableau 1). Ces chaperons sont fortement induits lors de stress thermiques et sont nommés selon leur taille moléculaire en kDa, comme par exemple Hsp40, Hsp60, Hsp70 et Hsp90. Mes travaux de recherche ayant porté sur l'étude de la protéine chaperon Hsp90, j'ai choisi de détailler uniquement les connaissances portant sur cette protéine.

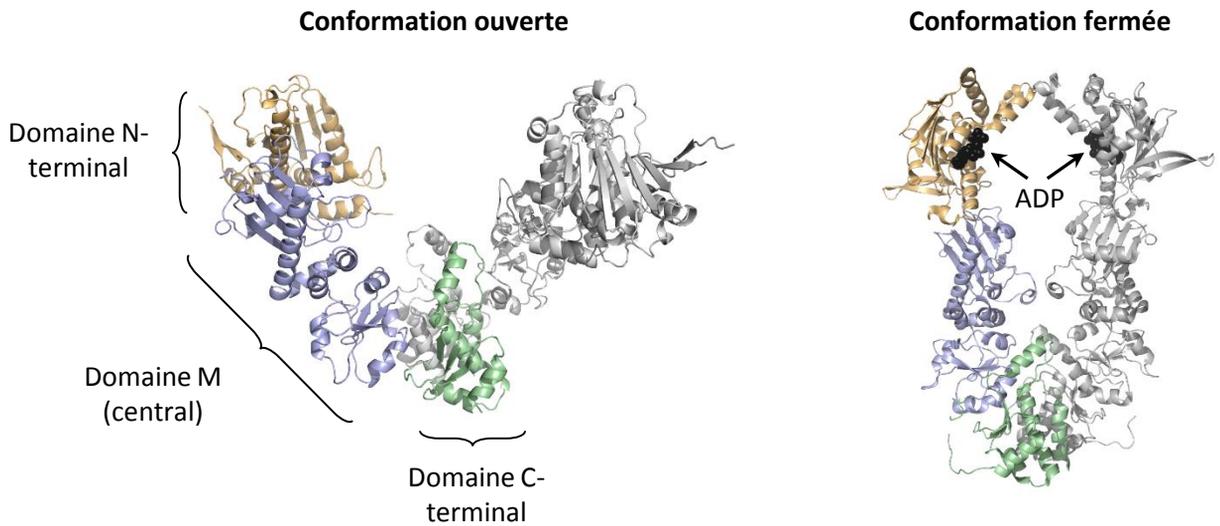
2. Dynamique conformationnelle d'Hsp90

2.1 Structure d'Hsp90

La protéine Hsp90 est un dimère constitué de deux protomères identiques. Chacun des protomères est divisé en 3 domaines très conservés : le domaine N-terminal, le domaine M ou central et le domaine C-terminal (Figure 2 A). Chacun de ces domaines joue un rôle important dans la fonction de la protéine chaperon (Taipale *et al.*, 2010; Stankiewicz et Mayer, 2012; Li *et al.*, 2012; Schopf *et al.*, 2017).

- Le domaine N-terminal contient le site de liaison à l'ATP.
- Le domaine M est essentiel pour l'interaction avec les protéines clientes et participe aussi à l'hydrolyse de l'ATP.
- Le domaine C-terminal contient le site d'interaction pour l'assemblage des deux protomères ainsi que des résidus impliqués dans l'interaction avec les protéines clientes.

A.



B.

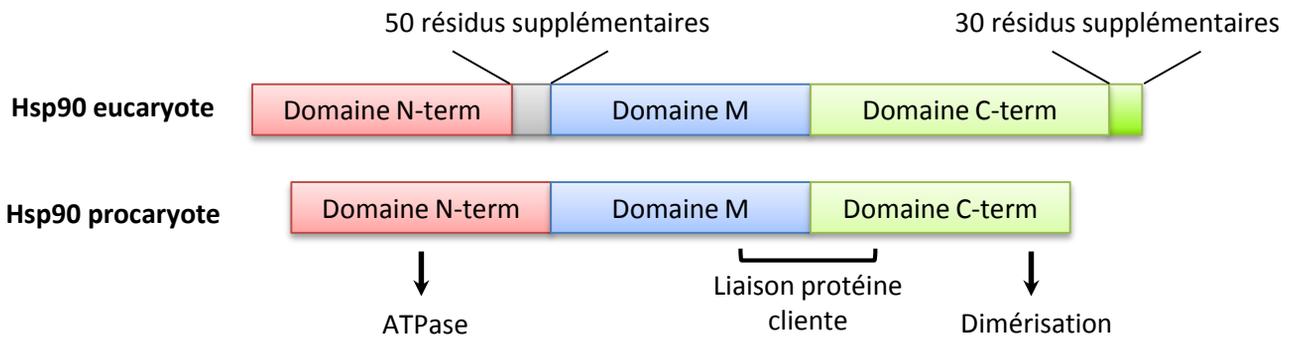


Figure 2 : Structures et organisation en domaines de la protéine Hsp90.

A. Structure dimérique de la protéine Hsp90 d'*E. coli* (code 2iop de la « Protein Data Bank »)

- A gauche : représentation de la conformation « ouverte » de la protéine avec les 3 différents domaines (en absence de nucléotide).
- A droite : représentation de la conformation « fermée » de la protéine (en présence d'ADP). Les molécules d'ADP sont représentées en noir.

B. Représentation schématique des différences entre l'organisation de Hsp90 eucaryote et Hsp90 procaryote (Taipale *et al.*, 2010).

Il existe toutefois des différences entre Hsp90 eucaryote et procaryote. En effet, une séquence « linker » d'environ 50 résidus qui n'est pas retrouvée chez Hsp90 procaryote connecte les domaines N et M de Hsp90 chez les eucaryotes (Figure 2 B). Cette séquence, qui contient de nombreux résidus chargés, pourrait permettre de favoriser les changements conformationnels d'Hsp90 eucaryote (Tsutsumi *et al.*, 2012).

De plus, chez les eucaryotes, on trouve 30 résidus supplémentaires à la fin du domaine C-terminal (Figure 2 B). Cette extrémité est responsable d'interactions avec de nombreux co-chaperons, des protéines qui permettent d'assister la protéine chaperon dans sa fonction. Cette région contient cinq résidus (Met Glu Glu Val Asp) qui sont reconnus par les co-chaperons contenant un domaine TPR (tétratricopeptide) (Prodromou *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que le chaperon Hsp70 contient également ces cinq résidus, ce qui lui permet aussi d'interagir avec des co-chaperons contenant un domaine TPR (Taipale *et al.*, 2010). Les chaperons Hsp90 et Hsp70 collaborant, des co-chaperons permettent ainsi de les connecter par cette région. Comme décrit plus loin, des co-chaperons chez les eucaryotes permettent de connecter par cette région les protéines Hsp90 et Hsp70 pour faciliter leur collaboration.

Il a récemment été montré que la structure tridimensionnelle de la protéine Hsp90 des mitochondries (appelée TRAP1) possède une certaine asymétrie des deux protomères au niveau de l'interface entre les domaines M et C en conformation fermée (Lavery *et al.*, 2014). Cette asymétrie est importante pour la fonction de la protéine. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre si ce mécanisme est conservé ou pas au sein de la famille Hsp90.

2.2 Changements conformationnels et cycle d'Hsp90

La protéine Hsp90 subit de grands changements conformationnels qui lui permettent d'interagir de façon dynamique avec les protéines clientes, et d'ainsi pouvoir participer à leur repliement ou à leur activation. Ces changements conformationnels sont dirigés en partie par la nature du nucléotide qui est lié au domaine N-terminal. Ainsi, au cours du cycle d'hydrolyse de l'ATP, Hsp90 est présente sous différentes conformations (Krukenberg *et al.*, 2011; Mayer et Le Breton, 2015; Pearl, 2016; Schopf *et al.*, 2017).

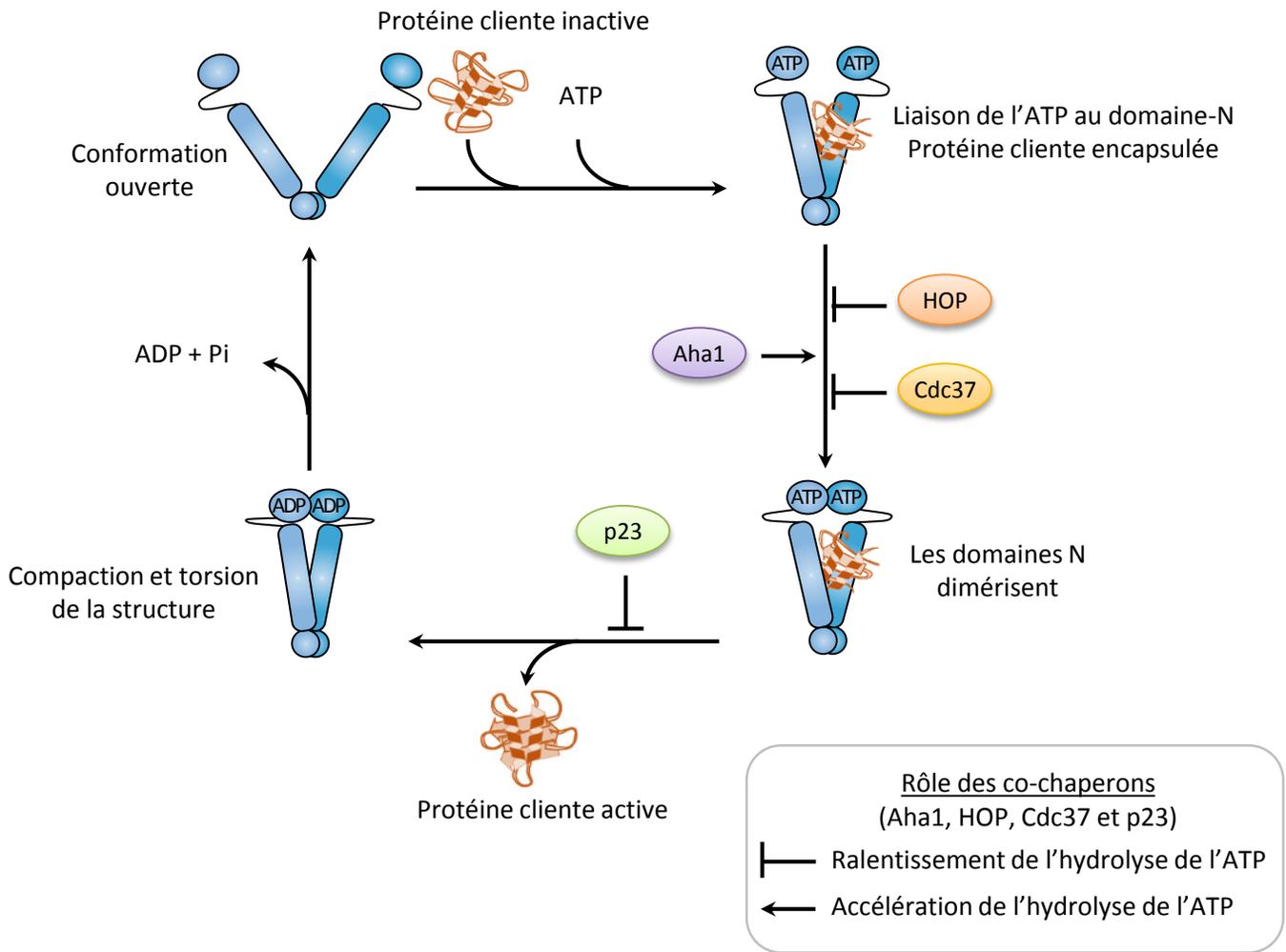


Figure 3 : Cycle de l'ATPase de la protéine chaperon Hsp90 eucaryote en présence de différents co-chaperons permettant l'activation et le bon repliement de la protéine cliente.
(Balchin *et al.*, 2016)

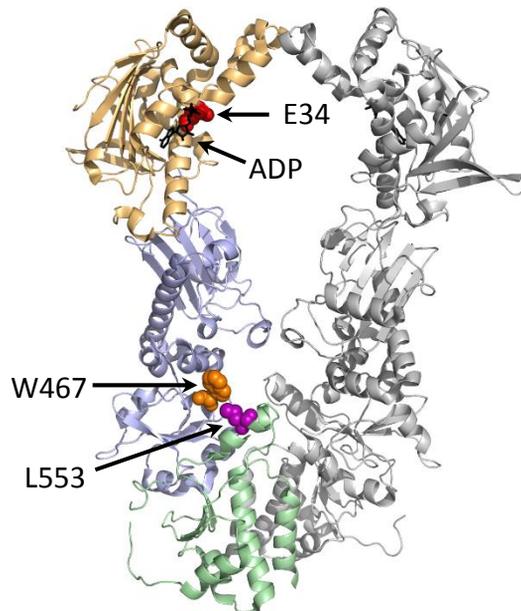


Figure 4 : Structure de Hsp90 de *E. coli* en conformation fermée, montrant des résidus importants pour l'hydrolyse de l'ATP (E34) et la liaison aux protéines clientes (W467 et L553) (code 2iop de la « Protein Data Bank »).

Les numéros des acides aminés correspondent à la séquence en acides aminés d'Hsp90 d'*E. coli*.

En absence de nucléotide, le dimère d'Hsp90 est en conformation ouverte, en forme de « V » (Figure 3). Une protéine cliente inactive peut alors interagir avec Hsp90. L'ATP se fixe au niveau du domaine N-terminal de chaque dimère. Cette fixation entraîne un changement de conformation de la protéine qui passe alors sous une forme « refermée », permettant d'encapsuler la protéine cliente. Des changements conformationnels d'une région du domaine N appelée « lid » ou « couvercle » qui se referme sur le nucléotide, vont permettre la dimérisation des domaines N. Ces modifications entraînent ensuite une compaction et une torsion de la structure. L'ATP est alors hydrolysé en ADP. Les domaines N-terminaux se séparent l'un de l'autre et la protéine cliente est libérée. Hsp90 retrouve alors sa conformation ouverte en « V » et peut ainsi commencer un nouveau cycle.

2.3 Importance de l'ATP pour la fonction d'Hsp90

De nombreuses études ont permis de montrer l'importance de l'ATP pour la fonction de la protéine chaperon. Les résidus d'Hsp90 importants pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ont été identifiés. Parmi eux, le résidu glutamate E33 d'Hsp90 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* s'est avéré essentiel pour l'hydrolyse de l'ATP (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998). Chez les procaryotes, notamment chez *E. coli*, le résidu glutamate E34 (homologue à E33 de Hsp90 chez *S. cerevisiae*) est également essentiel pour hydrolyser l'ATP, et sa mutation en alanine abolit l'activité chaperon d'Hsp90 *in vitro* (Graf *et al.*, 2009; Genest *et al.*, 2011) (Figure 4).

3. Hsp90 chez les eucaryotes

3.1 Physiologie

Chez les eucaryotes, la protéine chaperon Hsp90 est essentielle. Très abondante dans les cellules eucaryotes (1 à 2 % des protéines totales) sa quantité est fortement augmentée lorsque la cellule est exposée à des stress environnementaux comme par exemple un stress thermique (Borkovich *et al.*, 1989). La protéine Hsp90 est localisée dans le cytosol des cellules et également dans certains organites (mitochondries et réticulum endoplasmique). Par ailleurs, elle est impliquée dans le repliement et l'activation de plus de 300 protéines clientes. Ces clients incluent entre autres des protéines kinases, des récepteurs d'hormones et des régulateurs transcriptionnels (Pratt *et al.*, 2015; Röhl *et al.*, 2013; Taipale *et al.*, 2010). Il a également été montré que Hsp90 chez les eucaryotes est un acteur important permettant

l'évolution génétique. En effet, l'évolution implique l'apparition successive de mutations qui peuvent déstabiliser les protéines. Hsp90, en aidant au repliement et à la stabilisation de ces protéines mutées, participe donc activement au processus d'évolution. Par exemple, il a été montré que chez la drosophile, la présence d'Hsp90 permet de masquer des phénotypes dus à des mutations génétiques (Lindquist, 2009).

3.2 Rôle dans les cancers

Hsp90 fait partie des protéines chaperons impliquées dans les cancers et la prolifération de cellules tumorales (Neckers, 2007). En effet, Hsp90 permet l'activation d'oncoprotéines, comme par exemple la protéine kinase v-Src (Boczek *et al.*, 2015). De ce fait, Hsp90 est une cible importante pour le traitement de cancers. Ainsi, de nombreuses études sont menées sur la recherche d'inhibiteurs d'Hsp90 (Jhaveri *et al.*, 2012; Shrestha *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016). Les inhibiteurs comme le radicicol ou ceux de la famille des ansamycines benzoquinones (geldanamycine ou 17-AAG) sont de petites molécules (entre 350 et 600 Da), qui en inactivant Hsp90, déstabilisent les protéines clientes et induisent l'apoptose des cellules. Ces inhibiteurs interagissent au niveau de la poche de liaison à l'ATP dans le domaine N-terminal et empêchent donc le fonctionnement d'Hsp90 (Piper et Millson, 2012). D'autres inhibiteurs comme l'antibiotique novobiocine, interagissent avec la région C-terminale (Marcu *et al.*, 2000). L'inhibition d'Hsp90 pourrait ainsi à terme permettre de faire reculer la propagation des cancers. Par ailleurs, Hsp90 est également impliqué, avec d'autres chaperons, dans les maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson, Alzheimer et Huntington (Lackie *et al.*, 2017). Ces maladies sont causées par la formation d'agrégats toxiques, due à un déséquilibre de l'homéostasie des protéines. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action de Hsp90 et de son inhibition sont donc des enjeux importants pour espérer guérir ou limiter ces maladies.

3.3 Collaboration avec les co-chaperons

Un co-chaperon est une protéine qui permet d'assister la protéine chaperon dans sa fonction, mais qui ne possède pas elle-même l'activité chaperon. Chez les eucaryotes, Hsp90 collabore avec des co-chaperons qui pourraient moduler de façon fine son cycle d'hydrolyse de l'ATP afin de lui permettre de s'adapter à la grande diversité de ses clients (Li *et al.*, 2012). Les co-chaperons permettent également d'interagir avec des protéines clientes (Karagöz et Rüdiger, 2015) et aussi de collaborer avec le chaperon Hsp70 (Lackie *et al.*, 2017).

Près de 20 co-chaperons d'Hsp90 ont été décrits chez les eucaryotes et ils possèdent des fonctions différentes (Li *et al.*, 2012). Par exemple, les co-chaperons HOP et Cdc37 ralentissent l'hydrolyse de l'ATP et stabilisent par conséquent le dimère d'Hsp90 dans sa conformation ouverte (Figure 3). De plus, ils facilitent le contact avec les protéines clientes. Comme vu précédemment, HOP interagit par ses domaines TPR avec Hsp90 et Hsp70 permettant de connecter les deux chaperons et de faciliter leur collaboration. Le co-chaperon Aha1 a un rôle différent : il accélère l'hydrolyse de l'ATP et facilite donc le changement conformationnel de Hsp90 vers la forme fermée. Vers la fin du cycle d'Hsp90, le co-chaperon p23 facilite le repliement complet de la protéine cliente en ralentissant l'hydrolyse de l'ATP. Pour cela, deux molécules de p23 se lient aux deux domaines N-terminaux pour stabiliser Hsp90 en conformation fermée (Röhl *et al.*, 2013; Schopf *et al.*, 2017).

Il est important de noter que chez les procaryotes, Hsp90 ne semble pas fonctionner avec des co-chaperons. En effet, les résidus de l'extrémité C-terminale d'Hsp90 eucaryote qui permettent l'interaction avec les co-chaperons ayant un motif TPR sont absents chez Hsp90 bactérien. De plus, aucun co-chaperon n'a été décrit pour Hsp90 procaryote (Johnson, 2012).

4. Hsp90 chez les procaryotes

Chez les procaryotes, la protéine homologue de Hsp90 eucaryote est HtpG (high temperature protein G). Pour plus de simplicité, nous l'appellerons Hsp90 avec les initiales du genre et de l'espèce bactérienne notée en indice. Par exemple, nous parlerons de Hsp90_{Ec} pour la protéine d'*Escherichia coli*. Hsp90 est une protéine très conservée à travers les espèces bactériennes. En effet si l'on compare la séquence de Hsp90 humain et Hsp90_{Ec}, les séquences sont similaires à environ 45 %. La structure de la protéine est conservée, mais les résidus présents à l'extrémité C-terminale sont absents ainsi que la région linker entre les domaines N et M. Son poids moléculaire chez la bactérie est donc de 71 kDa par rapport à 86 kDa chez les eucaryotes.

4.1 Phénotypes associés à la mutation d'Hsp90

Contrairement aux eucaryotes, Hsp90 n'est pas essentielle à la survie en conditions normales chez les bactéries. En effet, il a été montré chez *E. coli* qu'une souche mutante $\Delta hsp90_{Ec}$ est viable mais sa croissance est ralentie à haute température (44°) (Bardwell et Craig, 1988). Même après un choc thermique à 50°C, la cultivabilité des cellules mutantes n'est

pas réduite (Thomas et Baneyx, 1998). Plus récemment, une étude menée sur la souche *Δhsp90_{Ec}* a montré une légère diminution de la formation de biofilm à 42°C (Grudniak *et al.*, 2013).

L'étude de bactéries plus éloignées phylogénétiquement d'*E. coli* a permis de révéler le rôle important d'Hsp90 chez d'autres procaryotes. En effet, chez la cyanobactérie *Synechococcus elongatus*, bien que la croissance de la souche mutante *Δhsp90_{Se}* ne soit pas affectée à une température normale, Hsp90_{Se} devient essentiel à haute température (45°C) (Tanaka et Nakamoto, 1999). Par ailleurs, à basse température (16°C), l'absence de Hsp90_{Se} inhibe la croissance et entraîne une perte de la photosynthèse (Hossain et Nakamoto, 2002). D'autre part, Hsp90_{Se} semble également intervenir pour la protection contre les stress oxydatifs à basse température (Hossain et Nakamoto, 2003).

De façon intéressante, il a été suggéré que Hsp90 joue un rôle important dans l'acclimatation aux basses températures chez les bactéries *Shewanella frigidimarina* et *Psychrobacter frigidicola* (García-Descalzo *et al.*, 2011). Cependant les mécanismes moléculaires permettant à Hsp90 de jouer son rôle dans la cellule ne sont pas connus.

4.2 Interaction d'Hsp90 avec ses clients

Comme nous l'avons vu ci-dessus, Hsp90 eucaryote possède plus de 300 protéines clientes. Par contre, très peu de clients d'Hsp90 bactérien ont été identifiés. Ce petit nombre de clients ne permet actuellement pas de mettre en évidence des caractéristiques communes à ces protéines, ce qui à terme pourrait permettre d'aider à la prédiction de nouveaux clients.

Chez *E. coli*, il a été montré que la protéine ribosomale L2 était co-purifiée avec Hsp90_{Ec}, et que par cette interaction, l'activité ATPase d'Hsp90_{Ec} est stimulée (Motojima-Miyazaki *et al.*, 2010). Cependant, le rôle joué par Hsp90_{Ec} dans le repliement de L2 n'a pas été documenté, et bien que cette protéine soit essentielle chez *E. coli*, aucun phénotype du mutant de délétion d'Hsp90_{Ec} lié à L2 n'a été décrit. Une autre étude a montré que Hsp90_{Ec} permet la stabilisation de la protéine Cas3 du système CRISPR, un système de défense immunitaire de la bactérie contre des éléments génétiques étrangers (Yosef *et al.*, 2011). Enfin, il a été proposé que Hsp90_{Ec} puisse interagir avec les deux enzymes β-lactamase et phosphatase alcaline à 42°C (Grudniak *et al.*, 2013), DnaA (Grudniak *et al.*, 2015) et avec CheA et FliM, des protéines impliquées dans la mobilité cellulaire (Press *et al.*, 2013).

Chez la cyanobactérie *Synechococcus elongatus*, Hsp90 interagit avec et stabilise la sous-unité L_R³⁰ du complexe protéique phycobilisome (Sato *et al.*, 2010). Ce complexe présent chez les cyanobactéries permet à la cellule de transformer l'énergie lumineuse, provenant de l'appareil photosynthétique, en composés énergétiques. Le complexe phycobilisome est produit en forte quantité dans la cellule et fait partie des protéines solubles les plus présentes. Il est donc important que le complexe soit stable lors de conditions de stress.

Une étude globale menée à température permissive chez *Shewanella oneidensis* a montré l'interaction de Hsp90_{So} avec plusieurs protéines (García-Descalzo *et al.*, 2011). Cependant, l'interaction directe des protéines clientes avec Hsp90 n'a pas été confirmée.

Plusieurs études ont cherché à déterminer chez les bactéries les régions d'Hsp90 importantes pour l'interaction avec les protéines clientes. Chez les cyanobactéries, il a été montré que c'est le domaine M de Hsp90_{Se} qui est responsable de l'interaction avec L_R³⁰ (Sato *et al.*, 2010). Une autre étude a permis de découvrir les résidus impliqués dans la liaison entre le chaperon Hsp90_{Ec} et les protéines clientes, dont la protéine L2. Par mutagénèse aléatoire, il a été montré que plusieurs résidus des domaines M et C-terminal sont importants pour l'interaction (Genest *et al.*, 2013), comme par exemple les résidus tryptophane 467 (présent dans le domaine M) et leucine 553 (présent dans le domaine C-terminal) (Figure 4).

4.3 Implication d'Hsp90 dans la virulence

Des études ont pu établir que le chaperon Hsp90 de certaines bactéries était impliqué dans la virulence. En effet, une étude menée chez *Xanthomonas albilineans* (bactérie responsable d'une maladie grave pour la canne à sucre) a permis de montrer le rôle de Hsp90_{Xa} dans la biosynthèse d'une toxine (albicidine) responsable de cette maladie (Vivien *et al.*, 2005). De plus, chez la bactérie *Edwardsiella tarda*, pathogène opportuniste du milieu aquatique d'eau douce, Hsp90_{Et} joue un rôle dans le processus infectieux de la bactérie selon un mécanisme inconnu actuellement. *E. tarda* est en effet responsable de maladies intestinales causées chez l'homme par l'ingestion de poissons. Hsp90_{Et} pourrait donc permettre à la bactérie de surmonter les stress causés par l'hôte lors de l'infection (Dang *et al.*, 2011). Par ailleurs, chez la bactérie *Salmonella typhimurium*, responsable de la maladie infectieuse salmonellose, Hsp90_{St} permet à la bactérie de persister dans les intestins des porcins et plus particulièrement à l'intérieur des macrophages (Verbrugghe *et al.*, 2015). Une

étude complémentaire a montré que l'utilisation de doses sub-thérapeutiques (doses inférieures au seuil thérapeutique) de l'antibiotique tétracycline peut augmenter la quantité de Hsp90_{St} exprimé dans la cellule (Verbrugghe *et al.*, 2016). La mauvaise utilisation de cet antibiotique conduit donc à une augmentation de la virulence de la bactérie *S. typhimurium* et de la gravité de la maladie.

Malgré un nombre conséquent d'études menées principalement chez *E. coli* et les cyanobactéries, le rôle physiologique d'Hsp90 chez les bactéries n'est toujours pas élucidé. Afin de mieux comprendre l'action de Hsp90 chez les bactéries et pour identifier de nouvelles protéines clientes, de nouveaux modèles bactériens sont nécessaires. Ainsi, nous avons choisi de travailler sur la bactérie *Shewanella oneidensis* qui vit dans un environnement extrêmement variable. Ces variations affectant le repliement des protéines, cette bactérie a probablement une nécessité absolue pour ses chaperons.

II. *Shewanella oneidensis*, une nouvelle bactérie modèle pour l'étude des protéines chaperons

1. Historique

Les bactéries du genre *Shewanella* sont des γ -protéobactéries et sont toutes des bacilles à Gram négatif anaérobies facultatives. La première bactérie du genre a été isolée en 1931. Elles ont d'abord été identifiées comme *Pseudomonas* (ou *Alteromonas*) *putrefaciens* (Myers et Nealson, 1988), mais ont été réaffectées au genre *Shewanella* après une analyse phylogénétique (Venkateswaran *et al.*, 1999). A ce jour, plus de 25 bactéries du genre *Shewanella* ont été séquencées et plus d'une cinquantaine ont été isolées. *Shewanella oneidensis* a été découverte en 1988 dans le lac Oneida aux Etats-Unis. C'est la première bactérie du genre à avoir été séquencée et aussi la plus étudiée des *Shewanella*.

2. Génétique

Le génome de *S. oneidensis* a été entièrement séquencé pour la première fois en 2002 (Heidelberg *et al.*, 2002). Cette bactérie possède un génome de plus de 5 millions de bases et 4590 gènes. Elle possède également un plasmide sur lequel est présent 184 gènes. En dehors du genre auquel elle appartient, *S. oneidensis* est génétiquement proche de la γ -protéobactérie *Vibrio cholerae*.

3. Morphologie et physiologie

S. oneidensis possède la capacité de respirer même en absence de dioxygène et est décrite comme l'une des bactéries possédant la plus grande variété de systèmes respiratoires. Dans certains cas, la respiration se fait alors par la réduction de différents métaux, comme le manganèse ou encore le fer, que la bactérie utilise comme accepteurs finaux d'électrons (Heidelberg *et al.*, 2002). Cela confère à la bactérie une grande capacité d'adaptation, même dans les conditions extrêmes que peuvent être les milieux toxiques ou pollués.

4. Environnement et capacités d'adaptation

Les bactéries du genre *Shewanella* sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'on les retrouve dans tous les océans du globe, dans les sédiments et même dans les abysses océaniques

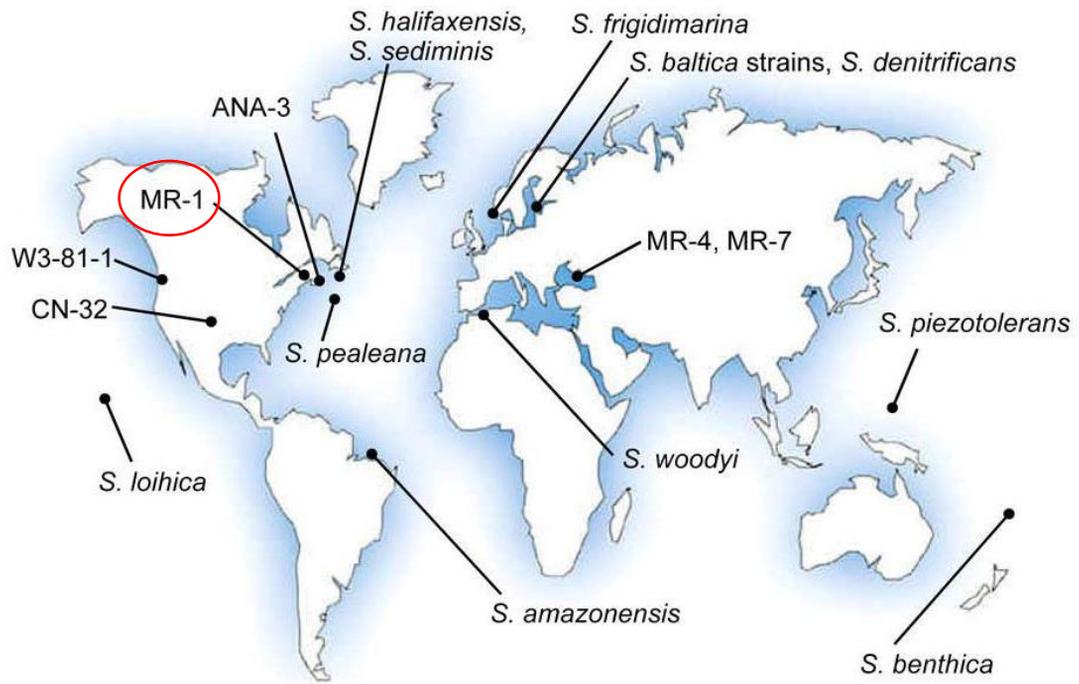


Figure 5 : Planisphère associant les différentes souches du genre *Shewanella* à leur lieu de découverte.

« MR-1 » correspond à la souche *Shewanella oneidensis* que j'ai utilisé pour mon étude. Elle a été découverte aux Etats-Unis dans le lac Oneida (NY).

(Rodianov *et al.*, 2011)

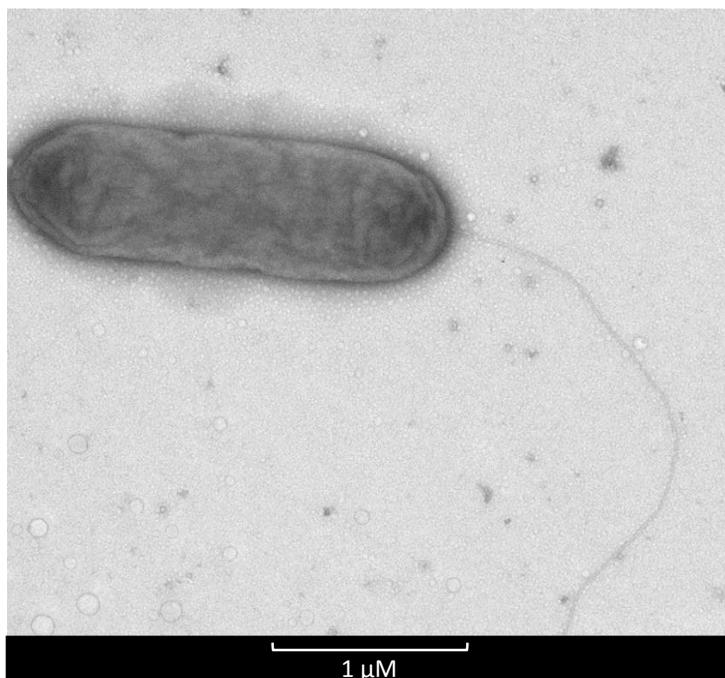


Figure 6 : Photographie d'une cellule de *Shewanella oneidensis* observée par microscopie électronique à transmission sur laquelle on peut observer la présence du flagelle.

(Avec la permission de Cyril Gambari)

(Figure 5). Bien que *S. oneidensis* ait été isolée dans un lac d'eau douce, elle est retrouvée dans tous les océans. Elle peut donc survivre dans différents milieux environnementaux, comme les eaux douces mais aussi les eaux salées, avec des quantités de NaCl allant jusqu'à 35 g/L. Cependant la bactérie se développe d'avantage dans des conditions de salinité faibles (Liu *et al.*, 2005). Elle est dotée d'un flagelle polaire qui lui permet de se déplacer vers des milieux plus favorables à sa survie (Figure 6). De plus, elle a une incroyable capacité d'adaptation à une très large gamme de température allant de 5 à 38°C, et sa température optimale de croissance est de 28°C. Au laboratoire, *S. oneidensis* est facile à manipuler, son temps de génération étant relativement court (1 heure en condition optimale de croissance).

5. Pathogénicité

De manière générale, les bactéries du genre *Shewanella* ne sont pas pathogènes. Aucun cas clinique n'a été associé à la présence de *S. oneidensis*, cependant d'autres bactéries du genre *Shewanella* ont été identifiées lors d'infections chez l'homme (*S. algae* et *S. putrefaciens*) (Sharma et Kalawat, 2010). Ces infections semblent être opportunistes car les bactéries du genre *Shewanella* étaient associées à d'autres bactéries. *S. algae* et *S. putrefaciens* ont également été montrées comme étant des bactéries pathogènes opportunistes chez les poissons (Cai *et al.*, 2006). Le rôle pathogène du genre *Shewanella* est encore mal caractérisé mais jusqu'à présent on ne peut catégoriser ces bactéries comme pathogène. L'utilisation de *S. oneidensis* au laboratoire est donc facilitée par sa non-pathogénicité.

6. Biotechnologie

Etant donné leur grande résistance et leur capacité d'adaptation à des environnements extrêmement variables, les bactéries du genre *Shewanella* sont exploitées pour de nombreuses applications biotechnologiques (Hau et Gralnick, 2007). Elles sont utilisées dans des processus de bio-remédiation car elles ont la capacité de réduire de nombreux métaux comme par exemple le chrome ou le cobalt. La solubilité des métaux étant généralement liée à leur état d'oxydation, leur réduction par des bactéries peut entraîner leur précipitation. Les métaux deviennent alors bio indisponibles et peuvent sédimenter ou être filtrés. D'autres contaminants peuvent aussi être dépollués par les bactéries du genre *Shewanella* comme par exemple des radionucléides (uranium) ou des explosifs (nitramines). Enfin, les bactéries du

genre *Shewanella* semblent être très prometteuses pour la fabrication de bio-piles en utilisant les propriétés respiratoires hors du commun de ces bactéries.

7. Présence de protéines chaperons

La plupart des protéines chaperons identifiées chez *E. coli* sont retrouvées chez *S. oneidensis*. Par exemple, les protéines de la famille des Hsp telles que Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 et sHsp sont présentes. On retrouve également dans le génome de *S. oneidensis* certains chaperons du périplasme (Skp, SurA) et des chaperons spécifiques d'enzymes respiratoires (TorD, NarJ). De façon très intéressante, les premières données obtenues dans notre équipe suggèrent qu'il y ait une plus grande diversité de chaperons chez *S. oneidensis* que dans le modèle *E. coli*. En effet, quatre nouvelles protéines du système chaperon de DnaK (l'un des chaperons majeurs) ont ainsi pu être identifiées chez *S. oneidensis*.

Puisque les stress environnementaux tels que des variations de température, de salinité ou de pression hydrostatique sont connus pour impacter le bon repliement des protéines, et que *S. oneidensis* possède de grandes capacités d'adaptation à des conditions assez extrêmes, nous avons émis l'hypothèse que les chaperons moléculaires sont très utiles à sa survie. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier le chaperon Hsp90 chez cet organisme afin d'élucider son rôle physiologique. A terme, la bactérie *Shewanella oneidensis* pourrait devenir une référence pour les recherches menées sur Hsp90 mais également sur d'autres chaperons.

PARTIE EXPERIMENTALE

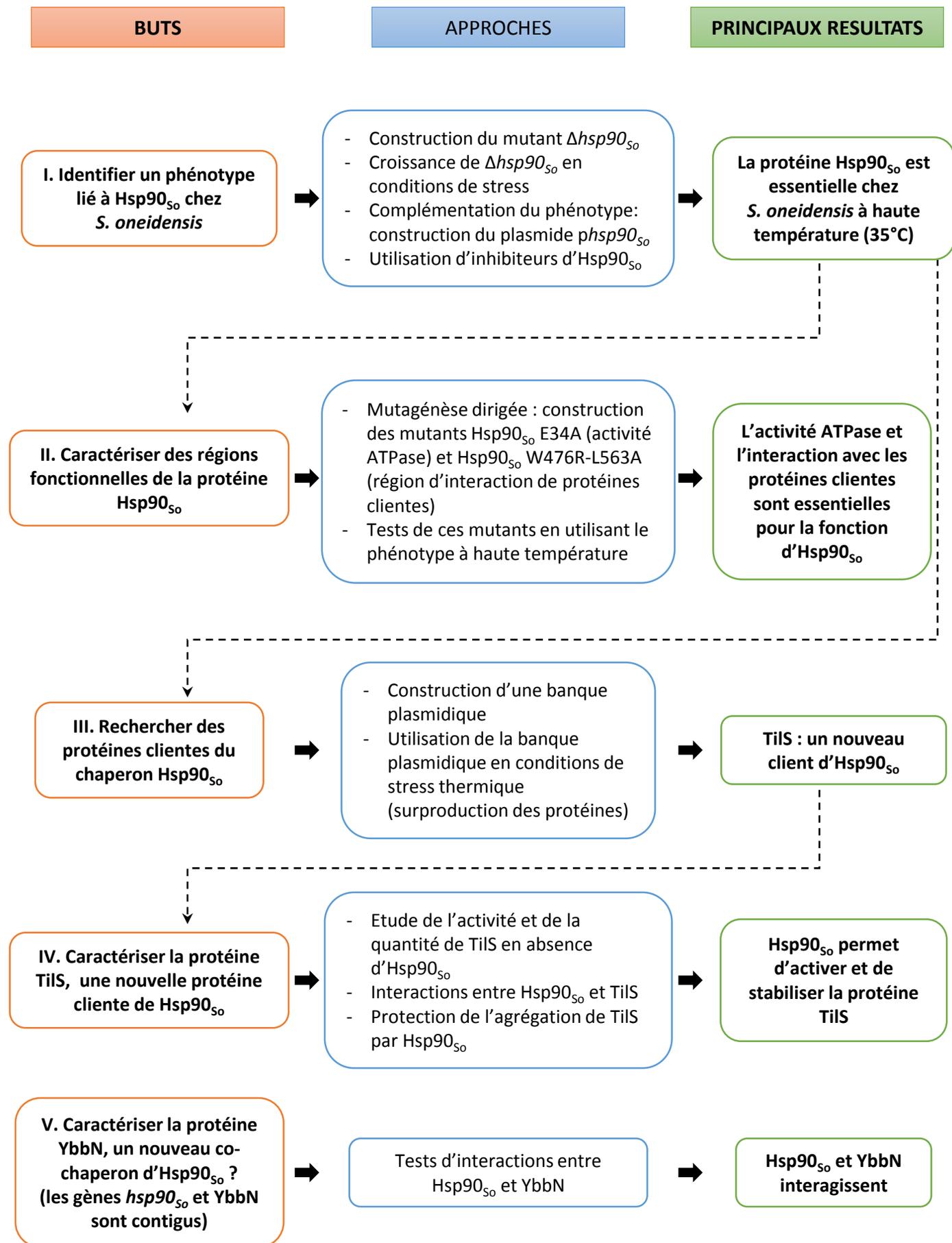


Figure 7 : Schéma résumant les buts, les approches et les principaux résultats obtenus au cours de cette étude.

Comme nous avons vu précédemment, la protéine chaperonne Hsp90 a un rôle complexe chez les êtres vivants. Elle a été beaucoup étudiée chez les eucaryotes, mais beaucoup moins chez les procaryotes où son rôle reste encore très vague. Chez la bactérie modèle la plus étudiée, *E. coli*, seulement quelques phénotypes modestes ont été observés en absence d'Hsp90, suggérant qu'*E. coli* ne soit pas le meilleur organisme pour l'étude de ce chaperon. Puisque les chaperons permettent notamment de compenser l'effet du stress sur le repliement des protéines, nous avons recherché un modèle bactérien pouvant supporter et s'adapter à un grand nombre de stress. De ce fait, la bactérie marine *Shewanella oneidensis* nous a semblé être idéale pour l'étude de la protéine chaperon Hsp90. En effet, dans cet organisme le repliement des protéines est en permanence altéré par les conditions environnementales, suggérant un rôle très important des protéines chaperons.

Le but de l'étude de la protéine chaperon Hsp90 de *S. oneidensis* (Hsp90_{so}) est de comprendre son rôle physiologique, ce qui passe tout d'abord par la recherche d'un phénotype associé à l'absence de la protéine Hsp90_{so} (Figure 7). Les différentes étapes nécessaires à la découverte d'un phénotype sont détaillées. Puis, afin de mieux comprendre le fonctionnement de la protéine Hsp90_{so}, une seconde partie est consacrée à l'étude de mutants ponctuels permettant de caractériser des régions fonctionnelles. La construction des mutants et leurs activités ont ainsi été testées. La troisième partie est centrée sur la recherche de protéines clientes de la protéine Hsp90_{so} en utilisant une banque plasmidique permettant la surproduction des protéines de *S. oneidensis*. La protéine cliente identifiée, TilS, est étudiée dans la partie suivante. Enfin dans une dernière partie, une protéine co-chaperon putative de Hsp90_{so} est étudiée. Ainsi des interactions entre le co-chaperon putatif et Hsp90_{so} ont été recherchées. La majeure partie de ces résultats ont été publiés dans un article scientifique (Honoré *et al.*, 2017) (Annexe 4).

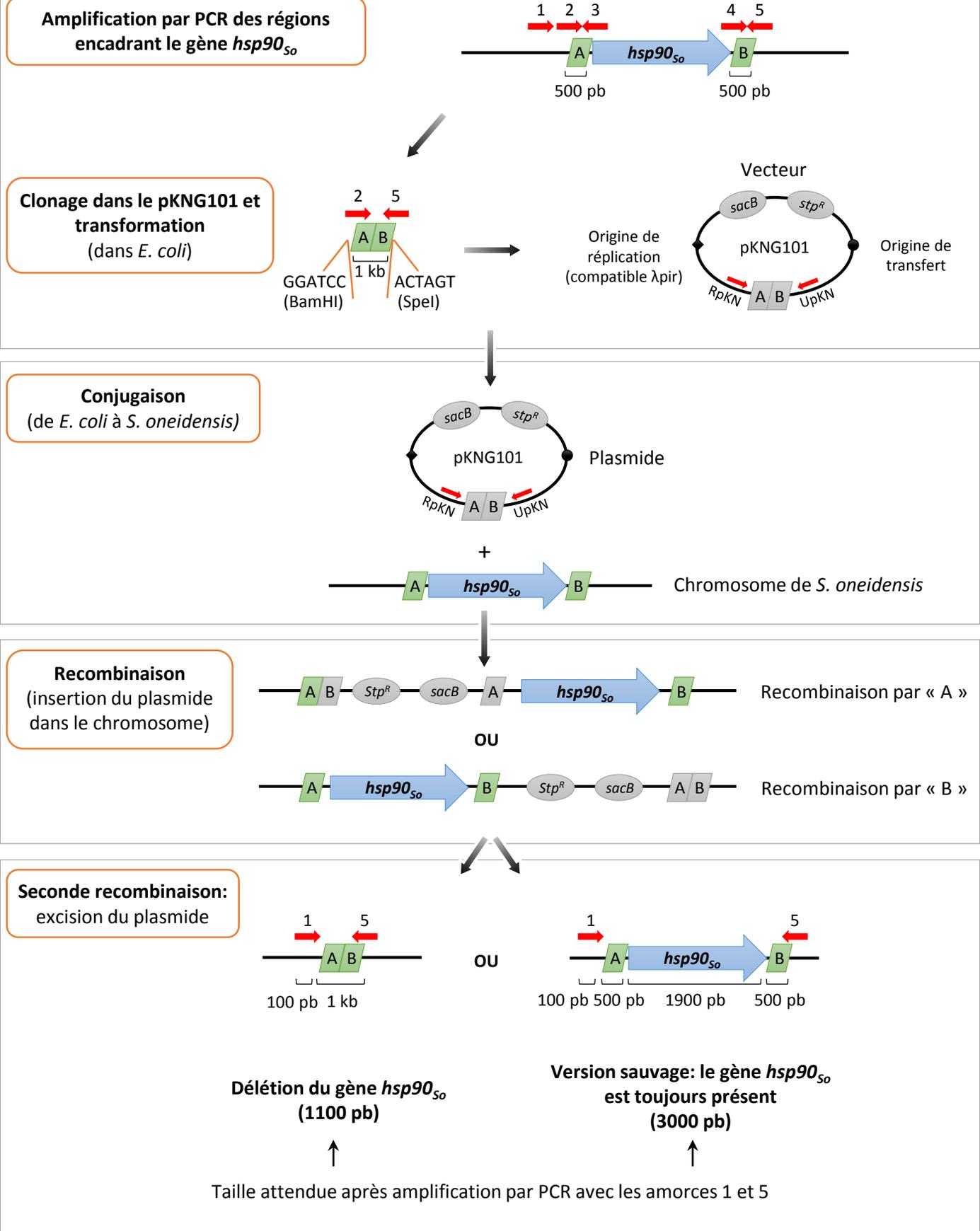


Figure 8 : Représentation schématique de la technique permettant la délétion du gène *hsp90_{so}* par recombinaison homologue chez *S. oneidensis*.

Le gène *hsp90_{so}* est représenté par une flèche bleue, les régions flanquantes de 500 pb chacune sont représentées en vert et nommées A et B. Les flèches rouges (1, 2, 3, 4, 5, UpKN et RpKN) représentent les amorces utilisées. Le plasmide pKNG101 n'est pas répliquatif chez *S. oneidensis* et comporte une résistance à la streptomycine (*stp^R*) et une sensibilité au saccharose (*sacB*).

I. Recherche de phénotypes du mutant $\Delta hsp90_{so}$

Afin de comprendre le rôle physiologique de Hsp90 chez *S. oneidensis*, le phénotype d'une souche ne produisant pas Hsp90 doit être identifié. Pour cela, j'ai tout d'abord construit un mutant de délétion d'Hsp90_{so} ($\Delta hsp90_{so}$). La croissance de ce mutant a ensuite été testée dans différentes conditions de stress et comparée à celle de la souche sauvage.

1. Construction du mutant de délétion du gène *hsp90* chez *S. oneidensis* ($\Delta hsp90_{so}$)

La construction de mutants de délétion chez *S. oneidensis* s'effectue par recombinaison homologue. Cette technique est basée sur l'utilisation d'un plasmide non répliquatif chez *S. oneidensis*, le pKNG101, dans lequel un clonage des régions en amont et en aval du gène à supprimer est réalisé. Après introduction par conjugaison dans *S. oneidensis*, le plasmide s'intègre sur le chromosome par recombinaison homologue. Un deuxième événement de recombinaison homologue entraîne l'excision du plasmide du chromosome, ce qui conduit à la délétion du gène d'intérêt (Figure 8). Les étapes successives mises en place pour cette construction sont présentées dans les paragraphes suivants.

1.1 Amplification par PCR des régions encadrant le gène *hsp90_{so}*

Tout d'abord, on procède à une amplification par PCR des deux fragments de 500 paires de bases (pb) encadrant le gène *hsp90_{so}* que l'on veut enlever (Figure 8). L'ADN chromosomique de *S. oneidensis* est préalablement purifié grâce au kit « GenElute™ Bacterial genomic DNA » (Sigma) en suivant le protocole du fabricant. Nous utilisons l'enzyme ADN polymérase à haute-fidélité « Q5® High-Fidelity DNA polymerase » (New England Biolabs). Cette enzyme permet de limiter au maximum les erreurs de réplication et elle a une vitesse d'élongation de 20 à 30 s pour 1 kb. On prépare donc deux mélanges de PCR de 50 µL contenant entre 10 et 20 ng d'ADN de *S. oneidensis*, 100 à 200 ng de chacune des amorces du couple d'oligonucléotides (le couple d'amorces 2 et 3 pour le fragment A et le couple 4 et 5 pour le fragment B) (Figure 8), 200 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ainsi que 1 unité d'ADN polymérase à haute-fidélité et 1X de son tampon spécifique « Q5® Reaction Buffer » (New England Biolabs). La première étape à 98°C du cycle de PCR entraîne la dénaturation de l'ADN. Nous utilisons le programme suivant : 30 s de dénaturation initiale à 98°C suivi de 24 cycles d'amplification

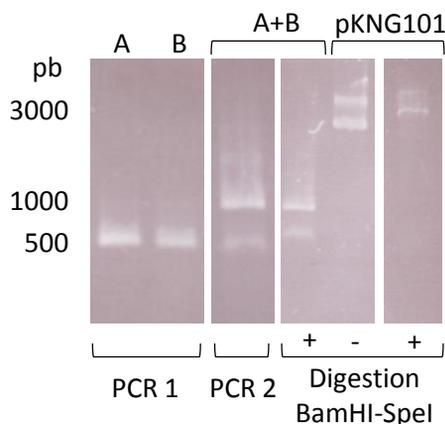


Figure 9 : Amplifications par PCR pour la délétion du gène *hsp90_{so}*.

Migration des fragments d'ADN obtenus après PCR, gel d'agarose 1% et coloration au BET.

PCR 1: amplification des fragments en amont et en aval du gène *hsp90_{so}* à partir du chromosome de *S. oneidensis* en utilisant les couples d'amorces 2 et 3 pour le fragment A et 4 et 5 pour le fragment B pour une taille attendue de 500 pb.

PCR 2: amplification des fragments en amont et en aval du gène *hsp90_{so}* à partir des deux fragments A et B en utilisant le couple d'amorce 2 et 5 pour une taille attendue de 1000 pb.

Digestion: vérification de la présence des fragments dans les échantillons après la digestion du fragment A+B avec les enzymes BamHI et SpeI et du pKNG101 linéarisé avec les mêmes enzymes.

Tableau 2 : Souches utilisées lors de cette étude.

Souches	Caractéristiques	Références
Souches d'<i>Escherichia coli</i>		
BI21(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)</i>	Novagen [®]
BTH101	<i>F⁻, cya-99, araD139, galE15, galk16, rpsL1 (StrR), hsdR2, mcrA1, mcrB1, relA1</i>	(Battesti et Bouveret, 2012)
BTH101Δ <i>htpG</i>	<i>F⁻, cya-99, araD139, galE15, galk16, rpsL1 (StrR), hsdR2, mcrA1, mcrB1, relA1, ΔhtpG</i>	(Genest <i>et al.</i> , 2015)
C600	<i>F⁻ tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ⁻</i>	(Hanahan, 1983)
CC118λpir	<i>Δ(ara-leu) araDE ΔlacX74 galE galk phoA20 thi-J rpsE rpoB argE(Am) recA1 λpir lysogène</i>	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
MG1655Δ <i>htpG</i>	<i>K-12 F⁻ λ⁻ ilvG⁻ rfb-50 rph-1ΔhtpG</i>	(Genest <i>et al.</i> , 2013)
NEB5α	<i>F⁻ proA+B+ lacIq ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galk16 galE15 R(zgb-210::Tn10)TetS endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	New England Biolabs
1047/pRK2013	Souche mobilisatrice (Km ^R)	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
Souches de <i>Shewanella oneidensis</i>		
MR1-R	Dérivée de la souche sauvage de <i>Shewanella oneidensis</i> (Rif ^R)	(Bordi <i>et al.</i> , 2003)
Δ <i>hsp90_{so}</i>	MR1-R délétée de la séquence codante du gène <i>hsp90</i> (SO_2016)	Ce travail
Δ <i>tilS</i> /p <i>tilS</i>	MR1-R délétée de la séquence codante du gène <i>tilS</i> (SO_1645) obtenue seulement lorsque le gène <i>tilS</i> est présent dans le pBAD33	Ce travail

comprenant 10 s de dénaturation à 98°C, 30 s d'hybridation à 55°C et 15 s d'élongation à 72°C. La réaction est achevée par 2 minutes supplémentaires à 72 °C pour terminer l'extension des fragments incomplets. Les produits PCR obtenus sont ensuite purifiés avec le kit « EZ-10 Spin Column PCR Products » (Bio Basic Inc). Afin de vérifier la présence des fragments ainsi que leur taille, une électrophorèse sur gel d'agarose 1% est effectuée (Figure 9, PCR 1). On peut ainsi voir la présence des fragments d'ADN amplifiés (fragment A et B) ayant la taille attendue de 500 pb.

Puis, on effectue une nouvelle PCR. Celle-ci va permettre de fusionner les deux fragments de 500 pb, ainsi on obtient un fragment de 1000 pb formé par les deux régions de 500 pb qui flanquent le gène d'intérêt. On utilise pour cela la même enzyme polymérase et le même mélange réactionnel que précédemment mais cette fois avec la matrice d'ADN composée des deux fragments de 500 pb (fragment A et B). Pour cela, les amorces 3 et 4 possèdent une séquence nucléotidique complémentaire de 24 nucléotides qui permet de faire la liaison entre les deux fragments. On utilise le couple d'amorces 2 et 5 afin d'amplifier la totalité du fragment de 1 kb. Pour cette PCR, le temps d'élongation est donc cette fois de 30 s. On purifie de nouveau le produit PCR grâce au kit « EZ-10 Spin Column PCR Products » (Bio Basic Inc) et on vérifie l'amplification du fragment par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (Figure 9, PCR 2). La bande la plus intense correspond au fragment d'ADN fusionné (A+B) ayant la taille attendue de 1000 pb.

Le fragment fusionné de 1 kb dans le vecteur pKNG101 est ensuite cloné dans le vecteur pKNG101. Les deux amorces oligonucléotidiques 2 et 5 ont été élaborées (grâce à l'utilisation du logiciel ApE 2.0) afin de générer des sites de restriction compatibles avec ceux présents sur le site multiple de clonage du vecteur pKNG101. Ces sites sont BamHI (5'ggatcc) et SpeI (5'actagt). On digère alors en parallèle le fragment de 1 kb et le vecteur pKNG101 avec les mêmes enzymes de restrictions BamHI et SpeI (New England Biolabs) pendant 1h30 à 37°C. Les produits issus de la digestion sont ensuite purifiés avec le kit commercial « EZ-10 Spin Column PCR Products » (Bio Basic Inc) et une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % permet de vérifier que l'ADN est toujours présent dans nos échantillons (Figure 9, Digestion). On réalise ensuite une ligation entre le vecteur pKNG101 linéarisé et le fragment de 1 kb digéré. Le fragment PCR est ainsi inséré dans le plasmide aux sites de restrictions compatibles. La jonction entre les deux molécules d'ADN est catalysée par l'enzyme ligase du phage T4 (New

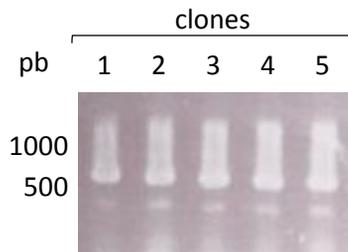


Figure 10 : Amplifications par PCR des 5 clones CC118 λ pir/pKNG101-insert(A+B).

Gel d'agarose 1% et coloration au BET.

Migration des fragments d'ADN obtenus après PCR afin de vérifier l'entrée du plasmide pKNG101 contenant l'insert A+B. Amplification avec les oligonucléotides RpKN et l'amorce 3, la taille attendue est de 600 pb.

England Biolabs). Le tout est incubé dans le tampon de la ligase (New England Biolabs) à 16°C pendant 15 h. L'insertion correcte du fragment PCR dans le plasmide sera vérifiée par PCR après transformation (voir ci-dessous).

1.2 Préparation de cellules compétentes et transformation du plasmide chez *E. coli*

Cette étape consiste en l'introduction du produit de ligation dans la souche CC118λpir d'*E. coli* (Tableau 2) rendue compétente grâce à un traitement au CaCl₂. Ce traitement rend la paroi des cellules plus poreuses ce qui facilite l'entrée du plasmide dans la cellule. Nous utilisons la souche CC118λpir car elle permet la réplication du plasmide pKNG101 grâce à l'origine de réplication λpir présente sur le pKNG101. A partir d'une pré-culture de nuit de la souche CC118λpir à transformer, on inocule 50 mL de milieu de culture riche Luria Bertani (LB) (Annexe 2) au 1/100 ème que l'on place sous agitation à 37°C. Lorsque la densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) est comprise entre 0,3 et 0,5, la culture est placée rapidement à 4°C pendant 20 min pour arrêter la croissance. La culture est ensuite centrifugée à une vitesse de 2000 *g* pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 25 mL de tampon 50 mM CaCl₂ préalablement refroidi à 4°C. Après 20 min d'incubation à 4°C, on procède ensuite à une seconde centrifugation. Le culot est alors remis en suspension dans 4 mL de tampon 50 mM CaCl₂ et 15 % glycérol froid puis laissé 20 min à 4°C avant d'être divisé en plusieurs aliquots puis de les conserver à -80°C.

Pour l'étape de transformation, 100 µL de cellules compétentes sont ajoutés à 7 µL de mélange de ligation pendant 20 min à 4°C. Puis les cellules sont soumises à un choc thermique de 2 min à 42°C et immédiatement ensuite 2 min à 4°C. On ajoute alors du milieu LB et l'on incube à 37°C pendant 1 heure pour permettre l'expression des gènes de résistance à l'antibiotique. Le pKNG101 possède une cassette de résistance à la streptomycine (*stp^R*), on peut ainsi sélectionner les colonies possédant le plasmide.

Afin de vérifier la présence de l'insert sur le plasmide on procède à une PCR avec l'enzyme « GoTaq® DNA Polymerase » (Promega) et son tampon spécifique (Figure 10). Cette enzyme est moins onéreuse que l'enzyme haute-fidélité mais a un taux d'erreurs plus élevé. Son temps d'élongation est de 1 min/kb. Nous préparons un mélange de PCR de 10 µL où l'ADN plasmidique à tester provient directement des bactéries qui sont ajoutées au mélange réactionnel grâce à un cure-dent. Le couple d'amorces utilisé s'hybride en amont et en aval

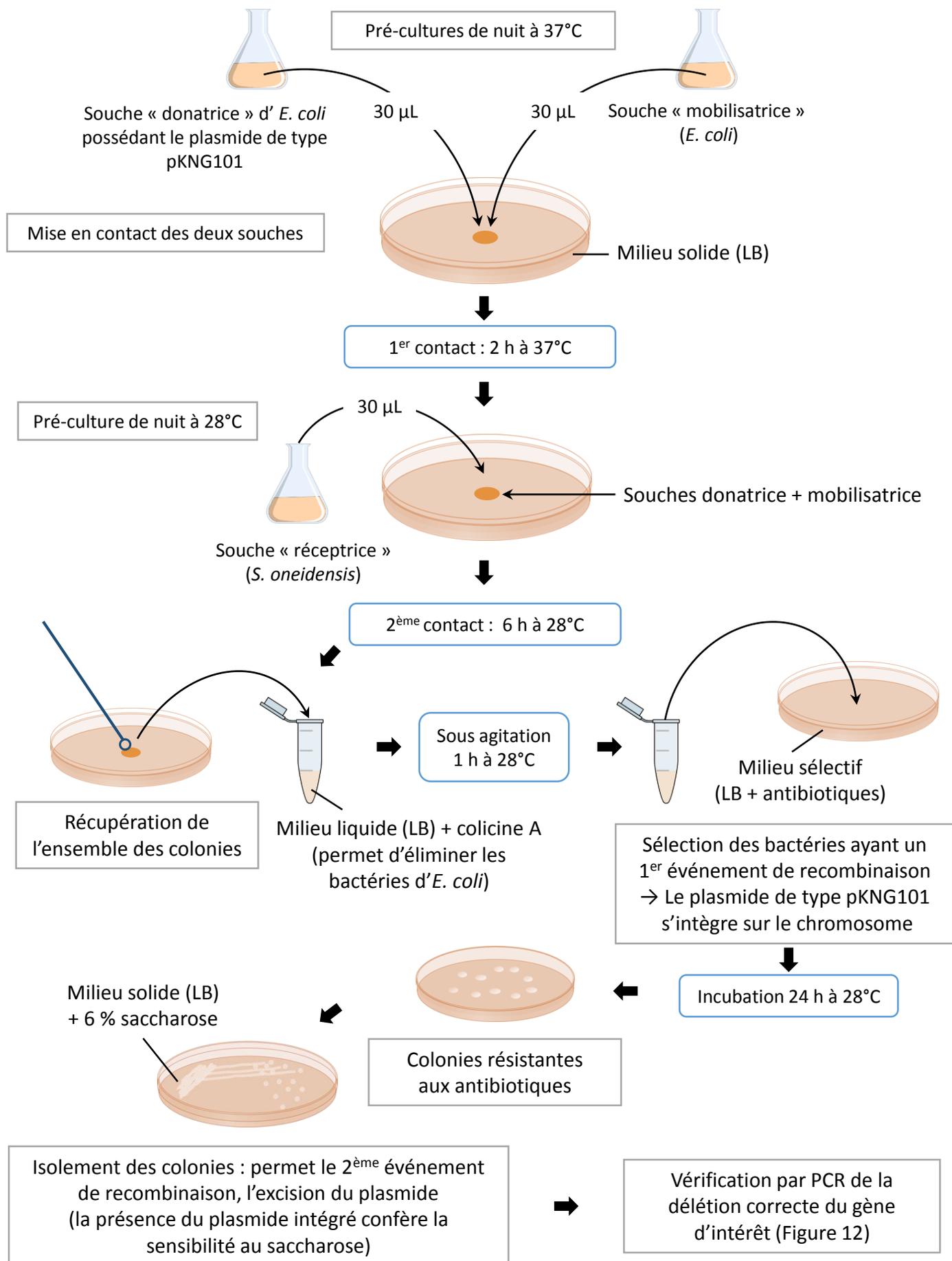


Figure 11 : Représentation schématique de la technique employée lors de l'étape de conjugaison (premier événement de recombinaison homologue) ainsi que lors de la seconde étape de recombinaison pour permettre la délétion d'un gène.

du site multiple de clonage du plasmide (RpKN et UpKN) (Figure 8 et Annexe 1). Nous utilisons donc le programme de PCR suivant : 2 min de dénaturation initiale à 95°C, suivi de 30 cycles d'amplification comprenant 30 s de dénaturation à 95°C, 30 s d'hybridation à 55°C et, comme la taille du fragment attendue est de 1200 pb, la durée d'élongation est de 1 min 30 à 72°C. La réaction est achevée par 5 minutes supplémentaires à 72 °C. Cette expérience nous permet de sélectionner grâce à la taille du fragment amplifié les clones possédant le plasmide attendu. Ces clones seront utilisés pour la suite des expériences.

1.3 Conjugaison et premier événement de recombinaison homologue

Le but de cette partie est de transférer le plasmide pKNG101 possédant le fragment de 1 kb de la souche d'*E. coli* à la souche de *S. oneidensis*. Deux souches d'*E. coli* sont utilisées, la souche CC118 λ pir dite souche « donatrice » qui possède le plasmide non répliatif chez *S. oneidensis* et la souche 1047 dite « mobilisatrice » qui contient le plasmide pRK2013 « helper » possédant les gènes codant pour les protéines nécessaires à la synthèse du pont conjugatif (Tableau 2). Après une pré-culture en milieu liquide (LB) sur la nuit, 30 μ L de chacune des souches sont mélangées et déposées sur milieu gélosé (LB agar) pendant 2h à 37°C (Figure 11). Ce temps de contact permet le transfert du plasmide « helper » dans la souche donatrice CC118 λ pir. Ensuite on rajoute sur le milieu gélosé 30 μ L de la souche *S. oneidensis* dite « réceptrice » (MR1-R) pour un contact de 6 h à 28°C (Figure 11 et Tableau 2). Ce deuxième temps de contact permet le transfert du plasmide pKNG101 recombinant grâce au pont de conjugaison vers la souche réceptrice. L'ensemble des cellules est récupéré du milieu gélosé et est mis en suspension dans 1 mL de milieu LB avec de la colicine A (toxine permettant d'éliminer les souches d'*E. coli*). Les cellules sont incubées 1h à 28°C sous agitation. Comme la souche de *S. oneidensis* MR1-R utilisée dans notre laboratoire est résistante à la rifampicine (Tableau 2), on sélectionne les conjugants à 28°C sur milieu solide gélosé (LB agar) contenant de la rifampicine (10 μ g/mL) et de la streptomycine (100 μ g/mL) (Annexe 2). Le plasmide pKNG101 n'étant pas répliatif chez *S. oneidensis*, l'insertion du plasmide dans le chromosome doit s'effectuer afin de donner la résistance à la streptomycine à la cellule. Théoriquement, on peut observer deux types d'insertion du plasmide dans le chromosome de *Shewanella oneidensis* (Figure 8). En effet, il peut y avoir recombinaison par les fragments de 500 pb « A » (première possibilité) ou « B » (seconde possibilité).

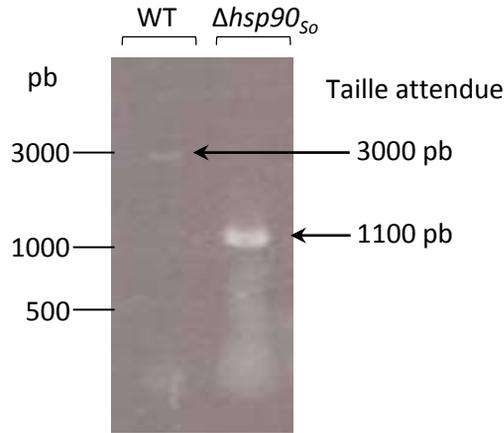


Figure 12 : Amplifications par PCR pour vérifier l'excision du plasmide sur le chromosome de *S. oneidensis*.
 Gel d'agarose 1% et coloration au BET.
 Migration des fragments d'ADN obtenus après PCR avec l'utilisation des oligonucléotides 1 et 5, taille attendue 3000 pb pour le sauvage et 1100 pb pour $\Delta hsp90_{so}$

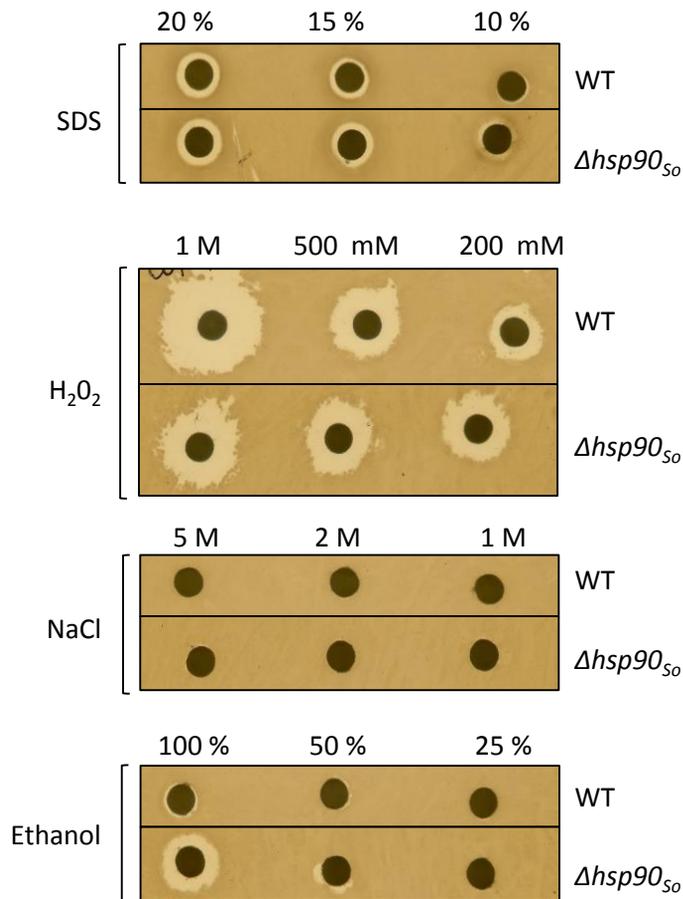


Figure 13 : Recherche de conditions de stress pour observer un phénotype de la souche $\Delta hsp90_{so}$ à 28°C.
 Boîtes de Pétri contenant du LB agar sur lesquelles on étale 500 μ l de culture bactérienne de la souche sauvage ou de la souche $\Delta hsp90_{so}$. Une goutte de 2 μ l des différentes concentrations de SDS, d'eau oxygénée (H_2O_2), de NaCl ou d'éthanol a été déposée sur un disque de papier « Watman ». Les boîtes sont incubées 24h à 28°C.

1.4 Deuxième événement de recombinaison

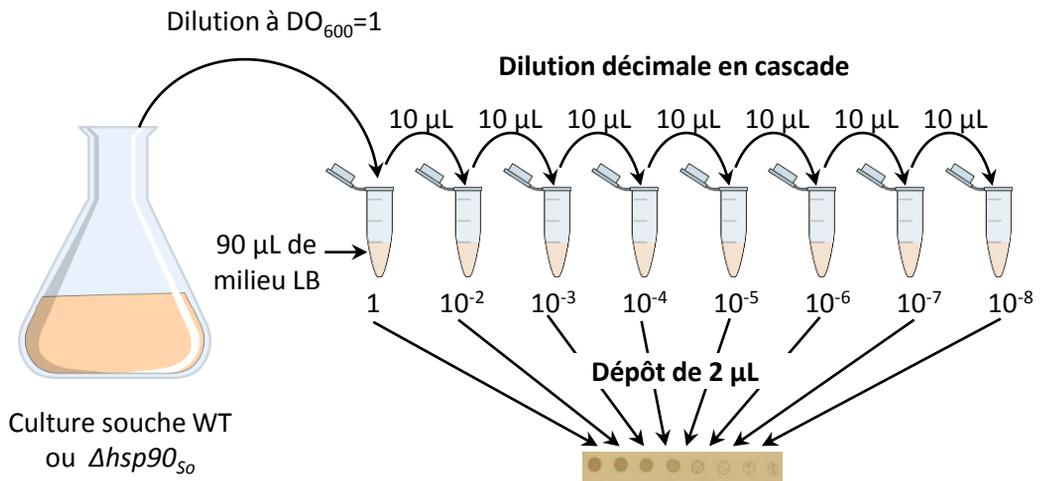
Les clones récupérés dans l'étape précédente contiennent le plasmide qui est inséré dans le chromosome (Figure 8). Afin d'enlever le gène *hsp90_{so}* il faut refaire sortir le plasmide du chromosome par une nouvelle étape de recombinaison, on parle alors d'excision. Pour cela on utilise le fait que le plasmide pKNG101 possède le gène *sacB* rendant les bactéries sensibles au saccharose. Les cellules résistantes à la streptomycine sont donc étalées sur milieu gélosé (LB agar) contenant 6 % de saccharose et les milieux sont incubés 2 jours à 16°C puis 1 jour à 28°C. Pour survivre, la cellule doit éliminer la séquence plasmidique de son chromosome. Deux possibilités de recombinaison sont possibles, soit la souche redevient sauvage, soit la souche perd le gène d'intérêt (Figure 8). Afin de différencier les deux souches, on teste les colonies par PCR en utilisant l'enzyme GoTaq® (Promega) selon le même programme qu'explicité précédemment (paragraphe I.1.2, page 22) avec cette fois un temps d'élongation de 3 min. On effectue la PCR avec les amorces 1 et 5 qui s'hybrident en amont et en aval du gène *hsp90_{so}* (Figure 8) afin de vérifier l'absence du gène *hsp90_{so}* dans les souches (Figure 12). Deux tailles de fragment peuvent être obtenues, soit un fragment dit « sauvage » (WT) avec une taille de 3000 pb, soit le fragment mutant « $\Delta hsp90_{so}$ » avec pour taille 1100 pb. On congèle ensuite à -80°C les clones possédant la bonne taille de fragment (Figure 12).

2. Croissance du mutant $\Delta hsp90_{so}$ dans différentes conditions de stress.

Le mutant de délétion $\Delta hsp90_{so}$ chez *S. oneidensis* est donc construit, nous avons recherché un phénotype de croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}$ par rapport à la souche sauvage en testant différentes conditions de stress. Les paragraphes suivants détaillent les conditions et résultats obtenus pour les différentes conditions testées : stress oxydants, présence de détergent ou d'éthanol, variation de la salinité ou de la température et croissance en absence d'oxygène.

Tout d'abord, nous avons mis les souches $\Delta hsp90_{so}$ et WT en présence de détergent : SDS (10 %, 15 % et 20 %) ; en conditions oxydantes : H₂O₂ (200 mM, 500 mM et 1 M) ; en présence d'une forte concentration en sel : NaCl (1 M, 2 M et 5 M) ; en présence d'alcool : éthanol (25 %, 50 % et 100 %) (Figure 13). Pour cela, à partir d'une culture en milieu LB des souches sauvage (WT) ou mutante ($\Delta hsp90_{so}$) d'une DO₆₀₀=6, on dépose 500 µL que l'on étale sur une boîte de milieu LB gélosé pour obtenir un tapis bactérien. Puis on y dépose un disque

A.



B.

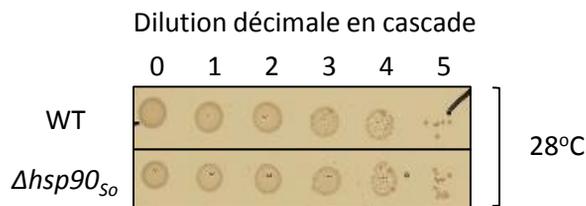


Figure 14 : Croissance de la souche sauvage ou $\Delta hsp90_{So}$ en anaérobiose à 28°C.

A. Schéma représentatif d'une dilution décimale en cascade et du dépôt des gouttes sur milieu gélosé LB.

B. Boîte de Pétri contenant du LB agar $\frac{1}{4}$ avec du fumarate (20 mM) et du lactate (20 mM) sur laquelle on dépose des gouttes de 2 μ L de différentes dilutions de cultures bactériennes de la souche sauvage ou $\Delta hsp90_{So}$ que l'on incube à 28°C en anaérobiose pendant 24h.

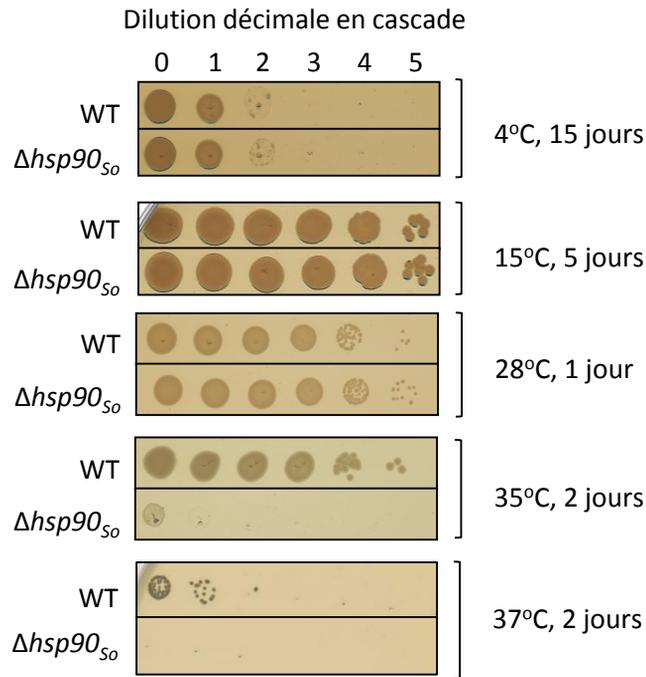
de papier « Whatman » sur lequel on ajoute 2 μL de la solution à tester (SDS, H_2O_2 , NaCl ou éthanol). Après incubation à 28°C pendant 24 h, aucune différence de croissance entre les souches WT ou $\Delta hsp90_{So}$ n'est observée (Figure 13), hormis une légère différence en présence d'éthanol 100 %. En effet, pour la souche $\Delta hsp90_{So}$ on observe un halo d'inhibition de croissance légèrement plus important que pour la souche WT. Cependant, cette observation ne s'est pas avérée reproductible lorsque j'ai refait cette expérience. Aucune de ces conditions n'a donc mené à la découverte d'un phénotype de croissance de la souche $\Delta hsp90_{So}$ par rapport à la souche sauvage.

Pour tester l'anaérobiose, j'ai d'abord fait une pré-culture des souches WT et $\Delta hsp90_{So}$ en aérobie à 28°C. Puis les souches ont été diluées pour atteindre la même densité optique ($\text{DO}_{600}=1$), et j'ai ensuite réalisé des dilutions décimales en cascade (Figure 14 A). 2 μl de chaque dilution ont été déposés sur milieu gélosé LB $\frac{1}{4}$ contenant 20 mM de lactate (donneur d'électrons) et 20 mM de fumarate (accepteur d'électrons). Les boîtes de Pétri ainsi inoculées ont été incubées à 28°C en jarre d'anaérobiose pendant 24 h. Dans cette condition d'anaérobiose, aucune différence de croissance n'a été observée entre la souche sauvage et la souche $\Delta hsp90_{So}$ (Figure 14 B).

Comme aucun phénotype significatif de croissance n'a été mis en évidence dans ces conditions expérimentales, nous avons décidé de modifier les températures de croissance pour produire un stress thermique. Nous avons testé des températures basses (4°C et 15°C) et hautes (35°C et 37°C). Pour cela, des suspensions des souches WT et $\Delta hsp90_{So}$ ont été produites en milieu LB en aérobie à 28°C, et ramenées par dilution à la même densité optique ($\text{DO}_{600}=1$). Ensuite, comme présenté précédemment (Figure 15 A), des dilutions décimales en cascade de ces suspensions sont réalisées et 2 μl de chaque dilution sont déposés sur milieu gélosé (LB agar) puis incubés aux différentes températures (Figure 15 A).

C'est uniquement aux températures de 35°C et 37°C que l'on observe un phénotype remarquable pour la souche $\Delta hsp90_{So}$ qui présente un défaut de croissance par rapport à la souche WT (Figure 15 A). En effet la formation de colonies de la souche mutée est affectée pour des températures à partir de 35°C. A 37°C la croissance de la souche sauvage est également très affectée. Nous avons ainsi choisi de nous intéresser au phénotype de croissance à 35°C car la souche sauvage n'est pas affectée à cette température.

A.



B.

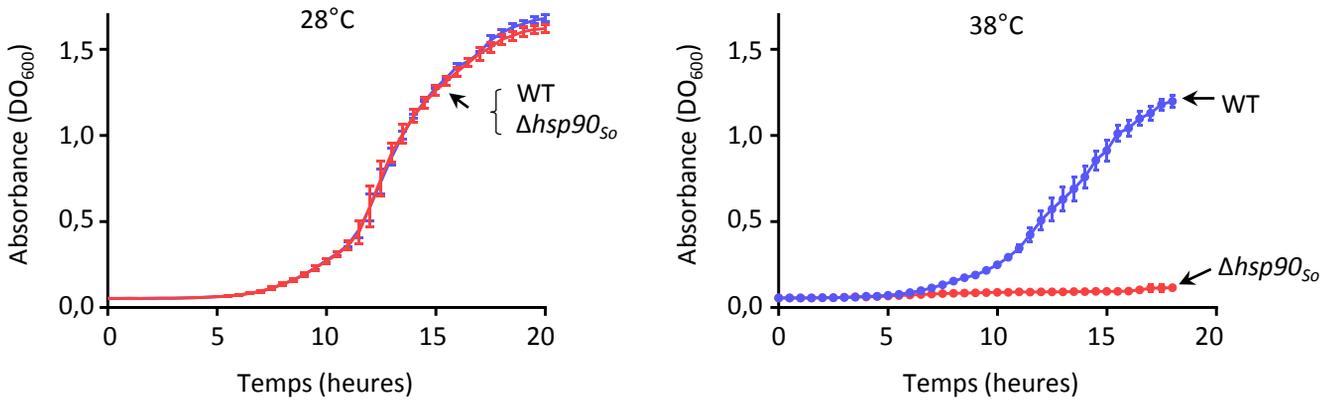


Figure 15 : Recherche d'une température stressante pour observer un phénotype de la souche $\Delta hsp90_{So}$ à différentes températures, en milieu liquide ou solide.

- A. Boîtes de Pétri contenant du LB agar sur lesquelles on dépose des gouttes de 2 μ l de différentes concentrations de cultures bactériennes de la souche sauvage ou $\Delta hsp90_{So}$. Ces boîtes ont été incubées à différentes températures pendant le temps indiqué.
- B. Suivi de croissance en milieu liquide (LB) des souches WT et $\Delta hsp90_{So}$ par mesure de l'absorbance à 600 nm au cours du temps à 28°C ou 38°C. Les valeurs montrées représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes avec leurs barres d'erreur.

Nous pouvons ainsi voir pour la première fois chez les bactéries que la souche mutante $\Delta hsp90_{so}$ ne pousse pas à cette température par comparaison avec la souche sauvage (WT). Cela signifie donc que Hsp90_{so} pourrait jouer un rôle majeur pour la survie de *S. oneidensis* à haute température.

Le même phénotype de croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}$ à haute température a été observé en culture liquide (Figure 15 B). Pour cela, les souches WT et $\Delta hsp90_{so}$ ont été cultivées en aérobiose à 28°C, puis diluées à DO₆₀₀=0,0005. Les cultures ont été transférées dans une microplaque 96 puits. Un lecteur microplaque Tecan Spark 10M a permis d'incuber les cultures à 28°C ou à 38°C sous agitation et de mesurer la DO₆₀₀ au cours du temps.

Nous avons d'abord observé que les deux souches poussent de façon similaire à 28°C. Par contre la souche $\Delta hsp90_{so}$ est incapable de croître à 38°C alors qu'à cette température la souche sauvage pousse aussi bien qu'à 28°C.

3. Construction du plasmide $phsp90_{so}$ permettant de produire Hsp90_{so} *in vivo*

Nous avons ensuite voulu confirmer par une expérience de complémentation que le phénotype de croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}$ observé à 35°C était bien dû à l'absence d'Hsp90_{so}. Pour cela, nous avons construit un plasmide permettant la surproduction d'Hsp90_{so} chez *S. oneidensis*. Ainsi la souche $\Delta hsp90_{so}$ produit à nouveau la protéine Hsp90_{so} et le phénotype de croissance ne doit donc plus être observé à haute température.

Nous avons donc cloné le gène *hsp90_{so}* dans le vecteur pBAD33. Ce vecteur permet de cloner le gène *hsp90_{so}* au niveau de son site multiple de clonage sous contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. Le vecteur porte également une cassette de résistance au chloramphénicol (Annexe 1).

Le gène *hsp90_{so}* à cloner est amplifié par PCR à partir du chromosome de *S. oneidensis* grâce à l'utilisation de l'ADN polymérase à haute-fidélité Q5. On utilise le même mélange PCR que vu précédemment avec un temps d'élongation de 1 min pendant 25 cycles (voir paragraphe I.1.1, page 20). Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier le gène d'intérêt correspondent aux extrémités 5' et 3' de la région codante du gène (Annexe 1) et comportent les sites de restrictions XmaI (5'cccggg) pour l'amorce s'hybridant à l'extrémité 5' et XbaI (5'tctaga) pour l'amorce à l'extrémité 3' (Figure 16). Les produits PCR obtenus sont

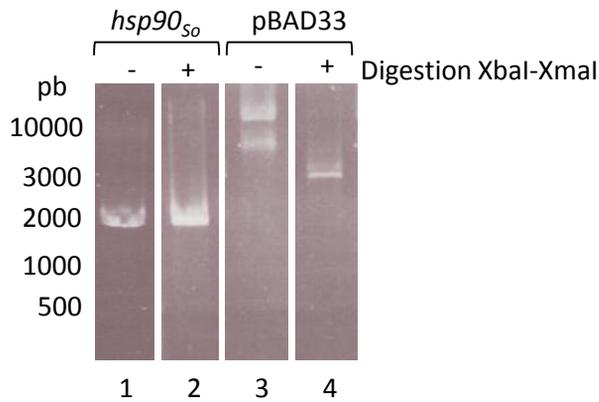


Figure 16 : Amplifications par PCR pour le clonage du gène *hsp90_{so}* dans le pBAD33.

Migration des fragments d'ADN obtenus après PCR, gel d'agarose 1% et coloration au BET.

(1) Visualisation du gène *hsp90_{so}* après amplification par PCR du fragment d'ADN (taille attendue 1914 pb).

(2) Vérification de la présence du gène *hsp90_{so}* après avoir été digéré par les enzymes de restriction XmaI et XbaI.

(3) Le plasmide pBAD33 est purifié et déposé sur gel avant d'être digéré avec les enzymes de restrictions XmaI et XbaI (4).

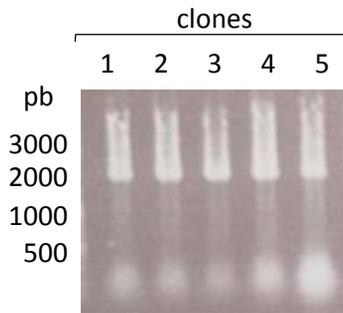


Figure 17 : Amplifications par PCR des 5 clones C600/*phsp90_{so}*.

Gel d'agarose 1% et coloration au BET

Migration des fragments d'ADN obtenus après PCR afin de vérifier l'entrée du plasmide pBAD33 contenant le gène *hsp90_{so}* (*phsp90_{so}*), la taille attendue est d'environ 2000 pb.

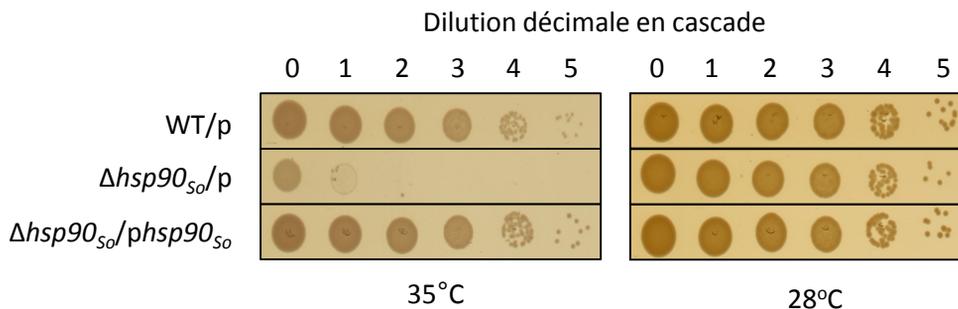


Figure 18 : La souche $\Delta hsp90_{so}/phsp90_{so}$ est capable de pousser à 35°C.

Boîtes de Pétri contenant du LB agar et 0,02% d'arabinose sur laquelle on dépose des gouttes de 2 μ l de différentes concentrations de cultures bactériennes de la souche WT/p, $\Delta hsp90_{so}/p$ (contenant le vecteur vide pBAD33) et $\Delta hsp90_{so}/phsp90_{so}$ que l'on incube à 35°C ou 28°C.

ensuite purifiés avec le kit « EZ-10 Spin Column PCR Products » (Bio Basic Inc). On digère le vecteur pBAD33 et le produit PCR avec les mêmes enzymes de restrictions XmaI-XbaI pendant 1h30 à 37°C (Figure 16).

Ainsi, le clonage peut être réalisé entre le fragment d'ADN codant pour *hsp90_{so}* et le vecteur d'expression pBAD33 linéarisé, qui ont des sites de restriction compatibles. Pour cela nous utilisons l'ADN ligase du phage T4. On transforme ensuite le plasmide pBAD33 contenant *hsp90_{so}* (*phsp90_{so}*) dans la souche C600 d'*E. coli* (Tableau 2) rendue compétente par un traitement au CaCl₂ (comme vu précédemment). On teste ensuite les différents clones obtenus lors de la transformation par PCR avec l'enzyme GoTaq®, un temps d'élongation de 2 min, l'une des amorces s'hybridant sur le plasmide en amont du site multiple de clonage et l'autre sur le gène *hsp90_{so}* (extrémité 3') (Figure 17). Ensuite nous vérifions le clonage par séquençage de la région clonée grâce aux deux amorces s'hybridant sur le plasmide pBAD33 (GATC Biotech). Les clones ayant la séquence attendue sont congelés à -80°C.

Le plasmide *phsp90_{so}* a ensuite été introduit par conjugaison dans la souche $\Delta hsp90_{so}$ de *S. oneidensis* ($\Delta hsp90_{so}/phsp90_{so}$). Le vecteur vide pBAD33 (p) a lui été introduit dans les souches WT (WT/p) et mutante ($\Delta hsp90_{so}/p$) (Figure 18). Comme attendu, la croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}/p$ est très altérée (Figure 18), de façon comparable à la souche $\Delta hsp90_{so}$ (Figure 15 A). Par contre, la souche $\Delta hsp90_{so}/phsp90_{so}$ pousse aussi bien à 35°C qu'à 28°C comme la souche WT/p.

Ces résultats confirment l'importance du gène *hsp90_{so}* chez la bactérie *S. oneidensis* pour sa survie en conditions de stress thermique et suggèrent fortement que la protéine Hsp90_{so} joue un rôle central au sein de la cellule dans ces conditions.

4. Inhibition de la croissance de la souche sauvage en présence d'inhibiteurs d'Hsp90

Comme expérience complémentaire prouvant l'implication de la protéine fonctionnelle Hsp90_{so} pour ce phénotype, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de Hsp90 : la geldanamycine (GA) et le radicicol (RD). Ces inhibiteurs se fixent au site de liaison de l'ATP présent sur le domaine N-terminal d'Hsp90 (Taldone *et al.*, 2009; Jhaveri *et al.*, 2012). Ces interactions inhibent alors la fonction chaperon de Hsp90 qui ne peut plus hydrolyser l'ATP. Les deux inhibiteurs ont été utilisés lors d'un suivi de croissance en milieu liquide LB à 28°C ou 38°C. Les inhibiteurs achetés en poudre (Sigma) ont été solubilisés dans du DMSO

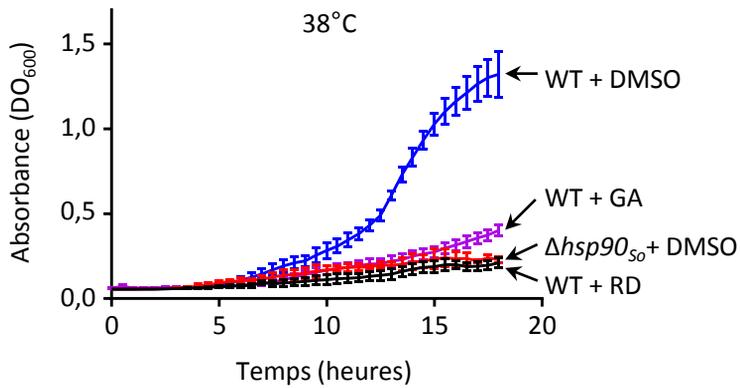
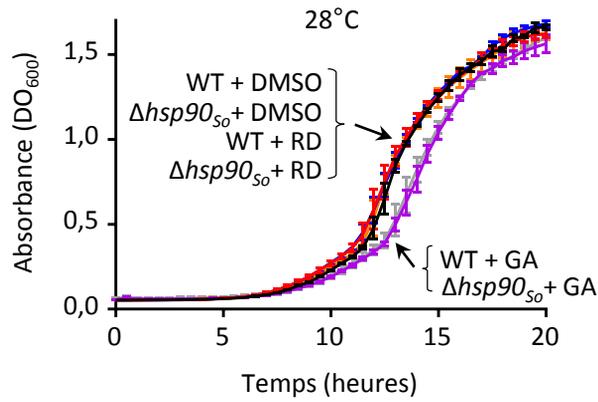


Figure 19 : Inhibition de la croissance de la souche sauvage à 38°C en présence de geldanamycine et de radicicol en milieu liquide.

Suivi de croissance des souches WT et $\Delta hsp90_{so}$ par mesure de l'absorbance à 600 nm au cours du temps à 28°C ou 38°C. On ajoute 30 μ M de geldanamycine (GA), 100 μ M de radicicol (RD), ou du DMSO (contrôle négatif) au milieu de culture LB. Les valeurs montrées représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes avec leurs barres d'erreur.

100 % et ajoutés à une concentration de 30 μM pour la geldanamycine et 100 μM pour le radicicol dans le milieu de culture LB. Les souches diluées à $\text{DO}_{600}=0,0005$ ont été incubées à 28°C ou 38°C et leur croissance a été suivie en mesurant la DO_{600} avec un lecteur de microplaque (Tecan Spark 10M) au cours du temps (Figure 19). On peut voir que la croissance de la souche sauvage n'est pas affectée par la présence de DMSO à 28°C ou à 37°C. **Cependant, lorsqu'on ajoute de la geldanamycine ou du radicicol dans le milieu de culture, la croissance de la souche WT à haute température est très fortement affectée, de façon comparable à la croissance de la souche Δhsp90_{so} .** Ces résultats permettent donc de confirmer une nouvelle fois que c'est la présence de Hsp90_{so} fonctionnelle dans la cellule qui permet la croissance à haute température de la bactérie *Shewanella oneidensis*.

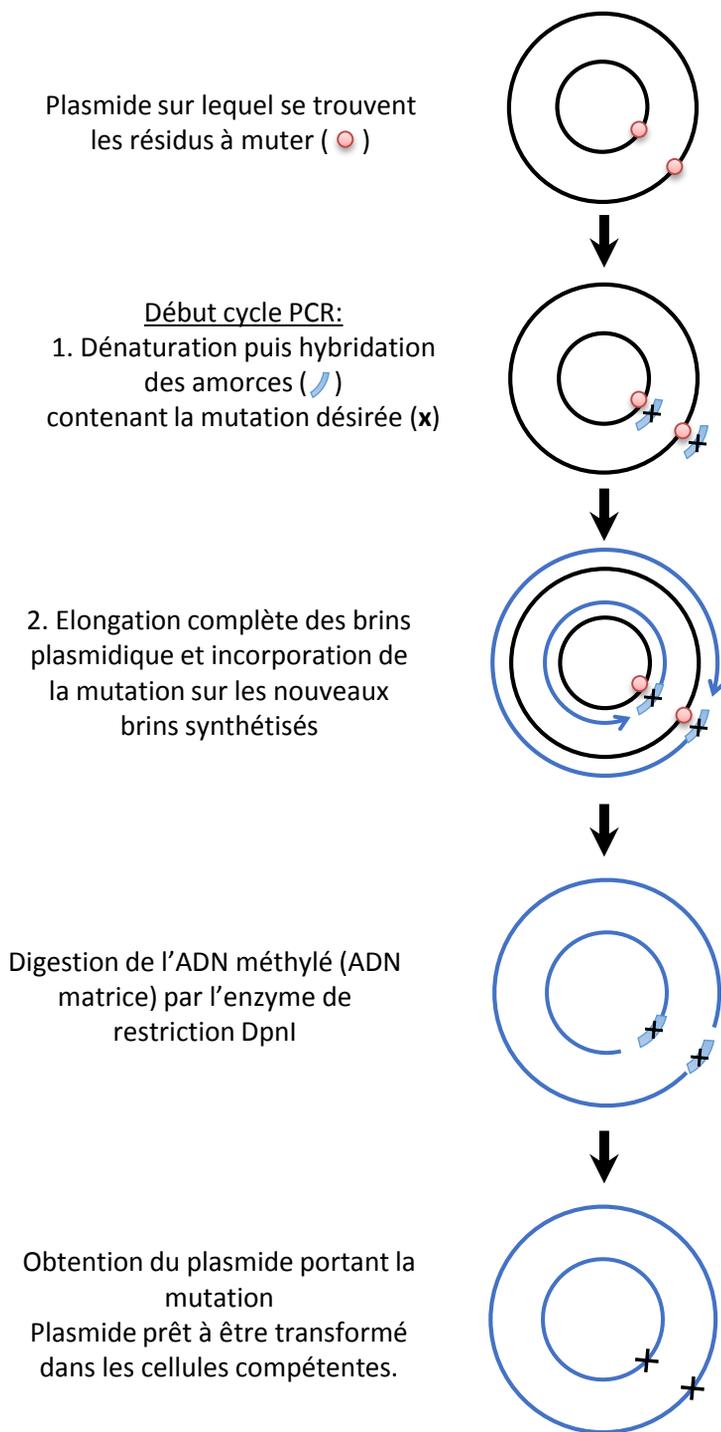


Figure 20 : Représentation schématique de la méthode utilisée pour engendrer une mutation dirigée sur un plasmide.

Le plasmide contenant les résidus à muter est représenté par un double cercle noir. Les deux amorces complémentaires utilisées constituées chacune de 27 nucléotides et portant la mutation s'hybrident sur le plasmide, puis l'enzyme PfuTurbo® permet l'élongation complète du plasmide représenté en bleu. L'ajout de l'enzyme DpnI permet de digérer le plasmide « matrice » afin de conserver que le plasmide possédant la mutation.

Schéma inspiré du protocole PfuTurbo®DNA Polymerase (Agilent)

II. Etude de mutants ponctuels dans les régions fonctionnelles d'Hsp90_{So}

Nous connaissons donc maintenant un phénotype lié à l'absence d'Hsp90 chez *S. oneidensis*. Cette découverte majeure nous donne maintenant la possibilité, en nous basant sur les études préalablement menées sur Hsp90 chez les eucaryotes et *E. coli*, de cibler les résidus d'Hsp90_{So} qui pourraient être importants pour sa fonction de chaperon. Ainsi, pour la première fois on pourra tester l'importance des régions fonctionnelles d'Hsp90 bactérien *in vivo*. Pour cela, nous avons donc réalisé de la mutagenèse dirigée.

1. Mutagenèse dirigée sur Hsp90_{So}

Cette technique permet de muter spécifiquement une ou plusieurs bases du gène *hsp90_{So}* présent sur le plasmide *phsp90_{So}*. La même approche sera également utilisée plus tard pour muter le gène *hsp90_{So}* cloné dans d'autres plasmides. Nous utilisons deux amorces complémentaires de 27 nucléotides chacune constituées du codon muté au centre de l'oligonucléotide et de 4 codons de part et d'autre du codon muté. Les 4 codons de part et d'autre du codon muté s'hybrident avec la séquence nucléotidique encadrant le codon muté. Par une PCR, l'intégralité du plasmide est amplifiée à partir de ces deux amorces (Figure 20). Pour cela, le mélange de PCR de 50 µL contient 50 ng d'ADN plasmidique, 30 ng de chacune des amorces du couple d'amorces, 1 mM des quatre différents dNTP, ainsi que 2,5 unités d'ADN polymérase PfuTurbo® (Agilent) et son tampon spécifique. Le programme de PCR suivant a été utilisé : 2 min de dénaturation initiale à 95°C suivi de 15 cycles d'amplification comprenant 30 s de dénaturation à 95°C, 30 s d'hybridation à 55°C et 1 min/kb d'élongation à 72°C. La réaction est achevée par 10 minutes supplémentaires à 72°C. Il faut ensuite éliminer le plasmide d'origine (donc sauvage) contenu dans le produit de PCR en ajoutant 1 µL d'enzyme de restriction DpnI (New England Biolabs) qui digère l'ADN méthylé sur les sites GATC (l'ADN plasmidique) en 1h à 37°C. Le plasmide portant la mutation dirigée peut alors être transformé dans les cellules compétentes (dans la souche C600 ou BI21(DE3) selon le plasmide).

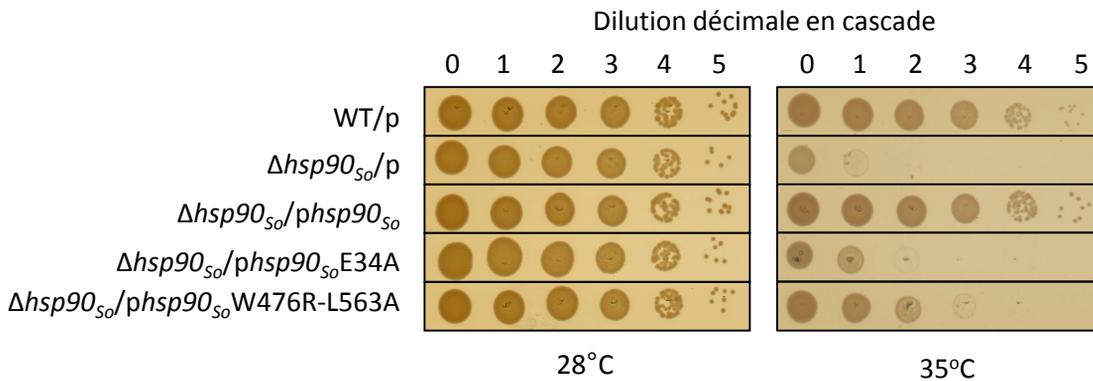


Figure 21 : La production des protéines mutantes Hsp90_{so} E34A et Hsp90_{so} W476R-L563A ne permet pas de restaurer le phénotype de croissance à 35°C de la souche $\Delta hsp90_{so}$.

Boîte de Pétri contenant du LB agar et 0,02% d'arabinose sur laquelle on dépose des gouttes de 2 μ l des différentes dilutions des cultures bactériennes de la souche WT/p, $\Delta hsp90_{so}$ /p (contenant le vecteur vide pBAD33), $\Delta hsp90_{so}$ /p*hsp90_{so}*, $\Delta hsp90_{so}$ /p*hsp90_{so}*E34A et $\Delta hsp90_{so}$ /p*hsp90_{so}*W476R-L563A que l'on incube à 28°C ou 35°C.

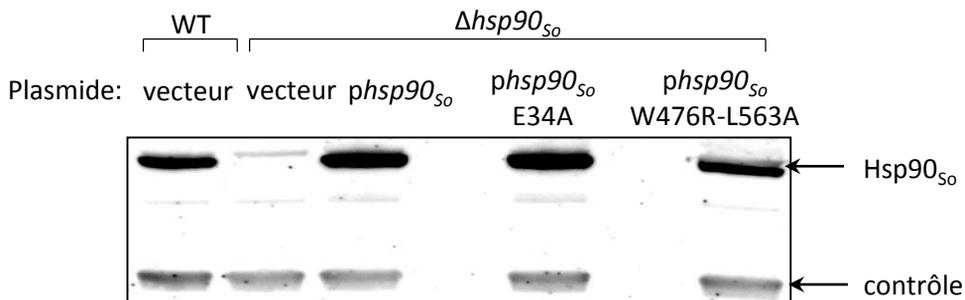


Figure 22 : La protéine Hsp90_{so} est surproduite en même quantité dans la souche sauvage que dans les souches $\Delta hsp90_{so}$ /p*hsp90_{so}*, $\Delta hsp90_{so}$ /p*hsp90_{so}*E34A et $\Delta hsp90_{so}$ /p*hsp90_{so}*W476R-L563A.

Western Blot montrant la quantité de Hsp90_{so} produite à partir d'extraits recueillis après une croissance des souches à 28°C en milieu LB en présence de 0,02% d'arabinose. La protéine Hsp90_{so} est reconnue spécifiquement grâce aux anticorps anti-Hsp90_{EC}. La bande « contrôle » correspond à une protéine non spécifique détectée par les anticorps et montrant la même quantité d'extraits chargés dans les puits du gel.

2. Etude du mutant Hsp90_{So} E34A

La première région fonctionnelle d'Hsp90_{So} que nous avons voulu cibler est la région permettant l'hydrolyse de l'ATP. Des études menées précédemment ont montré que l'activité ATPase de Hsp90 chez les eucaryotes était essentielle pour son rôle de chaperon (Obermann *et al.*, 1998). En effet, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine Hsp82 (homologue à Hsp90) a été mutée au niveau du résidu glutamate 33 (E33) en alanine (A). Les résultats ont montré que cette mutation affecte fortement l'hydrolyse de l'ATP (Panaretou *et al.*, 1998). Les mêmes résultats ont été montrés chez la bactérie *E. coli* où le résidu E34 de Hsp90_{Ec} (homologue à E33 de Hsp82) a été substitué en A (Figure 4) (Graf *et al.*, 2009). Il semblait donc intéressant de muter de la même façon le résidu E34 de Hsp90_{So}. Nous avons donc utilisé la méthode de mutagenèse dirigée expliquée précédemment pour construire le plasmide *phsp90_{So}E34A* et ce plasmide a été introduit dans la souche $\Delta hsp90_{So}$.

Nous avons voulu savoir si l'absence d'activité ATPase chez Hsp90_{So} pouvait affecter la survie de la bactérie lors d'un stress thermique. En testant la croissance de la souche $\Delta hsp90_{So}/phsp90_{So}E34A$ à 35°C, nous avons pu observer que le défaut de croissance de la souche $\Delta hsp90_{So}/p$ n'est pas restauré par la production de la protéine Hsp90_{So}E34A, contrairement à la souche produisant Hsp90_{So} sauvage (Figure 21). **Ce résultat montre que, comme chez les eucaryotes, l'hydrolyse de l'ATP est importante pour la fonction de la protéine Hsp90_{So} in vivo à haute température.** Nous avons reproduit la même expérience à 28°C, et aucune différence de croissance n'a été observée entre les différentes souches puisque Hsp90_{So} n'est pas indispensable à cette température (Figure 21).

Par ailleurs, nous avons également vérifié que les quantités de protéines surproduites à haute température étaient les mêmes (Figure 22). Pour cela, des cultures de nuit des souches WT/p, $\Delta hsp90_{So}/p$, $\Delta hsp90_{So}/phsp90_{So}$ et $\Delta hsp90_{So}/phsp90_{So}E34A$, incubées à 28°C en aérobiose, ont été diluées pour obtenir une DO₆₀₀=0,05 puis à nouveau incubées sous agitation pendant la nuit en présence de 0,02 % d'arabinose. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation 5 min à 30 000 g et remises en suspension dans l'eau ultra pure et du tampon de charge appelé TSTD (Annexe 2). Ensuite, les échantillons sont chauffés 5 min à 95°C et déposés sur gel polyacrylamide-SDS 4-12 % Bis Tris Plus (Invitrogen) afin de séparer les protéines selon leur taille. La migration des échantillons s'effectue à 200 volts pendant 30 min. On procède ensuite à un Western blot : les protéines sont électrotransférées sur une

Tableau 3 : Caractéristiques des gènes et des protéines correspondantes de *S. oneidensis* utilisés lors de cette étude.

Nom du gène	Code du gène	Taille du gène (pb)	Nom de la protéine	Taille de la protéine (aa)	Masse molaire (Da)
<i>hsp90_{So}</i>	SO_2016	1914	Hsp90 _{So}	637	71769
<i>tilS</i>	SO_1645	1395	TilS	464	52125
<i>ybbN</i>	SO_2017	864	YbbN	287	31780

membrane de nitrocellulose Amersham Protran (GE Healthcare) avec une taille de pore de 0,45 µm. Le transfert s'effectue avec la cassette Pierce Power (Thermo) selon le programme et dans le tampon (1-Step transfer buffer) du fabricant. Des anticorps anti-Hsp90_{Ec} (Genest *et al.*, 2013) sont ensuite utilisés pour détecter la présence de la protéine Hsp90_{So} qui est révélée sur la membrane par chimioluminescence en utilisant le kit « Western Pico Super Signal™ » et l'appareil ImageQuant (Annexe 2). Le résultat présenté dans la figure 22 montre que la protéine mutante Hsp90_{So}E34A est produite en même quantité que la protéine sauvage Hsp90_{So} et donc que l'absence de complémentation du phénotype de croissance de la souche $\Delta hsp90_{So}$ par la protéine mutante est due à l'absence d'activité ATPase, et non à une diminution de la quantité de protéine.

Nous avons voulu nous assurer expérimentalement que la protéine Hsp90_{So}E34A purifiée ne possède très probablement plus d'activité ATPase. J'ai donc mesuré les activités ATPase des protéines purifiées Hsp90_{So} WT et E34A. Pour cela, il a d'abord fallu cloner le gène *hsp90_{So}* dans un vecteur (pET24b) permettant la surproduction d'Hsp90_{So} sauvage dans la souche *E. coli* BL21(DE3) (Tableau 2). Puis ensuite construire la mutation E34A par mutagenèse dirigée et purifier les deux protéines (sauvage et mutante). Les paragraphes suivant expliquent ces différentes étapes.

2.1 Production des protéines Hsp90_{So} et Hsp90_{So}E34A

a. Clonage du gène *hsp90_{So}* dans le vecteur pET24b

J'ai cloné le gène codant pour la protéine Hsp90_{So} (Tableau 3), avec une étiquette (ou tag) 6His (6 histidines) en position N-terminale, dans le vecteur pET24b pour obtenir le plasmide pET24 6His *hsp90_{So}*. L'étiquette facilite ensuite la purification de la protéine.

Nous avons donc amplifié le gène *hsp90_{So}* avec : (i) une amorce « forward » comportant le site de restriction NdeI, un codon ATG, une étiquette 6His (CAC x6), et le début de la séquence codante pour le gène *hsp90_{So}*, et (ii) une amorce « reverse » comportant le site de restriction SacI et la fin de la séquence codante de *hsp90_{So}* (Annexe 1).

On utilise l'enzyme à haute-fidélité Q5, avec son tampon spécifique et un temps d'élongation de 1 min pendant 25 cycles. Le fragment PCR obtenu est ensuite purifié avec le kit « EZ-10 Spin Column PCR Products » (Bio Basic Inc). Puis, le fragment PCR et le vecteur pET24b sont digérés avec les enzymes de restrictions NdeI et SacI pendant 1h30 à 37°C. On

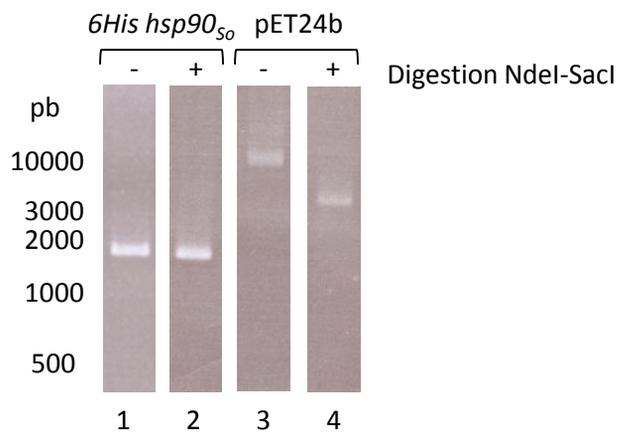


Figure 23 : Amplifications par PCR pour la construction du plasmide pET24 6His Hsp90_{so}.

Migration des fragments d'ADN obtenus après PCR, gel d'agarose 1% et coloration au BET.

(1) Visualisation du gène 6His *hsp90_{so}* après amplification par PCR du fragment d'ADN (taille attendue 1932 pb).

(2) Vérification de la présence du gène 6His *hsp90_{so}* après avoir été digéré par les enzymes de restriction NdeI et SacI.

(3) Le plasmide pET24 est purifié et déposé sur gel avant d'être digéré par les enzymes de restrictions NdeI et SacI (4).

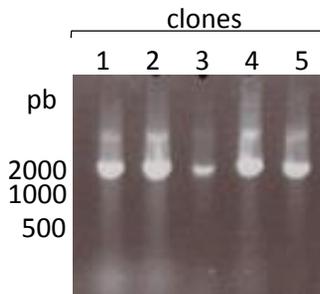


Figure 24 : Amplifications par PCR des 5 clones BL21(DE3)/pET24 6His Hsp90_{so}.

Gel d'agarose 1% et coloration au BET.

Migration des fragments d'ADN obtenus après PCR afin de vérifier l'entrée du plasmide pET24 contenant la séquence codante pour la protéine Hsp90_{so} avec une étiquette 6His en position N-terminale (pET24 6His Hsp90_{so}), la taille attendue est d'environ 2000 pb.

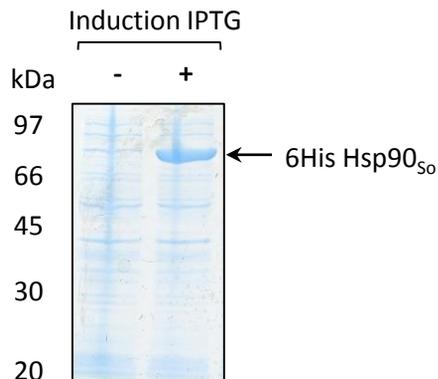


Figure 25 : Surproduction de la protéine 6His Hsp90_{so}.

Gel polyacrylamide-SDS 4-12%, coloration au bleu de Coomassie (InstantBlue).

Migration par électrophorèse des protéines contenues dans l'extrait protéique avant ou après induction à l'IPTG pendant 3h à 37°C. Après induction, apparition d'une bande supplémentaire à la taille attendue (71 kDa) montrant la surproduction de la protéine 6His Hsp90_{so}.

purifié à nouveau les fragments d'ADN avec le kit « EZ-10 Spin Column PCR Products » (Bio Basic Inc) et une ligation entre le vecteur et le fragment PCR est effectuée grâce à l'enzyme ligase du phage T4 (Figure 23).

Le produit de ligation est ensuite transformé dans la souche *E. coli* C600 (Tableau 2). On vérifie par PCR que la souche a bien inséré le plasmide en utilisant l'enzyme GoTaq et un temps d'élongation de 3 min pendant 30 cycles avec l'amorce dans le sens 5' (T7pro) s'hybridant sur le plasmide et dans le sens 3' s'hybridant sur la fin de la séquence du gène *hsp90_{So}* (Figure 24 et Annexe 1). Les clones ayant une taille de 2000 pb sont congelés à -80°C.

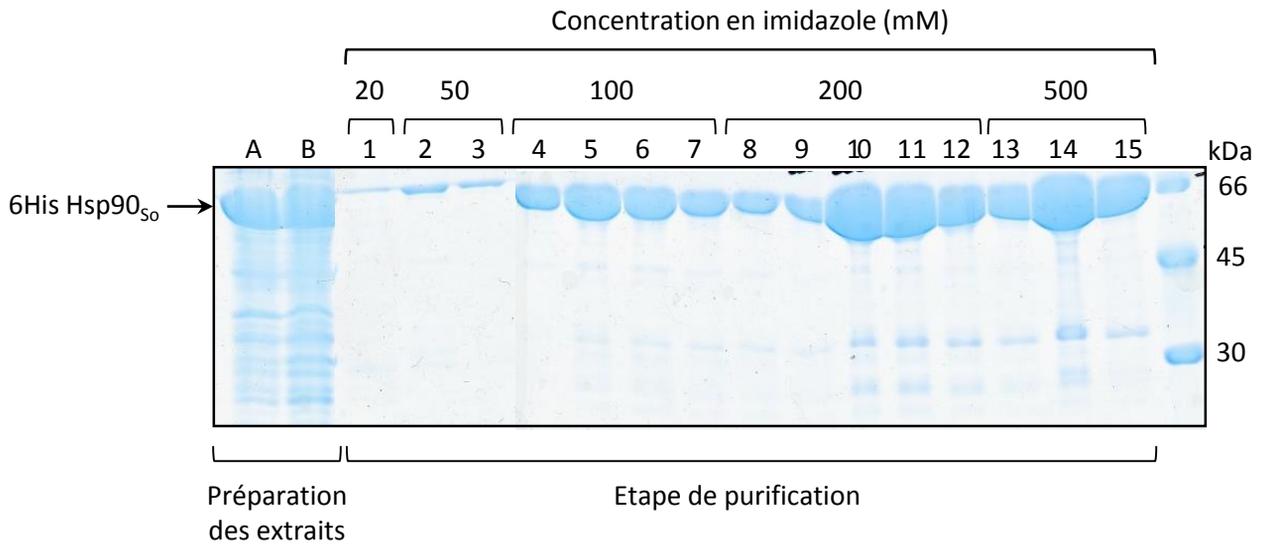
La technique de mutagenèse dirigée décrite dans le paragraphe II.1, page 29, a été utilisée pour obtenir le plasmide pET24 6His *hsp90_{So}E34A* en utilisant les amorces notées en Annexe 1.

b. Vérification de la surproduction de la protéine 6His Hsp90_{So}

Afin de vérifier que la souche Bl21(DE3)/pET24 6His Hsp90_{So} surproduit la protéine Hsp90_{So}, nous procédons à un test en petit volume. Pour cela à partir d'une pré-culture de nuit de la souche à 37°C, les cellules sont diluées à une DO₆₀₀=0,1 dans un nouveau milieu de culture LB contenant de la kanamycine (50 µg/ml) (Annexe 2). Lorsque la DO₆₀₀ atteint 0,8, 1 mM d'IPTG est ajouté pendant 3 heures, ce qui permet la production de la protéine d'intérêt. Les cellules sont récupérées par centrifugation 5 min à 30 000 g puis le culot est remis en suspension dans de l'eau ultra pure et du tampon de charge (TSTD) (Annexe 2). L'ensemble est chauffé 5 min à 95°C et les échantillons sont déposés sur gel polyacrylamide-SDS. Après une migration de 30 min à 200 volts, les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie « InstantBlue » (Expedeon) (Figure 25). **L'apparition d'une bande supplémentaire sur le gel polyacrylamide-SDS démontre que la protéine 6His Hsp90_{So} est correctement surproduite.**

c. Culture des cellules de *S. oneidensis* et préparation des extraits de la protéine 6His Hsp90_{So}

Comme la surproduction de la protéine est satisfaisante, on peut passer à de plus gros volumes afin de produire une plus grande quantité de protéines d'intérêt. Le même protocole que décrit dans le paragraphe précédent a été utilisé mais avec un volume de culture de 1 litre de LB contenant la kanamycine inoculé avec une pré-culture de nuit puis incubé à 37°C sous



A: Surnageant de la première centrifugation
 B: Surnageant de la seconde centrifugation
 1-15: Elutions en présence d'imidazole

Figure 26 : Visualisation de la protéine 6His Hsp90_{so} après purification sur colonne d'affinité HisTrap.

Gel polyacrylamide-SDS 4-12%, coloration au bleu de Coomassie (InstantBlue).

Migration par électrophorèse des protéines lors de la préparation des extraits et lors de l'étape purification de la protéine 6His Hsp90_{so}. On peut voir dans les fractions A et B que la protéine 6His Hsp90_{so} est soluble, on peut donc effectuer la purification à partir de l'extrait B. Les protéines sont éluées lors de l'ajout d'un gradient en imidazole et sont principalement présentes dans les fractions contenant 200 mM et 500 mM d'imidazole.

agitation. Lorsque la DO₆₀₀=0,8, 1 mM d'IPTG est ajouté suivi d'une incubation pendant 3h à 37°C. Les cellules bactériennes sont récupérées par des centrifugations successives. La première de 10 min à 8000 *g* à 4°C permet d'éliminer le milieu de culture LB. Le culot est re-suspendu dans 20 mM de tampon phosphate pH=7,4. La seconde centrifugation de 10 min à 30 000 *g* à 4°C permet d'éliminer le surnageant afin de ne garder que le culot de cellules. Ce culot a été congelé à -20°C et sera ensuite mis en suspension lors des essais dans 20 mM de tampon phosphate pH=7,4, 50 mM de NaCl et 10 mM d'imidazole.

L'étape suivante consiste à lyser les cellules grâce à une pression mécanique. On utilise pour cela la presse de French. Afin de récupérer la protéine dans la fraction soluble deux centrifugations sont réalisées : la première de 15 min à 30 000 *g* permet d'éliminer la plus grosse partie des débris cellulaires. La seconde est une ultracentrifugation de 45 min à 160 000 *g* qui permet d'éliminer les membranes cellulaires. Une électrophorèse sur gel polyacrylamide-SDS 4-12% et la coloration des bandes au bleu de Coomassie a permis de vérifier que la protéine Hsp90_{So} était bien dans la fraction soluble (Figure 26).

d. Purification de 6His Hsp90_{So} par chromatographie d'affinité

La colonne d'affinité HisTrap (GE Healthcare) est composée d'une résine chargée en nickel, ce qui constitue la phase solide fixe à laquelle se lie spécifiquement l'acide aminé histidine de l'étiquette 6His. Pour éluer la protéine ainsi retenue, on utilise de l'imidazole qui à forte concentration rentre en compétition avec les histidines de l'étiquette 6His de la protéine d'intérêt pour la liaison au nickel. Tout d'abord, on équilibre la colonne avec 20 mM de tampon phosphate pH=7,4, 500 mM de NaCl et 10 mM d'imidazole. Ensuite les protéines sont éluées par un gradient discontinu de 20 à 500 mM d'imidazole. Pour visualiser les protéines éluées, les fractions d'élution sont dénaturées et déposées sur gel polyacrylamide-SDS et après électrophorèse (30 min à 200 volts), les protéines sont colorées au Bleu de Coomassie (Figure 26). Les fractions les plus concentrées en protéines (fractions 10 à 15) ont été conservées pour la suite des essais.

e. Dessalage de la protéine 6His Hsp90_{So} purifiée

Afin de changer le tampon et d'éliminer l'imidazole des fractions d'élutions contenant les protéines purifiées, on effectue une chromatographie d'exclusion PD-10 (Amersham Biosciences). Les protéines sont éluées dans un nouveau tampon composé de 50 mM de Tris-

HCl, 100 mM de KCl, 1mM de DTT et 10 % de glycérol qui permet de conserver les protéines lors de la congélation à -80°C.

f. Dosage des protéines

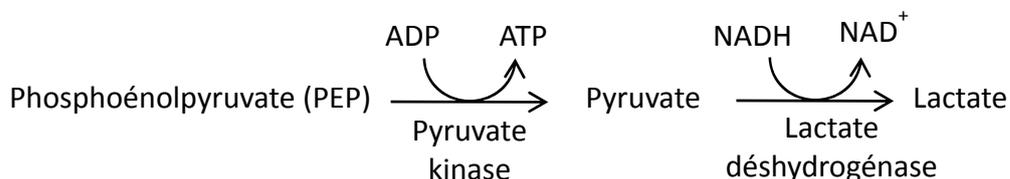
Après obtention de la protéine 6His Hsp90_{So} purifiée, on effectue un dosage selon la méthode de Bradford. C'est une méthode colorimétrique, c'est-à-dire que l'absorbance est mesurée par le changement de couleur de la solution (bleu de Coomassie). Le pigment a pour longueur d'onde maximale 465 nm. Le changement de couleur du bleu de Coomassie est dû à une liaison entre des acides aminés basiques et des résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. La structure du pigment bleu étant modifiée par cette interaction, sa longueur d'onde d'absorbance maximale est modifiée et elle atteint 595 nm.

Ainsi, la solution commerciale de Bradford (Bio-Rad) est diluée au 1/5 ème, puis on ajoute dans une cuve de spectrophotomètre 1 mL de solution Bradford avec entre 1 et 10 µL d'extrait protéique. On mesure alors la densité optique à 595 nm. La concentration en protéines (µg/µL) est obtenue selon la formule : $(DO_{595}) / (V \times \epsilon)$ avec V le volume d'extrait protéique (µL) et $\epsilon=0,05$ le coefficient de corrélation obtenu grâce à une courbe étalon.

Les mêmes étapes ont été effectuées pour obtenir la protéine purifiée Hsp90_{So}E34A.

2.2 Mesure de l'activité ATPase

Maintenant que les protéines Hsp90_{So} WT et Hsp90_{So} E34A ont été purifiées, nous pouvons mesurer leur activité ATPase. Nous quantifions l'ADP produit par Hsp90 grâce au couple d'enzymes pyruvate kinase (PK) et lactate déshydrogénase (LDH) (voir réaction ci-dessous) (Graf *et al.*, 2009).



Le mélange réactionnel contient du phosphoénolpyruvate (PEP) qui en présence de l'enzyme pyruvate kinase (PK) et d'ADP produit du pyruvate et de l'ATP. L'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) transforme ensuite le pyruvate en lactate en utilisant une molécule de

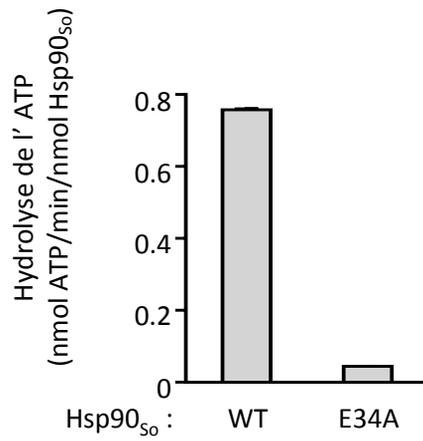


Figure 27 : La protéine mutante Hsp90₅₀E34A ne possède pas d'activité ATPase.

Mesure de la quantité d'ATP hydrolysé par la protéine Hsp90₅₀ ou la protéine mutante Hsp90₅₀ E34A.

Les valeurs montrées représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes avec leurs barres d'erreur (barres d'erreur invisibles sur cette figure car trop faibles).

NADH. Nous mesurons à 37°C la diminution de la quantité de NADH dans la réaction par mesure de l'absorbance à 340 nm au cours du temps. La réaction commence donc en présence d'ADP. Cet ADP est fourni par l'hydrolyse de l'ATP par Hsp90_{So}. Ainsi, une molécule d'ATP consommée par Hsp90 conduit à une molécule de NADH consommée dans la réaction.

Les mesures d'absorbance se font en microplaque et avec le lecteur de microplaque (Tecan Spark 10M). Le tampon du mélange réactionnel est le suivant : 25 mM d'HEPES pH=7,5, 50 mM de KCl, 5 mM de DTT, 5 mM de MgCl₂, 2 mM d'ATP, 1 mM de PEP et 0,25 mM de NADH. On utilise une solution commerciale (Sigma) contenant les deux enzymes PK et LDH chacune à une concentration de 600-1000 unités/mL. On ajoute 1 µL de cette solution dans 100 µL final. Hsp90_{So} ou Hsp90_{So} E34A sont ajoutés au dernier moment à une concentration de 1 µM. Une fois la réaction terminée, la pente est calculée à partir de la partie linéaire des courbes d'absorbance à 340 nm qui reflètent la diminution en NADH. Une courbe étalon faite au préalable permet d'obtenir un coefficient (0,0148) pour faire correspondre la pente obtenue à la concentration de NADH consommée par unité de temps. Puisque la quantité de NADH consommée correspond à la quantité d'ATP consommée, l'activité ATPase obtenue est exprimée en nmol d'ATP/min/nmol d'Hsp90_{So} par le calcul suivant : pente/0,148/[Hsp90]_(nmol). **On peut voir que l'activité ATPase de la protéine mutée Hsp90_{So} E34A est fortement réduite en comparaison avec la protéine Hsp90_{So} sauvage (Figure 27) confirmant ainsi les résultats des études précédentes.**

3. Etude du mutant Hsp90_{So} W476R-L563A

Des études menées chez *S. cerevisiae* et *E. coli* ont montré que parmi les domaines M- et C-terminal de Hsp90 se trouvent des résidus importants pour la liaison avec les protéines clientes (Genest *et al.*, 2013). Pour tester si ces mêmes résidus sont également important chez Hsp90_{So} pour sa fonction chaperon à haute température, j'ai choisi de remplacer les résidus de Hsp90_{So} W476 (tryptophane) en arginine et L563 (leucine) en alanine (correspondant aux mutations W467R et L553A de Hsp90_{Ec}) (Figure 4). Ces deux résidus ont été mutés simultanément dans le plasmide *phsp90_{So}* en utilisant les amorces décrites en annexe 1 pour donner le plasmide *phsp90_{So} W476R-L563A*. Le plasmide a été introduit dans la souche Δ *hsp90_{So}* et la même expérience de croissance sur boîte que celle expliquée dans le paragraphe I.3 (page 26) a été menée. J'ai observé que la production de la protéine Hsp90_{So}W476R-L563A ne restaure que partiellement le phénotype de croissance à haute

température de la souche $\Delta hsp90_{So}$ (Figure 21). J'ai également contrôlé que la production de la protéine en présence d'arabinose 0,02 % est comparable à celle de la protéine Hsp90_{So} sauvage (Figure 22). **Ces résultats confirment que les résidus W476R et L573A sont importants pour la fonction d'Hsp90_{So} et suggèrent donc que c'est bien la fonction chaperon de la protéine Hsp90_{So} qui est importante pour permettre la croissance à haute température.**

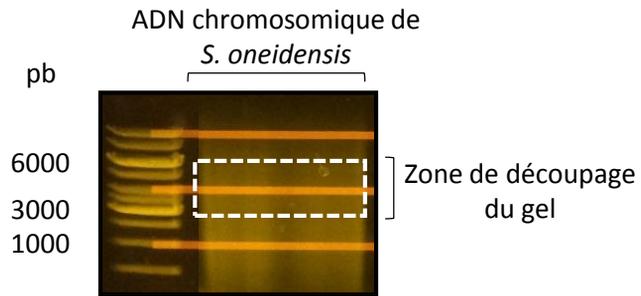


Figure 28 : Digestion partielle du chromosome de *S. oneidensis*.

Gel d'agarose 0,7 % et coloration au SYBR® green

Migration des fragments d'ADN de *S. oneidensis* obtenus après digestion. Le cadre en pointillé indique la zone de découpage du gel pour récupérer les fragments d'ADN partiellement digérés.

III. Recherche de protéines clientes du chaperon Hsp90₅₀

Nous avons vu jusqu'à présent que Hsp90₅₀ était essentiel chez la bactérie *Shewanella oneidensis* à haute température. Pour expliquer ce phénotype, nous proposons que parmi toutes les protéines clientes de Hsp90₅₀, au moins l'une d'entre elle pourrait être essentielle à 35°C. Dans ce cas-là, en absence d'Hsp90₅₀ et à haute température, cette protéine ne serait pas correctement repliée, donc pas active, et ne pourrait pas permettre la croissance de la bactérie.

Pour identifier cette protéine, nous avons décidé d'utiliser une banque plasmidique qui permet la surproduction de chacune des protéines de *S. oneidensis*. Notre hypothèse est que parmi la grande quantité de chaque protéine qui est surproduite, une faible proportion pourrait être correctement repliée sans la présence du chaperon Hsp90₅₀ dans la cellule, et permettrait donc la croissance. Nous avons construit une banque plasmidique afin de trouver les protéines clientes de Hsp90₅₀ grâce à l'utilisation du phénotype de croissance observé précédemment. Je présente maintenant les différentes étapes permettant l'obtention de la banque.

1. Construction d'une banque plasmidique permettant la surproduction des protéines de *S. oneidensis*

1.1 Digestion partielle du chromosome de *S. oneidensis*

Tout d'abord, l'ADN chromosomique de *S. oneidensis* a été digéré de façon partielle avec l'enzyme de restriction Sau3AI (New England Biolabs) qui reconnaît la séquence 5'-GATC afin d'obtenir des fragments d'ADN chromosomique. Plusieurs essais de digestion ont été réalisés en modifiant la quantité d'enzyme de restriction Sau3AI car la difficulté était d'obtenir le maximum de fragments ayant une taille entre 3 et 8 kb. Pour cela nous préparons un mélange contenant dans 40 µl final : 30 µl d'ADN chromosomique purifié à une concentration de 50 ng/µL, 4 µl NEBuffer 10X, 0,4 µl de BSA 100X (New England Biolabs) et 2 µl d'enzyme Sau3AI (20 unités/µl) dilué 25 fois ou 50 fois. On incube le tout 1 h à 37°C, puis 20 min à 65°C afin de stopper la digestion en dénaturant l'enzyme. Ensuite, nous faisons migrer par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % contenant du SYBR® green (Thermo Fisher Scientific) pendant 20 min (Figure 28). Le SYBR® green est un intercalant d'ADN fluorescent ce qui permet de visualiser directement la migration de l'ADN grâce à des LED (The Mupid™) qui

excitent le SYBR® green à 470 nm. On peut ainsi récupérer l'ADN en découpant directement le gel d'agarose. Cette technique permet d'éviter l'utilisation des UV et de ne pas endommager l'ADN. Ensuite, l'ADN est purifié avec le kit Wizard® Genomic (Promega) en suivant le protocole du fabricant.

1.2 Suppression du 2^{ème} site de restriction BamHI du pBAD33

Dans un second temps, il a été nécessaire de modifier le vecteur pBAD33 qui contient naturellement deux sites de restriction BamHI pour qu'il n'en ait plus qu'un car les fragments de chromosome digérés avec Sau3AI (5'-GATC) doivent être clonés dans le pBAD33 au site BamHI (5'-GGATCC). Le site de restriction BamHI 5'-GGATCC situé avant le site multiple de clonage a été muté en 5'-GGTTCC pour rendre impossible sa reconnaissance par l'enzyme de restriction BamHI. Cette mutation a été faite en utilisant la technique de mutagenèse dirigée avec les amorces décrites en Annexe 1, comme expliquée dans le paragraphe II.1, page 29.

1.3 Obtention de clones après digestion, ligation et transformation

On digère donc le vecteur avec l'enzyme afin de le linéariser grâce à l'enzyme de restriction BamHI pendant 1 h à 37°C. Un traitement avec l'enzyme Antartic Phosphatase (New England Biolabs) permet d'éviter la re-circularisation du plasmide digéré. Pour cela on ajoute 1 µL d'enzyme Antartic Phosphatase et 4 µL de tampon Antartic Phosphatase 10X (New England Biolabs) dans le tube contenant le mélange de digestion. On incube 15 min à 37°C, cela permet de dé-phosphoryler les deux extrémités 5' du plasmide. Et enfin, on neutralise l'enzyme en chauffant le mélange 5 min à 70°C.

Les fragments d'ADN chromosomique digérés par Sau3AI étant compatibles avec les extrémités 5' et 3' du vecteur linéarisé, nous effectuons la ligation en utilisant l'ADN ligase du phage T4. Le mélange de ligation obtenu est ensuite transformé dans des cellules ultra-compétentes NEB5α (New England Biolabs) (Tableau 2) qui permettent d'obtenir un plus grand nombre de clones que si l'on utilisait des cellules préparées dans notre laboratoire. Après plusieurs essais nous avons obtenu en tout 2500 colonies isolées. Les plasmides présents dans les cellules NEBα ont ensuite été introduits par conjugaison dans la souche *Δhsp90_{so}* (voir paragraphe I.1.3, page 23). Les clones obtenus ont été mélangés et congelés à -80°C après avoir ajouté 20 % de glycérol au milieu de culture LB.

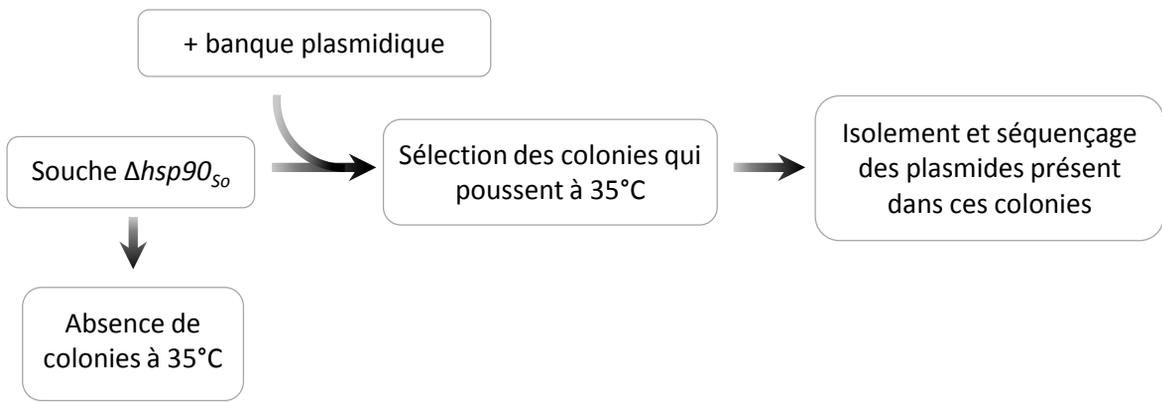


Figure 29 : Représentation schématique pour identifier les protéines permettant de rétablir la croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}/p$ à 35°C lorsqu'elles sont surproduites grâce à la banque plasmidique.

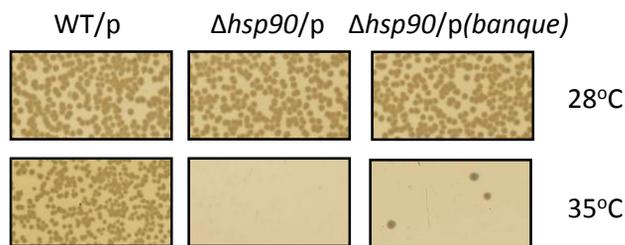


Figure 30 : Sélection des colonies de la souche $\Delta hsp90/p(banque)$ pouvant pousser à 35°C.

Boîtes de Pétri contenant du LB agar et 0,2% d'arabinose sur lesquelles j'ai déposé environ 200 colonies par boîte pour les souches WT/p et $\Delta hsp90/p$ et $2 \cdot 10^7$ colonies pour la souche $\Delta hsp90/p(banque)$. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C ou 35°C.

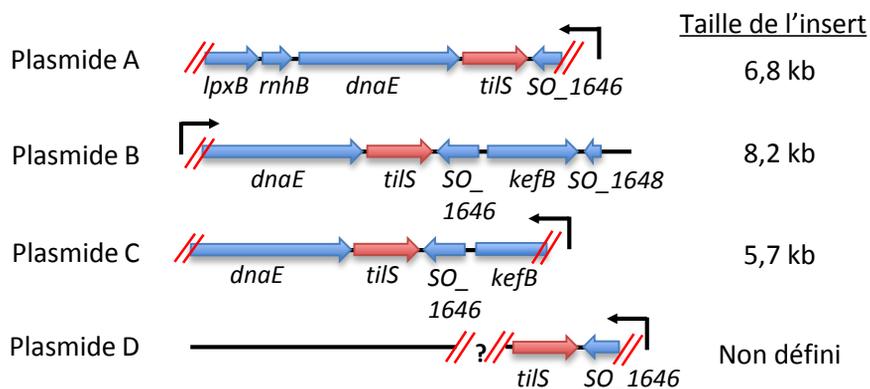


Figure 31 : Représentation schématique des gènes présents dans les plasmides identifiés avec la banque plasmidique.

Le gène *tilS* (flèche rouge) est identifié dans les 4 différents plasmides. Les flèches noires représentent l'orientation du promoteur pBAD. Les doubles lignes rouges représentent une interruption de la séquence du fragment. La taille du plasmide D n'est pas connue ce plasmide résulte probablement de deux fragments indépendants.

2. Utilisation de la banque plasmidique pour identifier des protéines clientes de Hsp90_{so}

2.1 Sélections de clones en conditions de stress sur milieu gélosé

La banque de plasmide a été utilisée afin de permettre de trouver des protéines qui, lorsqu'elles sont surproduites en absence de Hsp90_{so} en conditions de stress thermique, permettent de restaurer la croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}$ (Figure 29). Pour cela, la souche $\Delta hsp90_{so}$ contenant la banque plasmidique est inoculée à une $DO_{600}=1$ (soit 2.10^8 cellules/mL) dans du milieu liquide LB avec du chloramphénicol sous agitation à 28°C. Après 2h d'incubation, la suspension des cellules est diluée pour déposer de façon homogène 2.10^7 cellules par boîte de Pétri. Les boîtes contenant du LB agar avec du chloramphénicol (maintien des plasmides dans les bactéries) et de l'arabinose 0,2 % (induction des gènes sous contrôle du promoteur pBAD du plasmide) ont été incubées à 35°C afin de permettre la sélection des clones (Figure 30). **Seules 10 colonies ont poussé à cette température.** Les colonies ont été ré-isolées, puis congelées à -80°C.

2.2 Isolement de plasmides et séquençage

J'ai voulu savoir quels étaient les gènes présents dans les plasmides des 10 colonies isolées dans l'étape précédente. Pour cela, j'ai purifié ces dix plasmides en utilisant le kit « GenElute™ Plasmid Miniprep » (Sigma). Puis ils ont été séquencés avec des amorces présentes en amont et en aval du site multiple de clonage. Parmi eux, 6 plasmides possèdent le gène *tilS* complet (4 d'entre eux étaient des plasmides différents) (Figure 31). Ces plasmides ont été transférés par conjugaison dans une nouvelle souche $\Delta hsp90_{so}$ afin de vérifier que la restauration du phénotype était bien due à la présence du plasmide dans la cellule, et pas à une mutation sur le chromosome. Cela nous a permis de comparer la croissance de ces souches à 28°C et 35°C en présence de 0,2 % d'arabinose et sur milieu solide LB agar (Figure 32). On observe ainsi que les souches $\Delta hsp90_{so}/\text{plasmide A, B, C et D}$ poussent à 35°C beaucoup mieux que la souche contrôle contenant le vecteur vide $\Delta hsp90_{so}/p$, mais légèrement moins bien que la souche complémentée $\Delta hsp90_{so}/phsp90_{so}$.

2.3 Clonage du gène identifié : le gène *tilS*

Le gène *tilS* a attiré notre attention car c'est le seul gène complet à être présent à chaque fois dans les plasmides séquencés. J'ai donc cloné la séquence codante du gène *tilS* dans le plasmide pBAD33 pour savoir si c'était bien ce gène qui permettait à la souche



Figure 32 : Les plasmides de la banque plasmidique permettent de restaurer la croissance de la souche $\Delta hsp90_{S0}$ à 35°C.

Les plasmides isolés à partir de la banque plasmidique ont été réintroduits dans la souche $\Delta hsp90_{S0}$. Les souches obtenues ont été striées sur milieu LB agar contenant de l'arabinose 0,2 % puis incubées à 28°C ou 35°C.

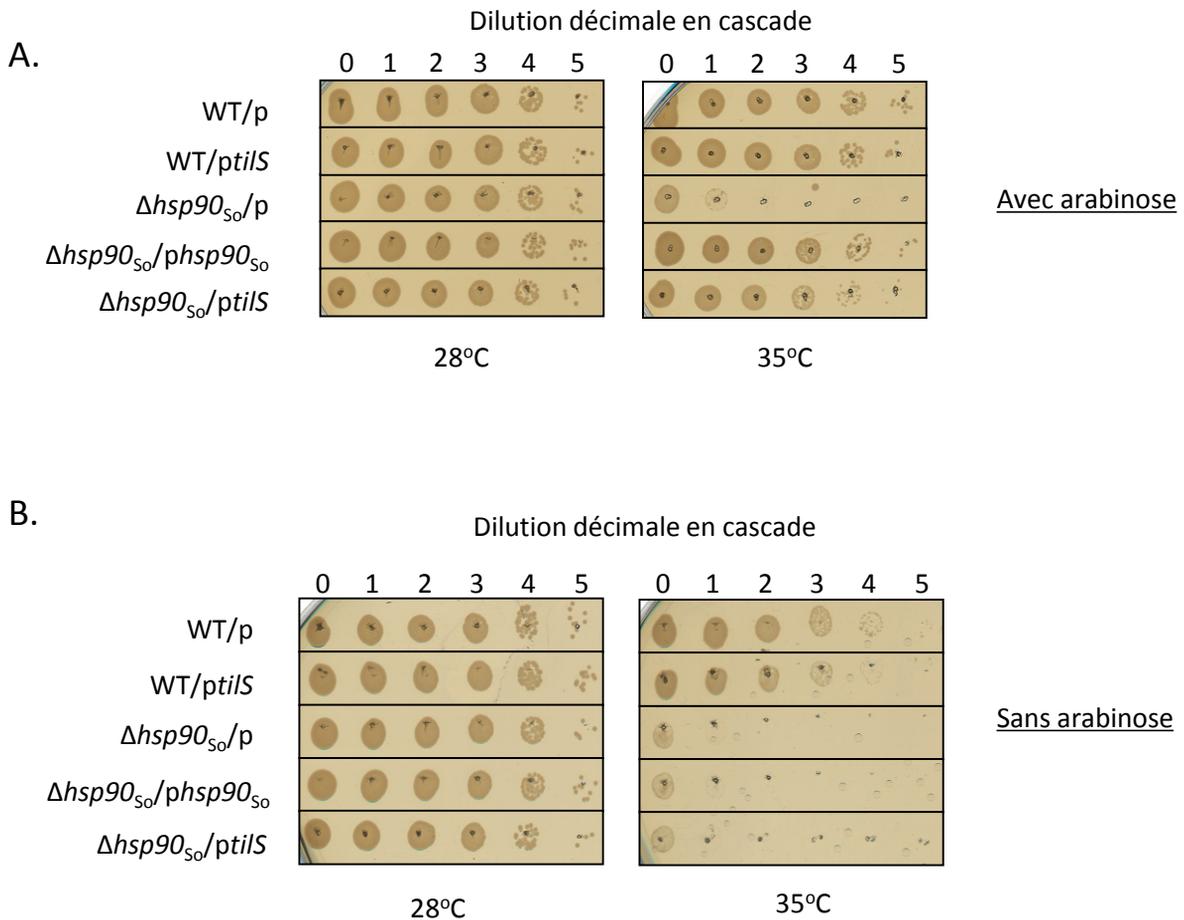


Figure 33 : La présence du gène *tilS* dans la souche $\Delta hsp90_{S0}$ permet de restaurer la croissance à 35°C en présence d'arabinose.

Le gène *tilS* a été cloné dans le vecteur pBAD33 (*ptiS*) et introduit dans la souche sauvage ou $\Delta hsp90_{S0}$. Les souches ont poussé à 28°C, ont été diluées à $DO_{600}=1$, puis diluées en cascade pour déposer 2 μ l de chaque dilution sur milieu LB agar avec 0,2% d'arabinose (A) ou sans arabinose (B) et incubées à 28°C ou 35°C.

$\Delta hsp90_{so}$ de pousser à 35°C. Pour cela, j'ai suivi le même protocole de clonage qu'expliqué précédemment pour le clonage du gène *hsp90_{so}* (voir paragraphe I.3, page 26). Le temps d'élongation pour permettre l'amplification du gène *tilS* est de 1 min et les sites de restriction utilisés pour cloner l'insert dans le plasmide sont XmaI et XbaI (Annexe 1). Le plasmide obtenu (*ptilS*) a été transformé dans une souche d'*E. coli*, puis transféré par conjugaison dans la souche *S. oneidensis* WT ou dans la souche $\Delta hsp90_{so}$. Les clones obtenus ont été testés par PCR afin de vérifier la présence du gène *tilS* dans le plasmide.

Comme espéré, j'ai observé que la croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}/ptilS$ à 35°C est quasiment comparable à la croissance de la souche complétementée $\Delta hsp90_{so}/phsp90_{so}$ à 35°C (Figure 33 A). Ce résultat nous montre donc que c'est la production de TilS qui permet de restaurer la croissance de la souche mutante à haute température. Par ailleurs, la croissance de la souche WT/*ptilS* à 35°C ne semble pas être affectée par la surexpression du gène *tilS* car la croissance est identique à la souche WT/p. Enfin, pour contrôle, j'ai fait croître les souches à 28°C et on peut voir que les différentes souches poussent à l'identique (Figure 33 A). Nous avons également vérifié qu'en absence d'arabinose la croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}/ptilS$ n'était pas restaurée, ce qui indique également que c'est bien la surexpression du gène *tilS* qui permet la complémentation du phénotype à 35°C (Figure 33 B).

Ces résultats suggèrent donc que la protéine TilS est une protéine cliente de Hsp90_{so}.

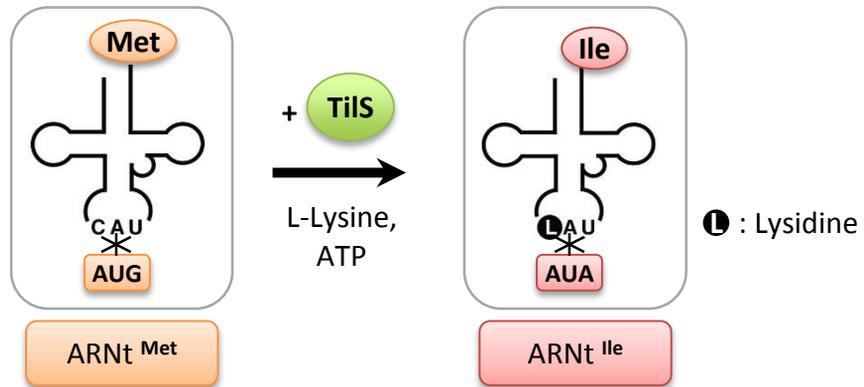


Figure 34 : Représentation schématique du rôle de la protéine TisS, modification de l'ARNt^{Met} en ARNt^{Ile}.
 La protéine TisS (en vert) catalyse l'addition d'une L-Lysine sur la cytosine permettant l'obtention d'une Lysidine. L'ARNt^{Met} devient alors un ARNt^{Ile}.
 D'après Suzuki et Miyauchi, 2010.

IV. Etude de la protéine TiLS, un client du chaperon Hsp90_{So} à haute température

1. Introduction sur la protéine TiLS

Dans la littérature scientifique, la protéine TiLS est décrite comme étant une ARNt^{Ile}-lysine synthétase (Soma *et al.*, 2003; Suzuki et Miyauchi, 2010). Cette enzyme permet la modification de l'ARNt^{Met} du codon AUG en ARNt^{Ile} qui permet la reconnaissance du codon AUA en isoleucine (Figure 34). En effet, TiLS modifie la première base, dite « wobble », de l'anticodon de l'ARNt en catalysant l'addition d'une lysine à la cytidine 34 de l'ARNt^{Met} pour obtenir une lysidine. Cela modifie à la fois la spécificité de l'ARNt pour le codon reconnu et l'acide aminé chargé. Ce changement est très important pour la cellule et il a été montré que TiLS est essentiel chez *E. coli* (Soma *et al.*, 2003). En effet, sans cette modification, les ARNm contenant le codon AUA ne peuvent pas être traduits en protéine. Chez *S. oneidensis*, il semble que la protéine TiLS soit également essentielle. En effet, je n'ai pas réussi à éliminer le gène *tiLS* dans la souche WT de *S. oneidensis*. Le gène *tiLS* a pu être éliminé du chromosome seulement lorsqu'une copie du gène *tiLS* était présente sur un plasmide.

2. Test d'activité de la protéine TiLS *in vivo* en absence d'Hsp90_{So}

Nous avons proposé que TiLS soit une protéine cliente du chaperon Hsp90_{So}. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons choisi de mesurer l'activité enzymatique de TiLS, et si notre hypothèse est correcte, cette activité devrait diminuer en absence du chaperon à haute température. Pour cela, nous avons adapté chez *S. oneidensis* une technique déjà utilisée chez *E. coli* (Soma *et al.*, 2003).

2.1 Obtention des plasmides

Nous avons donc voulu comparer l'activité de TiLS dans la souche sauvage de *S. oneidensis* et la souche $\Delta hsp90_{So}$ à température optimale (28°C) ou sub-létale (34°C). La technique repose sur la mesure de l'activité β -galactosidase présente dans la cellule qui traduit indirectement l'activité de TiLS *in vivo*. Pour cela, la séquence « gat gaa ata ata aaa ctt ata ata » contenant 4 codons « ATA » (nécessitant TiLS au moment de leur traduction) a été fusionnée à l'extrémité 5' du gène rapporteur *lacZ* (codant pour l'enzyme β -galactosidase)

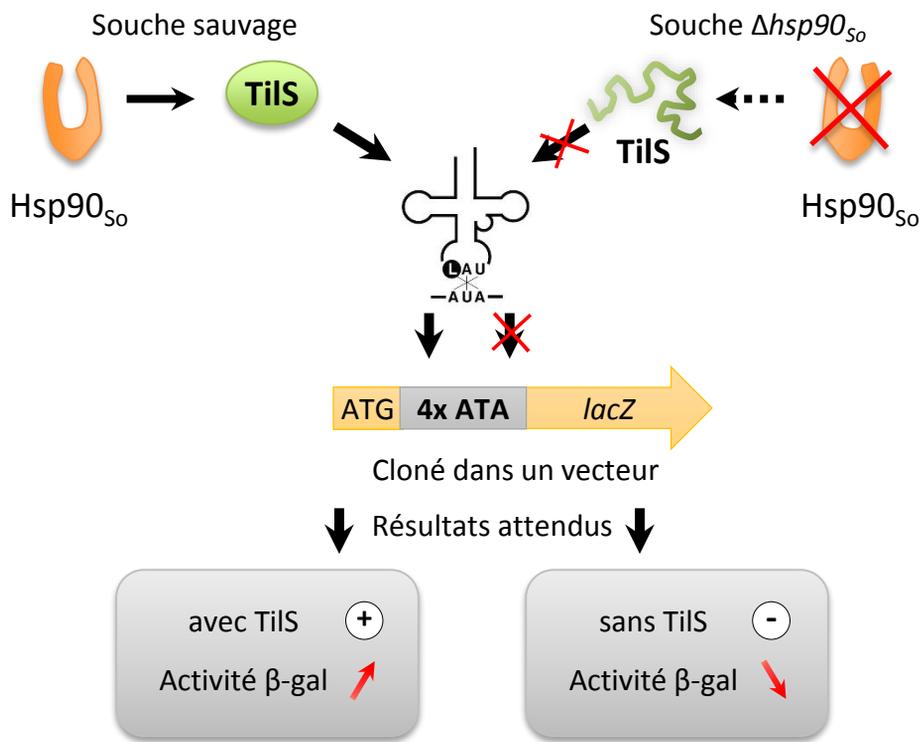


Figure 35 : Représentation schématique de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique de TiIS *in vivo*.

Dans la souche sauvage, TiIS (en vert) est actif dans la cellule. Son activité permet l'obtention d'ARNt^{Ile} et la traduction des codons ATA est possible. 4 codons « ATA » (en gris) codant pour l'isoleucine ont été ajoutés en amont du gène rapporteur *lacZ* (en jaune) et après le codon d'initiation ATG, puis l'insert est cloné dans le vecteur pBAD33. On mesure alors une forte activité β-galactosidase dans la souche sauvage. En absence d'Hsp90_{s0}, TiIS n'est plus correctement replié et est inactif, ce qui inhibe son activité catalytique et empêche la traduction des codons « ATA ». L'activité β-galactosidase pourrait ainsi diminuer.

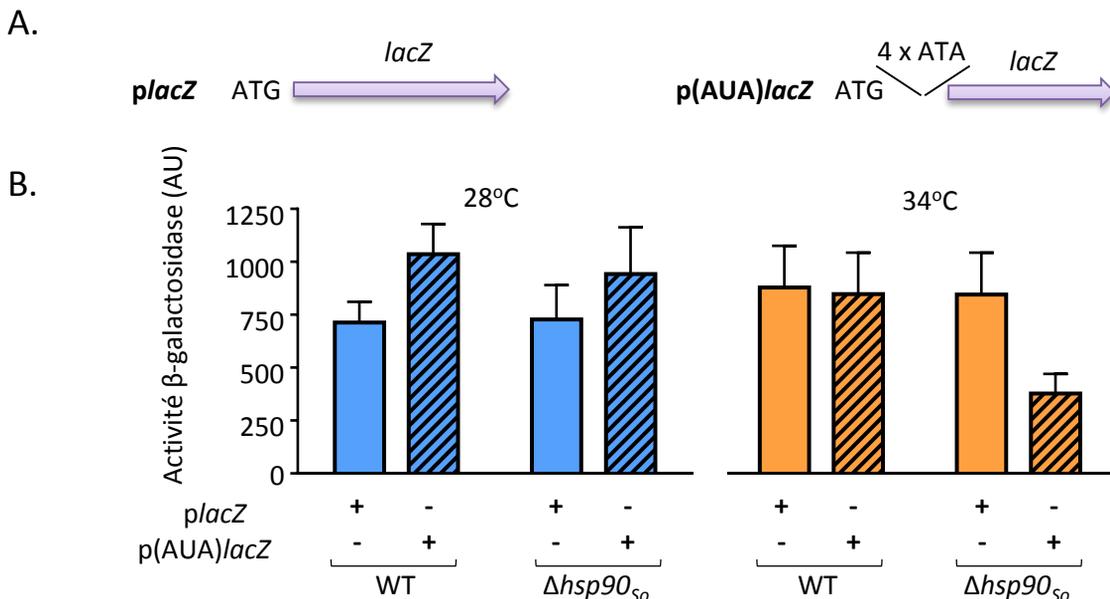


Figure 36 : Mesure des activités β-galactosidase *in vivo*; l'activité de TiIS est diminuée en absence de Hsp90_{s0} à 34°C.

A. Représentation schématique du plasmide contrôle *placZ* et du plasmide *p(AUA)lacZ*.

B. Les cultures des souches WT ou Δhsp90_{s0} contenant soit le plasmide contrôle *placZ* soit le plasmide *p(AUA)lacZ* sont diluées à une DO₆₀₀=0,1. Les cultures sont incubées à 28°C ou 34°C pendant 3 heures puis ajout de 0,2 % d'arabinose pendant 2 heures. Les valeurs montrées représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes avec leurs barres d'erreur.

après le codon d'initiation (atg) (Figure 35). Ainsi le niveau d'activité β -galactosidase dans la cellule devient dépendant de l'activité de TiIS dans la cellule. Cette séquence nucléotidique fusionnée à *lacZ* a été clonée dans un vecteur pBAD33 (Annexe 1). Le plasmide p(AUA)*lacZ* obtenu a été introduit dans la souche WT ou dans la souche $\Delta hsp90_{so}$ (Figure 36 A). Comme contrôle positif, nous avons utilisé un plasmide contenant uniquement le gène *lacZ* (*placZ*) et celui-ci a été introduit dans les mêmes souches (Annexe 1).

2.2 Mesure des activités β -galactosidase

Les souches ont été cultivées en aérobie en milieu LB liquide à 28°C ou 34°C. Après 2 heures d'induction avec de l'arabinose (0,2 %), nous avons mesuré l'activité β -galactosidase. Pour cela, on ajoute 200 μ l de cellules dans 800 μ l de tampon contenant 62 mM de Na_2HPO_4 et 45 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM de KCl, 1 mM de MgSO_4 , et 50 mM de β -mercaptoéthanol. On perméabilise les cellules en ajoutant du SDS et du chloroforme, et en agitant pendant 10 secondes. On ajoute 200 μ l de cet extrait en microplaque de 96 puits et 40 μ l d'O-nitrophényl- β -D-galactoside (ONPG, le substrat de la β -galactosidase) sont ajoutés pour débiter la réaction. L'ONPG, incolore, est dégradé par la β -galactosidase en O-nitrophényl (ONP) de couleur jaune qui est mesuré à 420 nm par spectrophotométrie. La mesure de l'absorbance se fait au cours du temps grâce au lecteur de microplaque (Tecan Spark 10 M). Après analyse des courbes, on obtient la pente de chacune d'entre elles. Puis les activités β -galactosidase sont calculées en unité arbitraire selon la formule : $(10000 \times \text{pente}) / (V \times \text{DO}_{600})$ où V est le volume de culture bactérien utilisé pour l'essai en μ l et DO_{600} est la densité optique de la culture cellulaire.

2.3 Interprétation des résultats

A 28°C, l'activité β -galactosidase des souches WT/*placZ* et $\Delta hsp90_{so}$ /*placZ* est similaire, ce qui montre que l'absence de Hsp90_{so} dans la cellule n'affecte pas la production de β -galactosidase (Figure 36 B). De plus, avec le plasmide p(AUA)*lacZ* présent dans chacune des deux souches, on observe un niveau comparable d'activité β -galactosidase, même si le niveau est sensiblement plus élevé qu'avec le plasmide contrôle *placZ*.

A 34°C, la souche WT contenant soit le plasmide *placZ* soit le plasmide p(AUA)*lacZ* présente dans les deux cas un niveau d'activité β -galactosidase semblable. Ce résultat montre que la présence des 4 codons AUA fusionnés au gène *lacZ* n'affecte pas le niveau d'activité β -

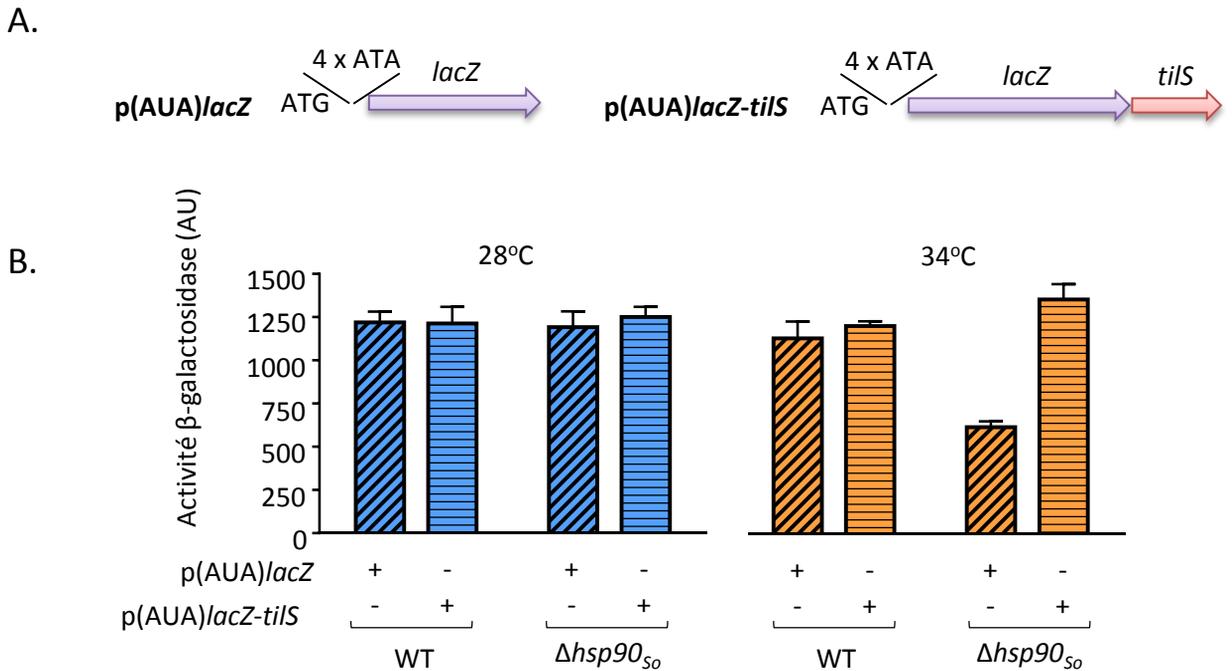


Figure 37 : Mesure des activités β -galactosidase *in vivo*; la surproduction de la protéine TiIS restaure la diminution de l'activité β -galactosidase mesurée en absence de Hsp90_{So}.

A. Représentation schématique du plasmide p(AUA)lacZ et du plasmide p(AUA)lacZ-tiIS contenant le gène *tiIS* fusionné en aval du gène *lacZ*.

B. Les cultures des souches WT ou $\Delta hsp90_{So}$ contenant soit le plasmide contrôle p(AUA)lacZ soit le plasmide p(AUA)lacZ-tiIS sont diluées à une $DO_{600}=0,1$. Les cultures sont incubées à 28°C ou 34°C pendant 3 heures puis on y ajoute 0,2 % d'arabinose pendant 2 heures. Les valeurs montrées représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes avec leurs barres d'erreur.

galactosidase (Figure 36 B). Cependant, j'ai observé que le niveau d'activité β -galactosidase de la souche $\Delta hsp90_{so}/p(AUA)/lacZ$ est fortement diminué comparativement à la souche WT/ $p(AUA)/lacZ$. Ce résultat suggère qu'en absence de Hsp90_{so} et à haute température, l'activité de TiIS est réduite. Ceci se traduit par une diminution de la quantité d'ARNt^{lle} présents, une diminution de la traduction des codons ATA et donc par une diminution de l'activité β -galactosidase mesurée dans la cellule.

Pour confirmer que l'effet observé était bien dû à une diminution de la quantité de TiIS présent dans la cellule, nous avons surproduit la protéine TiIS. Pour cela, j'ai ajouté la séquence codante du gène *tis* après la séquence du gène *lacZ* dans le plasmide $p(AUA)/lacZ$ (Figure 37 A et Annexe 1). A 28°C, on peut voir que le niveau d'activité β -galactosidase n'est pas modifié en présence d'une forte quantité de TiIS que ce soit dans la souche sauvage ou la souche $\Delta hsp90_{so}$ (Figure 37 B). Par contre à 34°C, alors qu'il n'y a pas de différence pour la souche sauvage, on peut voir que le faible niveau d'activité β -galactosidase mesuré dans la souche $\Delta hsp90_{so}$ est fortement augmenté lorsque TiIS est surproduit. Ce résultat montre donc que dans la souche $\Delta hsp90_{so}$, la diminution d'activité β -galactosidase était bien due à une diminution de la quantité de TiIS.

Tous ces résultats suggèrent donc fortement que l'activité de TiIS dépend de la présence de Hsp90_{so} à haute température et que TiIS est une protéine cliente d'Hsp90_{so}.

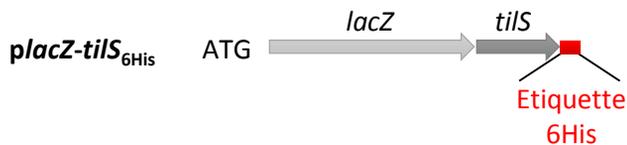
3. Etude de la quantité de TiIS en absence d'Hsp90_{so} à haute température

Dans la cellule, les chaperons permettent le bon repliement de leurs protéines clientes. Si celles-ci sont mal repliées et donc inactives, elles peuvent être dégradées par des protéases. Dans le but de savoir si c'est le cas pour TiIS en absence d'Hsp90_{so}, nous avons décidé de suivre la quantité de TiIS produite *in vivo* à haute température.

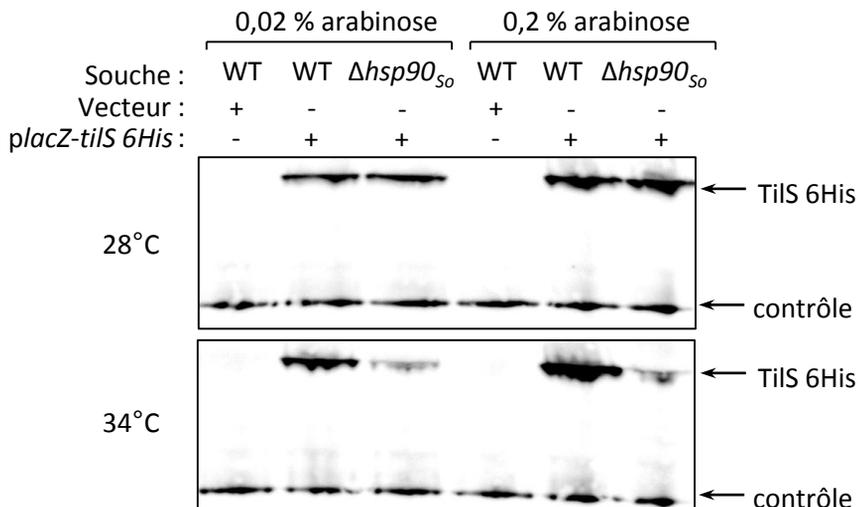
3.1 Obtention des plasmides

Pour cela, j'ai amplifié par PCR le gène *tis* avec à son extrémité 3' une séquence codant pour l'étiquette 6His. Puis j'ai cloné ce fragment PCR dans le plasmide *placZ* afin d'obtenir le plasmide *placZ-tis* 6His (Figure 38 A et Annexe 1). Le plasmide obtenu a été introduit dans les souches de *S. oneidensis* sauvage et $\Delta hsp90_{so}$ par conjugaison.

A.



B.



C.

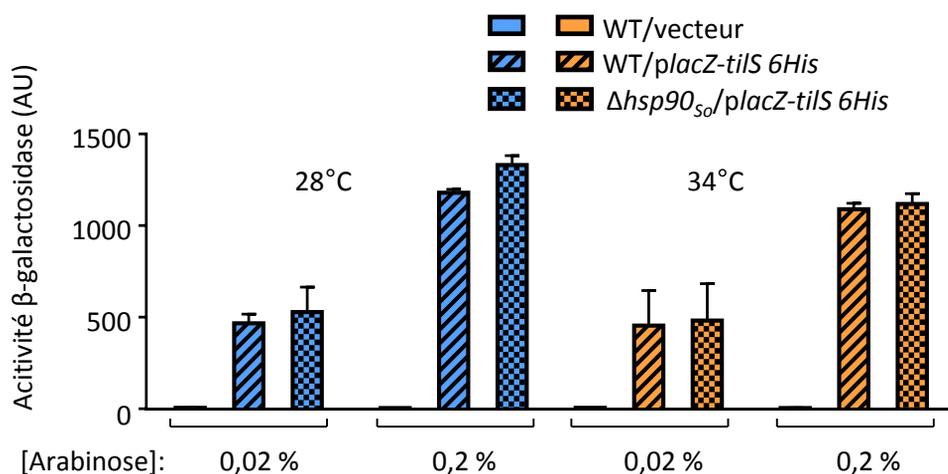


Figure 38 : La protéine TiIS est dégradée en absence de Hsp90_{so} à 34°C.

A. Représentation schématique du plasmide *placZ-tiIS* auquel on a ajouté la séquence codante pour l'étiquette 6His.

B. Le vecteur pBAD33 a été introduit dans la souche sauvage (contrôle négatif) et le plasmide *placZ-tiIS* est introduit dans la souche sauvage ou $\Delta hsp90_{so}$. Les souches résultantes sont diluées à une $DO_{600}=0,1$ et incubées à 28°C ou 34°C. A une $DO_{600}=0,6$, 0,02 % ou 0,2 % d'arabinose est ajouté. Après 2 heures d'induction, les extraits protéiques sont analysés par Western blot en utilisant un anticorps 6x-His. La bande correspondant à la protéine TiIS est indiquée par une flèche. La bande « contrôle » correspond à une protéine reconnue de façon aspécifique par les anticorps 6x-His et permet de voir que la même quantité d'échantillon a été chargée dans les différents puits.

C. L'activité β -galactosidase a été mesurée à partir des cultures utilisées en (B). Les valeurs montrées représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes avec leurs barres d'erreur.

3.2 Mesure des quantités par Western blot

Les souches WT/p (souche contrôle négatif contenant le vecteur vide), WT/*placZ-tiIS* 6His et Δ *hsp90_{so}*/*placZ-tiIS* 6His sont mises en culture dans un milieu LB en aérobiose et sous agitation à 28°C ou à 34°C (température subléthale). A une DO₆₀₀=0,6, l'expression des gènes du plasmide est induite par l'ajout de 0,02 % ou 0,2 % d'arabinose. Après 2 h d'induction, les extraits protéiques sont déposés sur gel polyacrylamide-SDS, puis les protéines sont électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose. Après transfert, la membrane a été saturée pendant 30 min sous agitation dans du tampon « TBST » composé de 25 mM de Tris-HCl pH=7,5, 150 mM de NaCl et 0,1 % Tween 20 auquel on ajoute 25 g/L de sérum albumine bovin (BSA). Après plusieurs lavages avec le tampon TBST, la membrane est incubée en présence de l'anticorps monoclonal 6x-HisTag couplé à HRP (Thermo MA1-80218) dans du tampon TBST. Plusieurs lavages sont effectués et puis la position des protéines d'intérêt est révélée par une réaction de chimioluminescence au niveau de l'anticorps grâce au kit Supersignal West Pico (Pierce) (Annexe 2).

3.3 Interprétation des résultats

Lorsque les souches ont été cultivées à 28°C, la quantité de TiIS 6His présent dans les extraits protéiques des deux souches WT/*placZ-tiIS* 6His et Δ *hsp90_{so}*/*placZ-tiIS* 6His est identique et la quantité de TiIS 6His est plus importante lorsqu'on augmente la concentration d'arabinose (Figure 38 B). De façon marquante, **à haute température (34°C) la quantité de TiIS 6His est considérablement diminuée dans la souche Δ *hsp90_{so}* comparé à la souche sauvage**. Ce résultat est observé avec 0,02 % ou 0,2 % d'arabinose. Ainsi, en absence d'*Hsp90_{so}* et à haute température, TiIS est dégradé, ce qui encore une fois montre que TiIS est un client d'*Hsp90_{so}*. La bande dite « contrôle » est une protéine inconnue qui réagit aux anticorps 6x-His. Elle nous permet ici de vérifier que la quantité d'extrait protéique déposé dans chaque puit est identique.

TiIS est produit à partir du plasmide *placZ-tiIS* où les gènes *lacZ* et *tiIS* sont codés en opéron. Afin de montrer que la diminution de la quantité de la protéine TiIS dans la souche Δ *hsp90_{so}* à haute température est bien due à de la dégradation et non pas à une diminution de son expression à partir du plasmide, nous avons contrôlé l'activité β -galactosidase (selon la même méthode que vu précédemment). Cette activité représente la quantité de *lacZ*

exprimée dans la cellule. Pour cela, nous avons mesuré l'activité β -galactosidase des souches poussant soit à 28°C soit à 34°C après 2 h d'induction à 0,02 % ou 0,2 % d'arabinose (Figure 38 C). On observe alors que les activités β -galactosidase sont identiques dans les deux souches à 34°C et pour les deux concentrations d'arabinose. Ce résultat confirme bien que l'expression de *lacZ*, et donc de *tiIS*, n'est pas diminuée par l'absence d'Hsp90_{So}. La diminution de la quantité de la protéine TiIS en absence d'Hsp90_{So} et à haute température est donc bien due à de la dégradation.

Par ailleurs, nous avons vu que des inhibiteurs d'Hsp90_{So} comme le radicicol permettent d'inhiber la croissance de la souche sauvage à 35°C et ainsi avoir le même phénotype de croissance que la souche $\Delta hsp90_{So}$. Nous avons donc reproduit la même expérience que réalisée précédemment (Figure 38 B) en ajoutant dans le milieu de culture 100 μ M de radicicol ou de DMSO (contrôle négatif). Comme espéré, on peut voir qu'à 34°C, la quantité de TiIS dans la souche WT en présence de radicicol est fortement diminuée comparée à la souche WT sans radicicol (Figure 39). On peut voir également que cette diminution est observée seulement à 34°C et non à 28°C où Hsp90_{So} n'est pas essentiel.

L'ensemble des résultats montre que la quantité de TiIS est fortement réduite à haute température en absence de Hsp90_{So}. Cela suggère également que TiIS est mal replié en absence du chaperon Hsp90_{So} et qu'il est dégradé par des protéases.

4. Etude des interactions *in vivo* entre la protéine chaperon Hsp90_{So} et la protéine cliente TiIS

Les résultats précédents suggèrent que TiIS est un client de Hsp90_{So}, ce qui laisse donc supposer que les deux protéines interagissent. Pour montrer leurs interactions, nous avons tout d'abord utilisé une expérience *in vivo* de double hybride bactérien.

4.1 Interaction en double hybride bactérien

Cette expérience est basée sur la reconstitution chez *E. coli* de l'activité de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* (codée par le gène *cya*). Le domaine catalytique de l'adénylate cyclase est constitué des deux domaines T18 et T25 (Karimova *et al.*, 1998). Dans l'expérience, chaque domaine séparé est fusionné avec une protéine d'intérêt. L'interaction entre les deux protéines d'intérêt permet de rapprocher les domaines T18 et T25, ce qui permet à l'adénylate cyclase de retrouver son activité enzymatique. Il y a alors production d'AMPc, qui par une

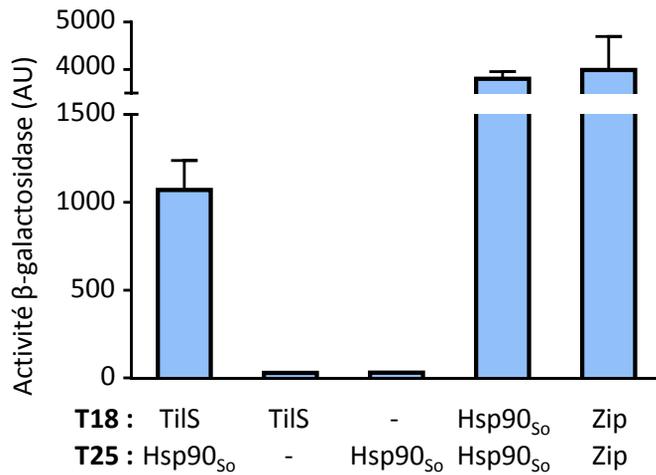


Figure 40 : Les protéines Hsp90_{s0} et TiIS interagissent *in vivo* par double hybride bactérien.

Les plasmides T18-TiIS et T25-Hsp90_{s0}, T18-TiIS et T25 ou T18 et T25-Hsp90_{s0} (contrôles négatifs), T18-Hsp90_{s0} et T25-Hsp90_{s0} ou T18-Zip et T25-Zip (contrôles positifs) ont été co-transformés dans la souche d'*E. coli* BTH101 Δ *htpG*. Les souches sont cultivées à 28°C pendant la nuit puis l'activité β -galactosidase est mesurée. Les valeurs montrées représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes avec leurs barres d'erreur.

cascade de régulation entraîne l'induction de l'expression du gène *lacZ*. L'activité β -galactosidase de la cellule est alors mesurée et reflète le niveau d'interaction des deux protéines d'intérêt.

a. Protocole expérimental

Les vecteurs utilisés pour cette expérience sont le pKT25linker (Kan^R) contenant la séquence codante pour le domaine T25 et le vecteur pUT18Clinker (Amp^R) pour le domaine T18. Les gènes codant pour les protéines d'intérêts doivent être clonés en phase avec les gènes codant pour les domaines T18 et T25 (Annexe 1). Nous avons ici fusionné le gène *tilS* avec le domaine T18 et le gène *hsp90_{So}* avec les domaines T18 et T25. Pour cela, le gène *tilS* a été cloné aux sites de restriction EcoRI et XhoI du vecteur pUT18Clinker et *hsp90_{So}* a été cloné aux sites PstI et XbaI du pKT25linker et du pUT18Clinker (Annexe 1). Les plasmides résultants sont co-transformés dans la souche BTH101 Δ *htpG* (Tableau 2) rendue compétente par un traitement au CaCl₂. La souche BTH101 Δ *htpG* est tronquée du gène *cya* codant pour l'adénylate cyclase et du gène *htpG* codant pour Hsp90 d'*E. coli*. En effet, il est important pour notre étude d'utiliser une souche sans Hsp90_{Ec} afin qu'il ne puisse pas interférer avec les autres protéines fusionnées aux domaines T18 et T25. Pour l'étape de transformation, 0,5 μ L de chaque plasmide est ajouté pour 80 μ L de cellules compétentes. On sélectionne ensuite les colonies sur milieu gélosé (LB agar) contenant de l'ampicilline et de la kanamycine (Annexe 2) et on incube les boîtes à 28°C pendant 2 jours minimum. Il faut ensuite inoculer les souches recombinantes dans 3 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline, de la kanamycine et de l'IPTG (pour induire l'expression des gènes d'intérêts présents sur les plasmides) que l'on incube sous agitation à 28°C pendant la nuit. Nous mesurons ensuite les activités β -galactosidase comme vu précédemment (voir paragraphe IV.2.2, page 42).

b. Interprétation des résultats

Cette expérience nous montre que T18-TilS et T25-Hsp90_{So} interagissent. En effet, on observe un niveau d'activité β -galactosidase élevé lorsque les deux protéines fusions sont produites ensemble (Figure 40). Cette interaction entre les deux protéines est spécifique, en effet T18-TilS n'interagit pas avec le domaine T25 et T25-Hsp90_{So} n'interagit pas avec le domaine T18. Comme attendu, on observe que la protéine Hsp90_{So} peut dimériser car le niveau d'activité β -galactosidase est fortement élevé lorsque T18-Hsp90_{So} et T25-Hsp90_{So} sont produits en même temps. Ce résultat est en concordance avec les études menées chez *E. coli*

où Hsp90_{EC} dimérise (Krukenberg *et al.*, 2011). Comme contrôle positif, nous utilisons communément pour cette expérience les plasmides T18-Zip et T25-Zip (Battesti et Bouveret, 2012).

4.2 Co-purification de Hsp90_{So} par CBP-TiIS

Une autre méthode pour voir l'interaction entre deux protéines est la co-purification. Cette technique est basée sur la purification d'une protéine grâce à l'interaction avec une autre protéine fixée sur une résine de manière spécifique. Cette fixation est possible grâce à la présence d'une étiquette.

a. Protocole expérimental

Nous avons adapté un protocole déjà existant (Battesti *et al.*, 2013) en utilisant une souche d'*E. coli* MG1655 Δ *htpG* (Tableau 2) dans laquelle on introduit deux plasmides surproduisant les deux protéines en même temps. Nous avons utilisé cette technique pour co-purifier Hsp90_{So} avec TiIS possédant l'étiquette CBP (calmodulin binding protein) en position N-terminal. Cette étiquette se lie de manière spécifique à la résine d'affinité composée de calmoduline (Agilent). Pour construire le plasmide pCBP-TiIS, nous avons tout d'abord digéré le plasmide T25-TiIS avec les enzymes de restriction XbaI et XhoI afin de récupérer le fragment d'ADN contenant le gène *tiIS*. Le plasmide pBAD24-CBP-linker (pCBP) a été digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Puis, après ligation des deux fragments linéaires, on obtient le plasmide pCBP-TiIS. Ce plasmide est ensuite co-transformé avec le plasmide *phsp90_{So}* ou *phsp90_{So} W476R-L563A* dans la souche MG1655 Δ *htpG*. Les souches obtenues sont inoculées dans du milieu liquide (LB) et incubées à 37°C en aérobiose. A une DO₆₀₀=0,8 on ajoute 0,05 % d'arabinose dans le milieu de culture. Après 1 heure d'induction, les cellules sont centrifugées 10 min à 8000 g. Le culot de cellules est mis en suspension dans 2 mL du tampon constitué de 10 mM Tris HCl pH=8, 150 mM NaCl, 1 mM Mg acétate, 1 mM imidazole, 2 mM CaCl₂, 0,1 % de Triton et 10 mM de β -mercaptoéthanol. Après avoir lysé les cellules à la presse de French, on centrifuge les extraits 10 min à 8000 g. Puis, 1,4 mL de surnageant est mis en contact avec 50 μ L de résine pendant 1 heure à 4°C sous agitation. Après centrifugation 1 min à 300 g, la résine est lavée 4 fois avec 1 mL du même tampon. Ensuite, la résine est re-suspendue dans 40 μ L de tampon de charge (TSTD), et les protéines sont dénaturées par un traitement à 95°C pendant 5 min. On centrifuge à nouveau 1 min à 300 g et on charge 15 μ L d'extrait sur gel polyacrylamide-SDS. On effectue alors un Western blot révélé avec l'anticorps anti-Hsp90_{EC}

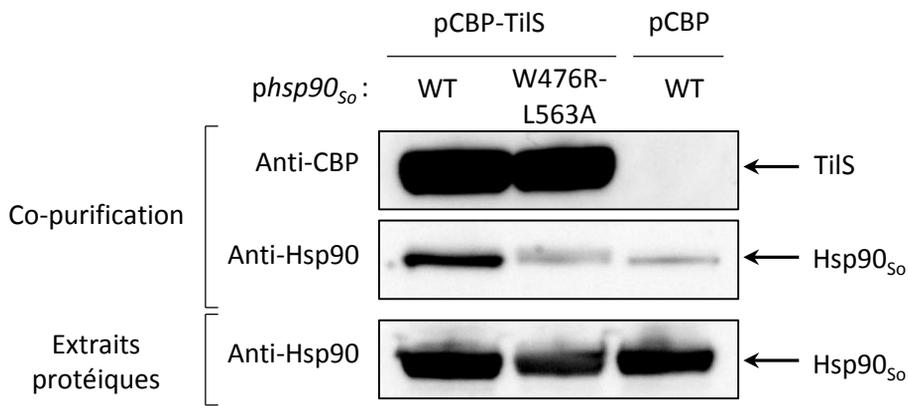
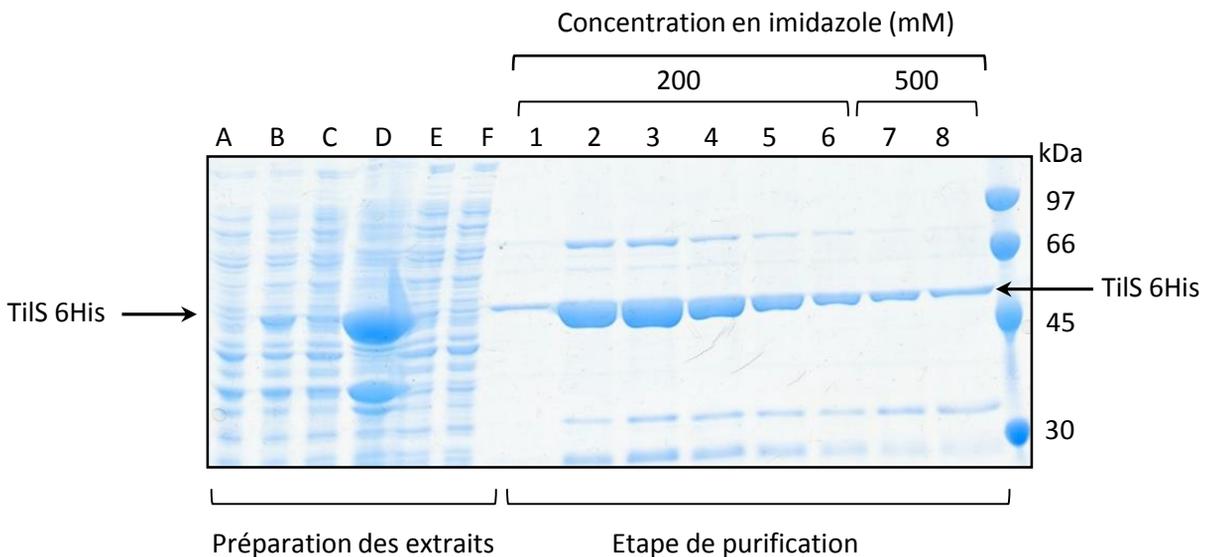


Figure 41 : La protéine Hsp90_{So} est co-purifiée avec CBP-TiIS.

La protéine TiIS avec son étiquette CBP est introduite dans le plasmide pBAD24 (pCBP-TiIS). La protéine CBP-TiIS est surproduite en présence ou absence de Hsp90_{So} ou Hsp90_{So} W476R-L563A à partir du pBAD33, *phsp90_{So}/WT* ou *phsp90_{So}/ W476R-L563A* dans la souche d'*E. coli* MG1655Δ*htpG*. CBP-TiIS est purifié sur la résine d'affinité composée de calmoduline et après plusieurs étapes de lavages, les protéines sont analysées par Western blot avec des anticorps anti-CBP et anti-Hsp90_{EC}. La même quantité de protéine Hsp90_{So} est présente dans les différents extraits protéiques.



- A: Avant induction
- B: Après 2h d'induction IPTG 0,1mM
- C: Surnageant de la première centrifugation
- D: Culot de la première centrifugation
- E: Surnageant de la seconde centrifugation
- F: Culot de la seconde centrifugation
- 1-8: Elution en présence d'imidazole

Figure 42 : Visualisation de la protéine TiIS 6His avant et après la purification sur colonne d'affinité HisTrap.

Gel polyacrylamide-SDS 4-12%, coloration au bleu de Coomassie (InstantBlue).

Migration par électrophorèse des protéines lors des différentes étapes pour purifier la protéine TiIS 6His. La majeure partie des protéines TiIS 6His n'est pas soluble et est présente dans le culot de la première centrifugation. Cependant j'ai purifié TiIS 6His à partir de la fraction soluble (E). Lors de la purification sur colonne d'affinité, les protéines sont éluées par l'ajout d'un gradient de concentration en imidazole de 200 mM à 500 mM.

permettant la détection de Hsp90_{So} (comme vu précédemment). La même membrane est ensuite révélée avec un anticorps anti-CBP (Millipore 07-482) afin de montrer que la même quantité de protéine TiIS est présente dans les extraits.

b. Interprétation des résultats

Tout d'abord, on peut voir que la protéine CBP-TiIS a bien été purifiée sur la résine calmoduline en même quantité à partir des différentes souches (Figure 41). Il est très intéressant de voir **que la protéine Hsp90_{So} WT est co-purifiée en présence de la protéine CBP-TiIS**. Cela montre donc une interaction entre les deux protéines. Comme contrôle négatif, nous avons utilisé la protéine mutante Hsp90_{So}W476R-L563A qui est affectée dans l'interaction avec les protéines clientes. Nous avons observé que la protéine Hsp90_{So} W476R-L563A est faiblement co-purifiée avec CBP-TiIS ce qui montre que ces mutations d'Hsp90_{So} affectent l'interaction avec TiIS et que TiIS est reconnu comme un client par Hsp90_{So}. **Cette expérience confirme donc que TiIS est une protéine cliente du chaperon Hsp90_{So}.**

5. Rôle de Hsp90_{So} dans la protection de l'agrégation de TiIS

Les protéines chaperons sont généralement connues pour empêcher l'agrégation de leur substrat. Puisque nous proposons que TiIS est une protéine cliente d'Hsp90_{So}, nous avons voulu savoir si Hsp90_{So} pouvait empêcher l'agrégation de TiIS à haute température. Pour cela, nous avons mené une expérience *in vitro* à partir de protéines purifiées.

5.1 Obtention de la protéine purifiée TiIS

La protéine TiIS a été purifiée à partir du plasmide pET24 TiIS 6His. Ce plasmide a été construit en amplifiant par PCR la séquence codante du gène *tiIS* à partir du chromosome de *S. oneidensis*. Les amorces utilisées pour l'amplification comportent les sites de restriction NdeI et SacI et l'oligonucléotide à l'extrémité 3' comporte l'étiquette 6His (gtg x6) (Annexe 1). La séquence obtenue est alors clonée dans le vecteur pET-24b et le plasmide est ensuite transformé dans la souche BL21(DE3) (Tableau 2). La protéine a été surproduite et purifiée comme indiqué précédemment (paragraphe II.2.1, pages 31 à 34) (Figure 42 et Tableau 3). Cependant, j'ai dû modifier les conditions de surproduction afin d'obtenir la protéine TiIS soluble. Pour cela, les cellules sont incubées à 28°C sous agitation avec 0,1 mM d'IPTG pendant 2 heures.

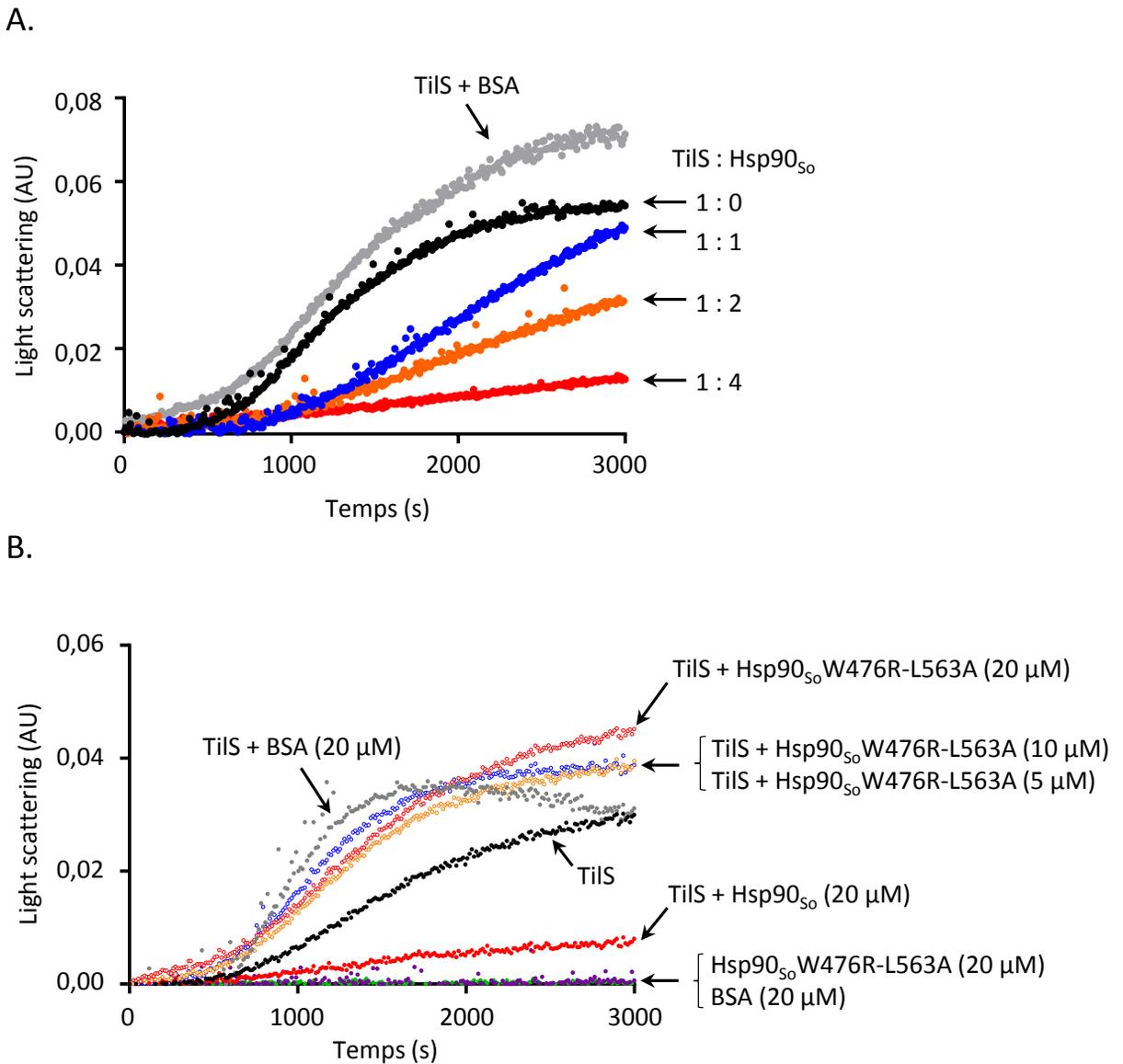


Figure 43 : La protéine Hsp90_{s0} empêche l'agrégation de la protéine TiIS à 42°C par une expérience de « light scattering ». La protéine mutante Hsp90_{s0} W476R-L563A perd cette capacité.

A. La protéine TiIS purifiée (5,4 μM) est ajoutée en absence ou présence de Hsp90_{s0} à différentes concentrations (5 μM; 10 μM; 20 μM). Les protéines sont ensuite incubées à 42°C et l'absorbance à DO₃₆₀ nm est suivie au cours du temps. L'augmentation de l'absorbance indique que la protéine TiIS s'agrège. Comme contrôle négatif on remplace Hsp90_{s0} par de la BSA (20 μM).

B. Comme pour (A), la protéine TiIS purifiée (5,4 μM) est ajoutée en absence ou présence de Hsp90_{s0} WT ou Hsp90_{s0} W476R-L563A à différentes concentrations (5 μM; 10 μM; 20 μM). Hsp90_{s0} W476R-L563A et la BSA n'agrègent pas seuls.

5.2 Expérience de « light scattering »

L'expérience de « light scattering » (diffusion de la lumière) permet de suivre l'agrégation de la protéine TiLS au cours du temps par mesure de l'absorbance à 360 nm avec le lecteur de microplaque (Tecan Spark 10M) et durant l'incubation à haute température. On ajoute 5 μ M de TiLS dans 25 mM de tampon HEPES pH=7,8 (volume final 100 μ L) que l'on incube à 42°C. Pour tester si Hsp90_{so} empêche l'agrégation de TiLS, nous avons ajouté la protéine Hsp90_{so} à différentes concentrations (5 μ M, 10 μ M ou 20 μ M). Hsp90_{so} a été dialysée précédemment avec une PD-10 (colonne de dessalage) dans 25mM de tampon HEPES pH=7,8. Comme contrôle, nous avons remplacé Hsp90_{so} par 20 μ M de BSA dialysée dans ce même tampon.

5.3 Interprétation des résultats

Tout d'abord nous pouvons voir que la protéine TiLS s'agrège au cours du temps à 42°C (Figure 43 A). Cependant, lorsqu'on ajoute des concentrations croissantes de protéine Hsp90_{so}, on observe une diminution de la quantité de TiLS agrégé. L'agrégation de TiLS est quasiment nulle avec 4 fois plus d'Hsp90_{so} que de TiLS. Nous avons reproduit l'expérience en remplaçant Hsp90_{so} par de la BSA. Dans ce cas, on observe à nouveau l'agrégation de TiLS. Ces résultats *in vitro* sont cohérents avec les précédents résultats *in vivo* (Figure 38 B) où on observe une diminution de la quantité de TiLS en absence de Hsp90_{so} à haute température. Cela indique donc qu'**en absence de Hsp90_{so}, TiLS n'est pas correctement replié ce qui entraîne son agrégation *in vitro* et sa dégradation *in vivo*.**

De façon intéressante, on peut voir qu'à l'inverse de Hsp90_{so} WT, **le mutant Hsp90_{so}W476R-L563A affecté dans l'interaction avec les substrats, ne permet plus la prévention de l'agrégation de TiLS** (Figure 43 B). Ce résultat conforte l'hypothèse que TiLS interagit avec la région de liaison au substrat d'Hsp90_{so}.

5.4 Vérification de la conformation de la protéine mutante Hsp90_{so}W476R-L563A

Pour vérifier que la perte d'interaction entre Hsp90_{so}W476R-L563A et TiLS n'est pas due à un mauvais repliement de la protéine Hsp90_{so} mutante, nous avons mené une expérience de digestion ménagée à la trypsine. Pour cela, nous avons ajouté 15 μ g de protéine Hsp90_{so} WT ou Hsp90_{so} W476R-L563A avec 10 ng de trypsine, dans du tampon 25 mM d'HEPES pH=7,5 et 50 mM de KCl (volume final : 50 μ L). Les tubes ont été incubés à 37°C. A différents

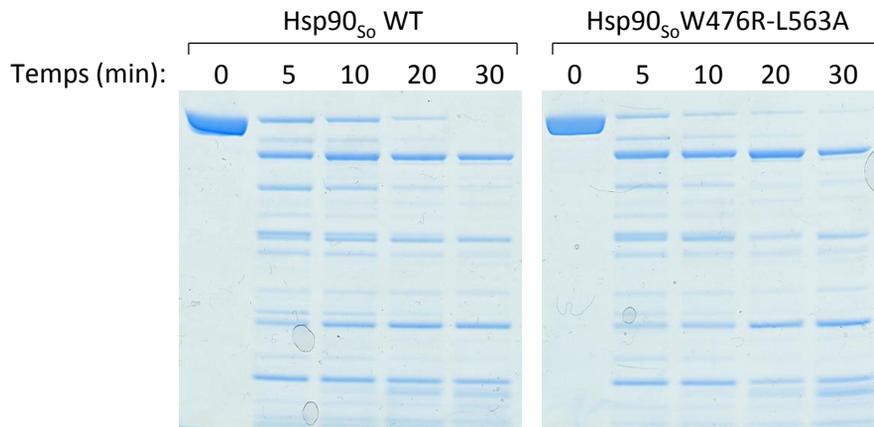


Figure 44 : Les profils de digestion ménagée à la trypsine des protéines Hsp90_{so} WT et Hsp90_{so} W476R-L563A sont identiques.

Digestion partielle des protéines Hsp90_{so} WT ou Hsp90_{so} W476R-L563A par la trypsine après différents temps d'incubation à 37°C. 10 µL de chaque fraction sont récupérés et chargés sur gel polyacrylamide-SDS. Les gels sont visualisés par coloration au bleu de Coomassie.

temps (0 min, 5 min, 10 min, 20 min et 30 min) on prélève 10 μ L de mélange auquel on ajoute 5 μ L de tampon de charge (TSTD). Puis on dénature les protéines 5 min à 95°C et on charge les échantillons sur gel polyacrylamide-SDS (Figure 44). Les profils de migration sont ensuite comparés. Ici, on peut voir que les profils de digestion ménagée de la protéine WT ou mutante sont similaires. Ces résultats indiquent que le défaut d'interaction observé entre la protéine mutante et TiIS est bien dû à une perte de capacité d'Hsp90_{So} mutée à interagir avec des clients.

Pour conclure cette partie des résultats, j'ai donc identifié un phénotype de croissance à haute température de la souche dépourvue de Hsp90 chez *Shewanella oneidensis*. Ces découvertes m'ont ensuite permis de mettre en évidence une première protéine cliente de Hsp90_{So}, la protéine TiIS. Ces recherches ont fait l'objet d'une publication que je signe en premier auteur dans « Cell Reports » (Honoré *et al.*, 2017) (Annexe 4).

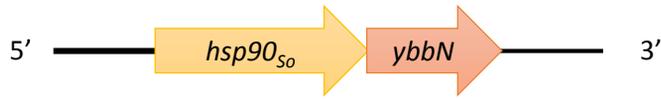


Figure 45 : Représentation schématique des gènes *hsp90_{So}* et *ybbN* de *S. oneidensis*.
Le gène *ybbN* est adjacent au gène *hsp90_{So}* chez *S. oneidensis*.

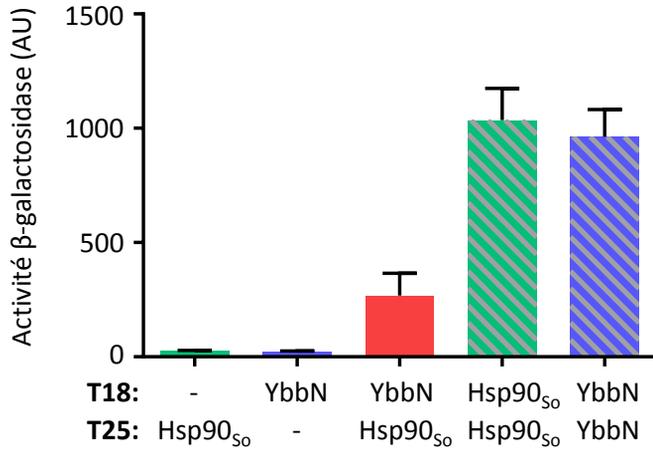


Figure 46 : Les protéines Hsp90_{So} et YbbN interagissent *in vivo* par double hybride bactérien.

Les plasmides T18-YbbN et T25-Hsp90_{So}, T18 et T25-Hsp90_{So}, T18-YbbN et T25 (contrôle négatif), T18-Hsp90_{So} et T25-Hsp90_{So} ou T18-YbbN et T25-YbbN ont été co-transformés dans la souche d'*E. coli* BTH101 Δ *htpG*. Les souches sont cultivées à 28°C pendant la nuit puis l'activité β -galactosidase est mesurée. Les valeurs montrées représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes avec leurs barres d'erreur.

V. YbbN un co-chaperon putatif d'Hsp90_{So}

1. Introduction sur la protéine YbbN

Chez la bactérie *Shewanella oneidensis*, le gène adjacent au gène *hsp90_{So}* est *ybbN* (Figure 45). Ces deux gènes sont en sythénie dans les espèces du genre *Shewanella* séquencées (plus de 25). La protéine YbbN est présente chez de nombreuses bactéries mais est absente chez les archées et les eucaryotes suggérant ainsi que la protéine YbbN joue un rôle important chez les bactéries (Kthiri *et al.*, 2008). Chez *E. coli*, YbbN est décrite comme étant une thiorédoxine, une enzyme permettant des réactions d'oxydoréduction. Les protéines de cette famille possèdent le motif caractéristique CXXC. De plus, cette protéine possède des propriétés chaperon, en effet la protéine forme des complexes avec les protéines mal repliées ou dénaturées par l'urée (Caldas *et al.*, 2006; Lin et Wilson, 2011). De façon surprenante, chez *S. oneidensis*, une seule cystéine du motif CXXC est présente, YbbN pourrait donc ne pas avoir de fonction thiorédoxine. Puisque Hsp90 est connu pour collaborer et interagir avec d'autres protéines chaperon (comme par exemple le système DnaK) nous avons émis l'hypothèse que chez *S. oneidensis*, YbbN puisse fonctionner avec Hsp90_{So}.

2. Interaction *in vivo* entre Hsp90_{So} et YbbN

Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord voulu voir une interaction *in vivo* entre les deux protéines. On utilise pour cela l'expérience de double hybride bactérien (voir paragraphe IV.4.1.a, page 46). Nous avons donc fusionné le domaine T18 de l'adénylate cyclase avec YbbN grâce à un clonage dans le vecteur pUT18Clinker aux sites de restriction PstI et XbaI (Annexe 1). Le plasmide T18-YbbN obtenu est co-transformé avec le plasmide T25-Hsp90_{So} dans la souche BTH101Δ*htpG* comme vu précédemment. Après induction de l'expression des gènes, nous mesurons les activités β-galactosidases (voir paragraphe IV.2.2 page 42). On observe un niveau d'activité β-galactosidase significatif dans la souche contenant les plasmides T25-Hsp90_{So} et T18-YbbN (Figure 46). Cela suggère que **les deux protéines Hsp90_{So} et YbbN interagissent**. Comme contrôles négatif, la protéine fusion T18-YbbN n'interagit pas avec le domaine T25 seul, et T25-YbbN n'interagit pas avec T18. Lorsque les protéines T18-YbbN et T25-YbbN sont produites dans la même souche, le niveau d'activité β-galactosidase est très élevé suggérant que YbbN dimérise.

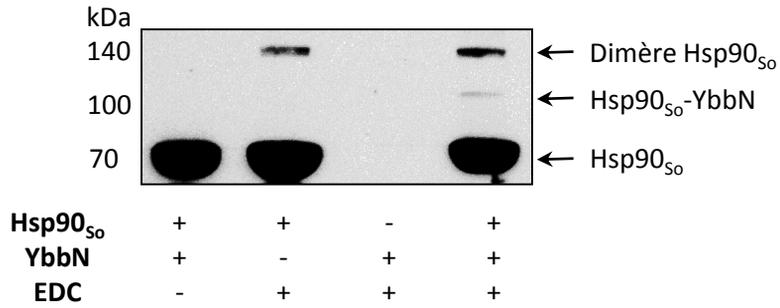


Figure 47 : Interaction *in vitro* par pontage chimique: les protéines Hsp90_{S_o} et YbbN interagissent.

Les protéines purifiées Hsp90_{S_o} (10 µg) et YbbN (10 µg) ont été incubées en présence ou absence de l'agent pontant EDC (0,5 mM) pendant 30 min. Après électrophorèse, les protéines sont ensuite visualisées par Western blot grâce aux anticorps anti-Hsp90_{E_c}.

3. Interaction *in vitro* entre Hsp90_{So} et YbbN

Dans le but de confirmer l'interaction entre Hsp90_{So} et YbbN, nous avons utilisé une technique *in vitro* de pontage chimique. Nous avons tout d'abord cloné le gène *ybbN* dans le vecteur pET24 aux sites de restriction NdeI et SacI en ajoutant à l'extrémité 5' une séquence codante pour l'étiquette 6His comme vu précédemment pour 6His Hsp90_{So} (paragraphe II.2.1.a, page 31) (Annexe 1). Le plasmide obtenu a ensuite été introduit dans la souche BL21(DE3) par transformation. On utilise ensuite le même protocole de surproduction et de purification que pour 6His Hsp90_{So}. Pour voir l'interaction *in vitro* entre les deux protéines, on utilise un agent pontant, l'EDC. En effet, si les deux protéines interagissent, l'EDC va stabiliser le complexe en pontant les groupements amines et carboxyles des deux protéines. On incube donc Hsp90_{So} (10 µg) et YbbN (10 µg) dans 20 µL avec ou sans EDC (0,5 mM) pendant 30 min. Puis, après ajout du tampon de charge (TSTD) et dénaturation 5 min à 95°C, on sépare les protéines par une migration sur gel polyacrylamide-SDS. Les protéines sont ensuite transférées par Western blot sur membrane de nitrocellulose. Un anticorps anti-Hsp90_{Ec} est utilisé pour révéler la présence de la protéine Hsp90_{So} et de nouveaux complexes protéiques. Ainsi, on peut voir qu'en présence d'EDC une bande aux environs de 140 kDa apparaît ce qui correspond au dimère de Hsp90_{So} (Figure 47). De plus, on peut voir une fine bande lorsqu'on ajoute les deux protéines YbbN et Hsp90_{So} ainsi que l'EDC. Cette bande pourrait correspondre au complexe entre un monomère de YbbN et un monomère d'Hsp90_{So}. Cette bande est absente sans l'agent pontant.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Vers une meilleure compréhension du fonctionnement de Hsp90 chez les bactéries

Chez les eucaryotes, la protéine chaperon Hsp90 a été bien caractérisée : elle est essentielle et de nombreux clients sont connus (Zuehlke et Johnson, 2010). Par contre, lorsque j'ai commencé à travailler au laboratoire, le rôle d'Hsp90 restait toujours mystérieux chez les bactéries malgré de nombreuses études. En effet, très peu de protéines clientes avaient été identifiées et seulement quelques phénotypes liés à l'absence d'Hsp90 avaient été décrits (Buchner, 2010). Le but de mes recherches a donc été de mieux comprendre le rôle et le fonctionnement de Hsp90 chez les bactéries. Puisque la plupart des recherches avaient été menées chez *E. coli*, nous avons recherché une nouvelle bactérie qui pourrait être un meilleur modèle pour étudier les chaperons. Nous avons choisi *S. oneidensis*, une bactérie aquatique retrouvée dans diverses niches écologiques (océans, lacs ou sédiments) qui possède une grande capacité d'adaptation à diverses conditions de stress (température, pression ou osmolarité). Ces conditions étant connues pour altérer le repliement des protéines, nous avons donc proposé que les chaperons de *S. oneidensis* puissent jouer un rôle prépondérant dans ses capacités d'adaptation.

Tout d'abord, nous avons construit une souche de *S. oneidensis* dépourvue du gène *hsp90* ($\Delta hsp90_{so}$) et avons recherché des phénotypes associés à cette délétion. Nous avons pu découvrir que la protéine Hsp90_{so} est essentielle à haute température (Figure 15 A et B). En effet, une souche ne produisant pas de protéine Hsp90 est incapable de pousser à haute température. Ce phénotype est cohérent avec ce qui est connu de la régulation transcriptionnelle du gène *hsp90*_{so}. Le gène est exprimé à un niveau basal déjà élevé en conditions normales de croissance et est fortement surexprimé lors d'un stress thermique.

L'essentialité d'Hsp90_{so} à haute température chez *S. oneidensis* fait penser aux résultats obtenus avec la cyanobactérie *Syneccocochus elongatus* (Tanaka et Nakamoto, 1999). En effet, il a été montré que chez cette bactérie, la protéine Hsp90 est également essentielle à haute température. Ainsi, bien que *S. elongatus* et *S. oneidensis* soient très éloignées phylogénétiquement, on retrouve le même phénotype lié à Hsp90 lors d'un stress thermique. Cependant, la ou les protéines clientes responsables de cette essentialité à haute température et en absence d'Hsp90 n'ont pas été identifiées à ce jour chez la cyanobactérie. J'ai pu montrer

que c'est l'absence de la protéine cliente Tils qui empêche la croissance chez *S. oneidensis* à haute température dans le mutant $\Delta hsp90_{so}$. Il pourrait donc être intéressant d'étudier un lien possible entre Hsp90 et Tils de *S. elongatus* ou d'autres espèces, ce qui pourrait permettre de généraliser notre découverte à d'autres bactéries. Il a aussi été montré que Hsp90 chez *S. elongatus* est également important à basse température ou lors d'un stress oxydant (Hossain et Nakamoto, 2002, 2003). J'ai testé ces mêmes stress avec la souche $\Delta hsp90_{so}$ de *S. oneidensis* mais je n'ai pas observé de phénotype particulier par rapport à la souche sauvage (Figure 15 A). D'autres conditions de stress pouvant affecter la croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}$ par rapport à la souche sauvage devront donc être recherchées. Ces stress pourraient être plus spécifiques des conditions physiologiques rencontrées par *S. oneidensis* comme la pression hydrostatique ou des variations de salinité.

Le phénotype lié à $Hsp90_{so}$ que j'ai identifié m'a permis également de mieux caractériser la protéine Hsp90. Comme expliqué précédemment, Hsp90 est une protéine dynamique qui subit plusieurs changements conformationnels pendant le cycle d'ATPase que ce soit chez les eucaryotes ou chez les procaryotes (Schopf *et al.*, 2017). Les régions de la protéine chaperon impliquées dans l'hydrolyse de l'ATP ou dans la liaison avec les protéines clientes ont été caractérisées *in vitro* (Genest *et al.*, 2011, 2013), mais faute de phénotype chez les bactéries, il n'a jamais pu être montré qu'*in vivo* ces régions étaient vraiment importantes, ce que mon étude a permis de mettre en évidence. En effet, j'ai montré que la mutation du résidu E34 conservé affecte très fortement l'activité ATPase en empêchant la croissance de *S. oneidensis* à haute température (Figures 21 et 27). Ce résultat prouve pour la première fois que l'activité ATPase de *S. oneidensis* est essentielle à sa fonction *in vivo* et ce résultat est en accord avec ce qui avait été montré auparavant chez les eucaryotes (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998).

Par ailleurs, nous avons vu que des résidus présents dans le domaine M (résidu W476) et le domaine C terminal (résidu L563) d' $Hsp90_{so}$ sont également importants pour la fonction du chaperon mais cette fois-ci pour l'interaction avec les protéines clientes (Figures 21, 41 et 43 B). On peut noter que la production de la protéine mutée $Hsp90_{so}W476R-L563A$ ne restaure que partiellement la croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}$ (Figure 21). Ces résultats montrent donc que ces résidus sont bien importants pour la fonction de la protéine mais ils suggèrent que d'autres résidus pourraient être également impliqués. De plus, on peut imaginer que comme

chez *E. coli*, ces résidus peuvent être différents selon la protéine cliente qui interagit avec Hsp90 (Genest *et al.*, 2013). Il sera donc intéressant de rechercher d'autres résidus d'Hsp90₅₀ impliqués dans l'interaction avec les clients en utilisant le phénotype de croissance à haute température.

Finalement, puisque Hsp90 est très conservé, il sera indispensable de regarder si Hsp90 est également essentiel chez d'autres espèces bactériennes, incluant des bactéries pathogènes. En effet, lors de l'infection, les mécanismes de défense de l'hôte sont perçus comme un stress pour les bactéries. On pourrait donc s'attendre à ce que Hsp90 soit nécessaire pour la survie dans ces conditions. En effet, il a été montré que Hsp90 joue un rôle important dans les processus d'infection chez certaines bactéries pathogènes telles que *Edwardsiella tarda* et *Salmonella typhimurium* (Dang *et al.*, 2011; Verbrugghe *et al.*, 2015). Dans mon étude, j'ai montré que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de Hsp90 (geldanamycine et radicicol) permet d'inactiver la protéine Hsp90 et l'empêche d'avoir sa fonction chaperon *in vivo* (Figure 19 et 39). Si Hsp90 est également essentiel chez d'autres bactéries, on pourra ainsi utiliser ce type de molécules comme de nouveaux antibiotiques, seuls ou en association avec des antibiotiques déjà existant. De plus, Hsp90 étant également impliqué dans la biosynthèse d'une toxine chez la bactérie *Xanthomonas albilineans* (Vivien *et al.*, 2005), l'utilisation du phénotype de croissance chez cette bactérie pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de Hsp90 dans la virulence de cette bactérie.

D'un autre côté, Hsp90 eucaryote est connu pour être impliqué dans le repliement d'oncoprotéines qui contribuent au développement de cancers (Neckers, 2007). De nombreuses études ont été menées pour réussir à inhiber Hsp90 eucaryote par des petites molécules, comme par exemple le radicicol, la geldanamycine ou leurs dérivés, afin d'empêcher la prolifération des cellules cancéreuses (Verma *et al.*, 2016). Mais plusieurs problèmes se posent lors de l'utilisation de ces inhibiteurs. Par exemple, ces molécules sont peu solubles dans l'eau et de plus, comme Hsp90 est essentiel chez les eucaryotes, il ne faut pas inhiber Hsp90 dans les cellules saines. Le phénotype de croissance lié à l'inhibition de Hsp90 de *S. oneidensis* à haute température pourrait être facilement utilisé pour cribler une librairie de molécules chimiques et identifier ainsi de nouveaux inhibiteurs d'Hsp90. Récemment des études ont été menées sur l'utilisation de nanoparticules qui encapsulent le principe actif (Sauvage *et al.*, 2017). En effet, cela permet de réduire la toxicité des molécules

et d'avoir une meilleure spécificité pour cibler localement les cellules tumorales. Une meilleure compréhension des mécanismes d'inactivation de Hsp90 procaryote pourrait donc servir pour les études sur Hsp90 eucaryote.

L'identification d'un phénotype lié à Hsp90 valide l'utilisation de *S. oneidensis* comme un nouveau modèle d'étude des protéines chaperons. Par la suite, nous pourrions utiliser cette bactérie modèle pour étudier et découvrir de nouveaux chaperons. Par exemple, nous avons déjà observé que chez *S. oneidensis* se trouvait quatre nouvelles protéines jamais caractérisées dans d'autres organismes possédant le domaine spécifique « J ». Ce domaine est la signature des co-chaperons de DnaK. J'ai travaillé quelques semaines sur ces quatre protéines, et le projet a ensuite été repris par un étudiant en Master 2. D'autres pistes de recherche seront employées pour permettre la découverte de nouveaux chaperons.

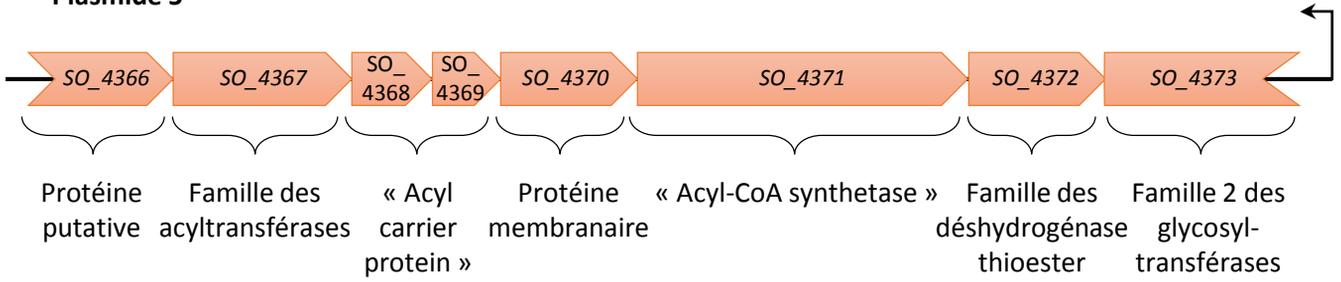
II. Vers la découverte d'autres protéines clientes de Hsp90_{S₀}

En utilisant le phénotype de croissance en absence de Hsp90_{S₀} chez *S. oneidensis* à haute température et grâce à la conception d'une banque plasmidique, nous avons pu identifier TiLS, une protéine cliente du chaperon Hsp90_{S₀}. La découverte d'une protéine cliente de Hsp90 permettant d'expliquer le phénotype observé en absence d'Hsp90 chez les procaryotes représente une avancée majeure. En effet, seules quelques protéines clientes de Hsp90 procaryote sont connues à ce jour (Buchner, 2010).

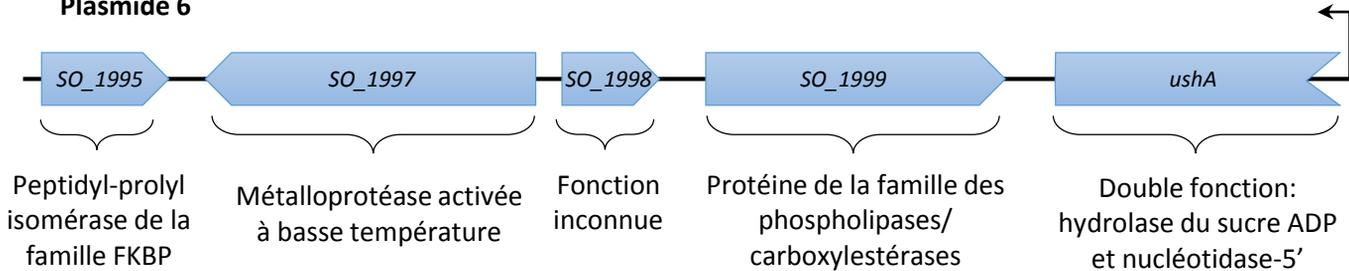
Cette protéine, TiLS, joue un rôle majeur dans le processus de traduction en modifiant un ARNt et lui permettant alors la reconnaissance du codon AUA. Il a été montré que TiLS d'*E. coli* est une protéine essentielle (Soma *et al.*, 2003) et j'ai observé qu'elle est également essentielle chez *S. oneidensis*. Le faible pourcentage d'identité (environ 34 %) entre la protéine TiLS de *S. oneidensis* et d'*E. coli* montre que bien que la fonction de la protéine semble être similaire, il pourrait y avoir de fortes différences quant à son interaction avec la protéine Hsp90. En effet, j'ai effectué des expériences préliminaires entre les deux protéines d'*E. coli*, mais Hsp90_{EC} et TiLS_{EC} ne semblent pas interagir par expérience de double hybride bactérien. Par contre, TiLS de *S. oneidensis* interagit avec Hsp90_{EC}. Cela semble cohérent car les deux protéines Hsp90_{S₀} et Hsp90_{EC} ont un fort pourcentage d'identité (environ 69 %). De plus, j'ai purifié la protéine TiLS_{EC} et contrairement à la protéine de *S. oneidensis*, TiLS_{EC} ne s'agrège pas après surproduction, ce qui facilite sa purification. On peut donc imaginer que la protéine TiLS n'est pas une protéine cliente de Hsp90 chez *E. coli*. Il sera donc intéressant par la suite de vérifier cette hypothèse. Ces résultats pourraient alors permettre d'expliquer pourquoi Hsp90 est essentiel chez *S. oneidensis* mais pas chez *E. coli*. Par ailleurs, on pourra par la suite élargir cette étude à d'autres organismes bactériens plus ou moins proches génétiquement de *S. oneidensis* afin de vérifier si TiLS est une protéine cliente de Hsp90. Notre hypothèse est que si la protéine TiLS est très homologue à TiLS_{S₀} et non TiLS_{EC}, elle pourrait être un client d'Hsp90 de la souche étudiée.

Nous avons vu que la protéine TiLS est dégradée en absence de Hsp90 à haute température (34°C) (Figure 38 B). Les mêmes observations avaient été faites avec les protéines clientes LR³⁰ chez *S. elongatus* et Cas3 chez *E. coli*. Ces résultats suggèrent que Hsp90 protège ses clients

Plasmide 5



Plasmide 6



Plasmide 7

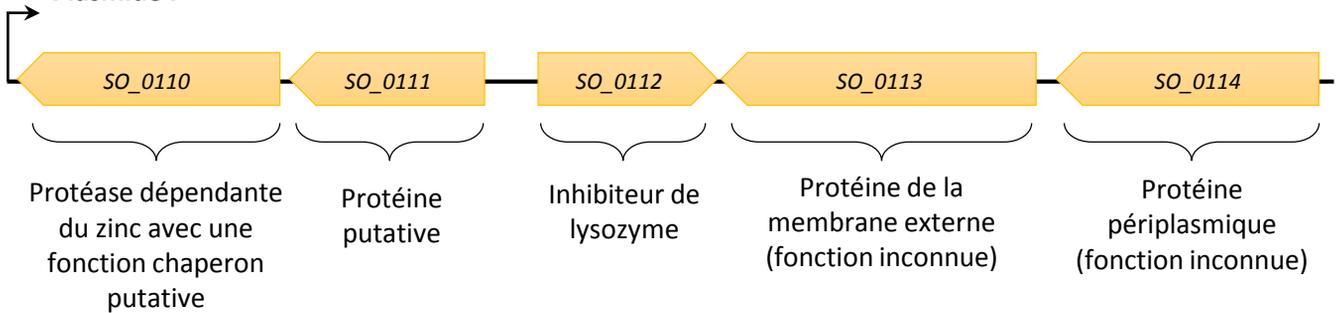


Figure 48 : Représentation schématique de 3 plasmides ne contenant pas le gène *tis* et obtenus à partir de la banque plasmidique présente dans la souche $\Delta hsp90_{so}$ après sélection à 35°C.

Chaque plasmide comporte des gènes de tailles différentes. Les gènes sont représentés par une flèche de couleur (rouge, bleu ou orange). Les gènes *SO_4373* et *ushA* sont incomplets.

Une accolade précise pour chaque gène la fonction putative de la protéine correspondante et les flèches noires représentent l'orientation du promoteur pBAD.

en favorisant leur repliement correct (Sato *et al.*, 2010; Yosef *et al.*, 2011). Si ces clients ne sont pas correctement repliés, ils sont dégradés par des protéases. Il sera très intéressant de chercher à identifier la ou les protéases impliquées dans la dégradation de TilS. Pour cela, nous muterons dans un premier temps les protéases les plus connues présentes chez *S. oneidensis*, telles que ClpXP, ClpAP et Lon et nous regarderons si, à haute température et en absence de Hsp90_{so}, TilS peut être stabilisé. Ainsi, la protéine TilS pourrait nous aider à mieux comprendre les systèmes de dégradation des protéines clientes ayant un mauvais repliement.

Grâce à l'utilisation de la banque plasmidique, j'ai identifié le gène *tis* dans 6 clones parmi les 10 obtenus. Il reste donc 4 clones (dont 3 différents) qui n'ont pas été étudiés jusqu'à présent (Figure 48). Chaque plasmide possède un insert contenant entre 5 et 8 gènes qui pourraient être responsable de la restauration du phénotype de croissance à haute température en absence d'Hsp90_{so}. Nous chercherons à comprendre lequel de ces gènes permet la croissance. Pour cela, nous clonerons individuellement chacun de ces gènes dans un plasmide qui sera introduit dans la souche $\Delta hsp90_{so}$. L'insert du plasmide d'origine pourra également être enlevé partiellement. Nous testerons ensuite la croissance à haute température. Ces recherches nous permettront d'identifier de nouvelles protéines clientes, qui pourraient avoir des rôles totalement différents de celui de TilS dans la cellule. On peut même envisager de découvrir de nouvelles protéines chaperons qui pourraient remplacer Hsp90_{so} à 35°C. Par exemple, on trouve le gène *SO_0110* codant pour une protéine ayant une fonction chaperon putative. Nous pourrions également tester la banque plasmidique dans d'autres conditions de stress afin d'identifier de nouvelles protéines qui peuvent compenser l'absence d'Hsp90_{so}.

Par ailleurs, si on surproduit en permanence TilS dans la banque plasmidique présente dans la souche $\Delta hsp90_{so}$ on peut imaginer que l'on peut faire pousser cette souche à plus haute température que celle précédemment testée (35°C). Cela pourrait ainsi permettre l'identification de protéines clientes de Hsp90 à plus haute température.

Afin d'identifier de nouvelles protéines clientes de Hsp90_{so}, d'autres approches pourront être employées. On pourra par exemple utiliser une banque de double hybride bactérien qui est disponible au laboratoire. Pour la construire, le chromosome de *S. oneidensis* a été digéré par l'enzyme Sau3A, et les fragments issus de cette digestion ont été clonés dans des vecteurs de type T18. On recherchera donc des interactions entre les protéines produites par la librairie

et la protéine Hsp90_{so} qui est fusionnée au domaine T25. Des résultats préliminaires ont permis d'identifier une protéine cliente putative. Il sera donc intéressant par la suite de vérifier si cette interaction est confirmée par d'autres approches *in vivo* et *in vitro*.

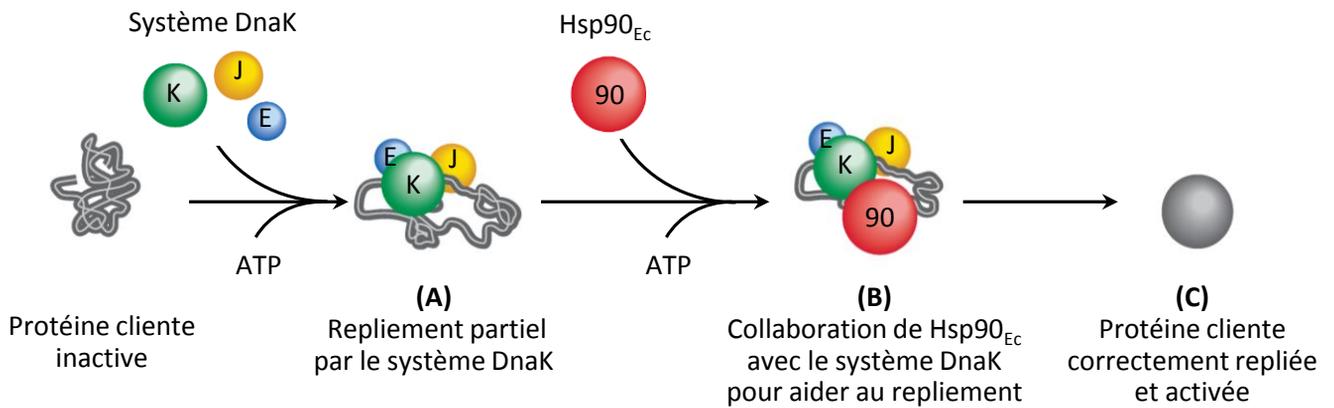


Figure 49 : Représentation schématique de la collaboration de Hsp90_{Ec} avec le système DnaK lors de la réactivation de substrats inactifs (Genest *et al.*, 2011).

Le système DnaK est composé de 3 protéines chaperons : en vert est représenté la protéine DnaK (Hsp70 chez les eucaryotes), en jaune la protéine DnaJ (Hsp40 chez les eucaryotes) et en bleu la protéine GrpE (NEF chez les eucaryotes).

- (A) Le système DnaK interagit avec la protéine cliente inactive en présence d'ATP et initie le repliement de la protéine.
- (B) Hsp90_{Ec} interagit avec le système DnaK en présence d'ATP. Cela entraîne le repliement de la protéine cliente inactive.
- (C) La protéine cliente correctement repliée est libérée par les protéines chaperons. Elle est maintenant active.

III. Hsp90_{So}, une protéine solitaire ou œuvrant avec d'autres chaperons et co-chaperons ?

Chez les eucaryotes, Hsp90 est connu pour collaborer avec de nombreux co-chaperons et avec le système chaperon Hsp70. Chez les bactéries, les co-chaperons semblent absents, mais il a été montré par des approches *in vitro* que le système chaperon DnaK (homologue à Hsp70 chez les eucaryotes) était nécessaire à l'activité chaperon de Hsp90 (Figure 49). En effet, Hsp90_{Ec} permet la réactivation d'une protéine dénaturée (la luciférase) seulement en présence du système DnaK (Genest *et al.*, 2011). La luciférase est une protéine cliente modèle utilisée classiquement pour étudier les chaperons *in vitro*. Chez *S. oneidensis*, le système DnaK est également présent. J'ai moi-même utilisé cette technique pour montrer que comme avec les protéines d'*E. coli*, la protéine Hsp90_{So} collabore avec DnaK de *S. oneidensis* (DnaK_{So}). Il a également été observé dans une autre étude que Hsp90_{So} interagissait directement avec DnaK mais aussi avec GroEL (Hsp60), un autre chaperon majeur (García-Descalzo *et al.*, 2011).

GroEL est la seule protéine chaperon à être essentielle chez les procaryotes et il semblerait que cette protéine joue un rôle important chez *S. oneidensis*. En effet lorsque j'ai étudié si Hsp90_{So} pouvait être co-purifié avec TilS (Figure 41), une bande supplémentaire est apparue sur le gel polyacrylamide-SDS. Après digestion par la trypsine et identification des peptides par spectrométrie de masse, nous avons identifié la protéine GroEL. Il se pourrait donc que TilS et GroEL interagissent, suggérant qu'il existe bien des collaborations entre les différents chaperons qui doivent se relayer pour permettre le repliement correct des protéines clientes. D'autre part, on a également observé que GroEL était co-purifié avec la protéine YbbN (dont le gène est contigu avec Hsp90 chez *S. oneidensis*). Il sera intéressant de confirmer ces deux résultats préliminaires par d'autres approches. On peut donc envisager des collaborations entre GroEL/ES, le système DnaK, le chaperon putatif YbbN et Hsp90 pour aider au repliement de TilS. Le rôle et la cinétique d'action de chaque chaperon dans cette collaboration devra être étudié.

Concernant la protéine YbbN, les résultats obtenus jusqu'à présent n'ont pas permis de confirmer que cette protéine est une protéine chaperon ou co-chaperon de Hsp90_{So}. Nous avons cependant observé qu'une interaction entre ces deux protéines est possible notamment par expérience de double hybride et par pontage biochimique. J'ai également

recherché un phénotype de croissance en absence du gène *ybbN* chez *S. oneidensis* ($\Delta ybbN$) à différentes températures (comme pour la souche $\Delta hsp90_{so}$) (Figure 15 A) et lors de différentes conditions de stress (milieu minimum, en anaérobiose, stress oxydatif) mais la souche $\Delta ybbN$ poussait comme la souche sauvage. Il semble donc qu'YbbN ne soit pas essentielle ou que je n'ai pas encore trouvé les bonnes conditions pour observer le phénotype de croissance associé. J'ai également construit le double mutant $\Delta hsp90_{so} \Delta ybbN$, mais je n'ai pas observé de phénotype particulier pour cette souche par rapport au simple mutant $\Delta hsp90_{so}$ ou $\Delta ybbN$. Par ailleurs, j'ai également fait des expériences de réactivation de la luciférase avec les protéines YbbN, DnaK et Hsp90_{so} pour tester si YbbN pouvait améliorer l'activité d'Hsp90. De façon inattendue, j'ai observé que la présence de YbbN inhibe légèrement la réactivation de la luciférase par le complexe chaperon. Il se pourrait donc que YbbN gêne l'interaction entre DnaK et Hsp90_{so}, ou bien entre Hsp90_{so} ou DnaK et le substrat. Il sera intéressant d'explorer ces pistes pour essayer de comprendre le rôle joué par YbbN dans le complexe système DnaK – Hsp90_{so}.

IV. Conclusion scientifique

Au cours de ces trois années j'ai donc étudié le chaperon Hsp90₅₀ chez la bactérie modèle *S. oneidensis*. L'utilisation de cette bactérie environnementale nous a permis de trouver un nouveau phénotype de croissance à haute température en absence du gène *hsp90₅₀*. Grâce à l'utilisation de ce phénotype et l'obtention d'une banque surproduisant l'ensemble des gènes de *S. oneidensis* sur des plasmides, nous avons identifié une nouvelle protéine cliente putative de Hsp90₅₀ (TiIS). Grâce à différentes approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons pu confirmer l'interaction entre les deux protéines et le fait que TiIS est une protéine cliente de Hsp90₅₀. De plus, en absence de Hsp90₅₀, cette protéine est dégradée dans la cellule. Cette étude a également permis de mettre en lumière une nouvelle protéine chaperon putative (YbbN) qui interagit également avec Hsp90₅₀. Son rôle dans la cellule reste encore à caractériser.

V. Conclusion personnelle

A titre personnel, ces trois ans ont été fortement bénéfique. En effet, après l'obtention de mon Brevet de Technicien Supérieur (BTS) et forte de mes stages en entreprise effectués dans cette même équipe du Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), j'ai pu continuer mon apprentissage dans le milieu de la Recherche. Au cours de ces années j'ai pu m'épanouir entièrement dans le travail qui m'était demandé chaque jour. J'ai ainsi acquis une plus grande autonomie et su prendre des initiatives. De plus, j'ai obtenu une bourse de financement pour participer à un congrès en Australie. J'ai également communiqué lors de séminaires et de réunions d'équipe organisés au sein de l'Institut. Par ailleurs, j'ai pu participer à l'écriture de deux papiers scientifiques (Honoré *et al.*, 2017; Lemaire *et al.*, 2016) (Annexe 4 et 7) et mes recherches ont contribué à l'obtention d'un financement de l'ANR. Enfin, grâce à ce financement, j'ai obtenu un contrat à durée déterminée en tant qu'Assistant Ingénieur pour trois années supplémentaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* *181*, 223–230.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). *In vivo* aspects of protein folding and quality control. *Science* *353*, aac4354.
- Bardwell, J.C., and Craig, E.A. (1988). Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* *170*, 2977–2983.
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* *62*, 1048–1063.
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2008). Improvement of bacterial two-hybrid vectors for detection of fusion proteins and transfer to pBAD-tandem affinity purification, calmodulin binding peptide, or 6-histidine tag vectors. *Proteomics* *8*, 4768–4771.
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods San Diego Calif* *58*, 325–334.
- Battesti, A., Hoskins, J.R., Tong, S., Milanesio, P., Mann, J.M., Kravats, A., Tsegaye, Y.M., Bougdour, A., Wickner, S., and Gottesman, S. (2013). Anti-adaptors provide multiple modes for regulation of the RssB adaptor protein. *Genes Dev.* *27*, 2722.
- Boczek, E.E., Reefschräger, L.G., Dehling, M., Struller, T.J., Häusler, E., Seidl, A., Kaila, V.R.I., and Buchner, J. (2015). Conformational processing of oncogenic v-Src kinase by the molecular chaperone Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E3189-3198.
- Bordi, C., Iobbi-Nivol, C., Méjean, V., and Patte, J.-C. (2003). Effects of ISSo2 insertions in structural and regulatory genes of the trimethylamine oxide reductase of *Shewanella oneidensis*. *J. Bacteriol.* *185*, 2042–2045.
- Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J., and Lindquist, S. (1989). Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 3919–3930.
- Buchner, J. (2010). Bacterial Hsp90-desperately seeking clients. *Mol. Microbiol.* *76*, 540–544.
- Cai, J., Chen, H., Thompson, K.D., and Li, C. (2006). Isolation and identification of *Shewanella alga* and its pathogenic effects on post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *J. Fish Dis.* *29*, 505–508.
- Caldas, T., Malki, A., Kern, R., Abdallah, J., and Richarme, G. (2006). The *Escherichia coli* thioredoxin homolog YbbN/Trxsc is a chaperone and a weak protein oxidoreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *343*, 780–786.
- Dang, W., Hu, Y., and Sun, L. (2011). HtpG is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*. *Vet. Microbiol.* *152*, 394–400.

- Dobson, C.M., and Ellis, R.J. (1998). Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *EMBO J.* *17*, 5251–5254.
- Ellis, R.J., and Minton, A.P. (2006). Protein aggregation in crowded environments. *Biol. Chem.* *387*, 485–497.
- García-Descalzo, L., Alcazar, A., Baquero, F., and Cid, C. (2011). Identification of *in vivo* HSP90-interacting proteins reveals modularity of HSP90 complexes is dependent on the environment in psychrophilic bacteria. *Cell Stress Chaperones* *16*, 203–218.
- Genest, O., Hoskins, J.R., Camberg, J.L., Doyle, S.M., and Wickner, S. (2011). Heat shock protein 90 from *Escherichia coli* collaborates with the DnaK chaperone system in client protein remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8206–8211.
- Genest, O., Reidy, M., Street, T.O., Hoskins, J.R., Camberg, J.L., Agard, D.A., Masison, D.C., and Wickner, S. (2013). Uncovering a region of heat shock protein 90 important for client binding in *E. coli* and chaperone function in yeast. *Mol. Cell* *49*, 464–473.
- Genest, O., Hoskins, J.R., Kravats, A.N., Doyle, S.M., and Wickner, S. (2015). Hsp70 and Hsp90 of *E. coli* Directly Interact for Collaboration in Protein Remodeling. *J. Mol. Biol.* *427*, 3877–3889.
- Graf, C., Stankiewicz, M., Kramer, G., and Mayer, M.P. (2009). Spatially and kinetically resolved changes in the conformational dynamics of the Hsp90 chaperone machine. *EMBO J.* *28*, 602–613.
- Grudniak, A.M., Pawlak, K., Bartosik, K., and Wolska, K.I. (2013). Physiological consequences of mutations in the *htpG* heat shock gene of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* *745–746*, 1–5.
- Grudniak, A.M., Markowska, K., and Wolska, K.I. (2015). Interactions of *Escherichia coli* molecular chaperone HtpG with DnaA replication initiator DNA. *Cell Stress Chaperones* *20*, 951–957.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* *177*, 4121–4130.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557–580.
- Hau, H.H., and Gralnick, J.A. (2007). Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.* *61*, 237–258.
- Heidelberg, J.F., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Gaidos, E.J., Nelson, W.C., Read, T.D., Eisen, J.A., Seshadri, R., Ward, N., Methe, B., et al. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat. Biotechnol.* *20*, 1118–1123.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* *172*, 6557–6567.

- Honoré, F.A., Méjean, V., and Genest, O. (2017). Hsp90 Is Essential under Heat Stress in the Bacterium *Shewanella oneidensis*. *Cell Rep.* *19*, 680–687.
- Hossain, M.M., and Nakamoto, H. (2002). HtpG plays a role in cold acclimation in cyanobacteria. *Curr. Microbiol.* *44*, 291–296.
- Hossain, M.M., and Nakamoto, H. (2003). Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr. Microbiol.* *46*, 70–76.
- Jhaveri, K., Taldone, T., Modi, S., and Chiosis, G. (2012). Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 742–755.
- Johnson, J.L. (2012). Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 607–613.
- Karagöz, G.E., and Rüdiger, S.G.D. (2015). Hsp90 interaction with clients. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 117–125.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 5752–5756.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* *82*, 323–355.
- Krukenberg, K.A., Street, T.O., Lavery, L.A., and Agard, D.A. (2011). Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q. Rev. Biophys.* *44*, 229–255.
- Kthiri, F., Le, H.-T., Tagourti, J., Kern, R., Malki, A., Caldas, T., Abdallah, J., Landoulsi, A., and Richarme, G. (2008). The thioredoxin homolog YbbN functions as a chaperone rather than as an oxidoreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *374*, 668–672.
- Lackie, R.E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V.G., Marques-Lopes, J., Choy, W.-Y., Duennwald, M.L., Prado, V.F., and Prado, M.A.M. (2017). The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* *11*, 254.
- Lavery, L.A., Partridge, J.R., Ramelot, T.A., Elnatan, D., Kennedy, M.A., and Agard, D.A. (2014). Structural asymmetry in the closed state of mitochondrial Hsp90 (TRAP1) supports a two-step ATP hydrolysis mechanism. *Mol. Cell* *53*, 330–343.
- Lemaire, O.N., Honoré, F.A., Jourlin-Castelli, C., Méjean, V., Fons, M., and Iobbi-Nivol, C. (2016). Efficient respiration on TMAO requires TorD and TorE auxiliary proteins in *Shewanella oneidensis*. *Res. Microbiol.* *167*, 630–637.
- Li, J., Soroka, J., and Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 624–635.
- Lin, J., and Wilson, M.A. (2011). *Escherichia coli* thioredoxin-like protein YbbN contains an atypical tetratricopeptide repeat motif and is a negative regulator of GroEL. *J. Biol. Chem.* *286*, 19459–19469.

- Lindquist, S. (2009). Protein folding sculpting evolutionary change. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *74*, 103–108.
- Liu, Y., Gao, W., Wang, Y., Wu, L., Liu, X., Yan, T., Alm, E., Arkin, A., Thompson, D.K., Fields, M.W., et al. (2005). Transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 in response to elevated salt conditions. *J. Bacteriol.* *187*, 2501–2507.
- Marcu, M.G., Chadli, A., Bouhouche, I., Catelli, M., and Neckers, L.M. (2000). The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J. Biol. Chem.* *275*, 37181–37186.
- Mayer, M.P., and Le Breton, L. (2015). Hsp90: breaking the symmetry. *Mol. Cell* *58*, 8–20.
- Motojima-Miyazaki, Y., Yoshida, M., and Motojima, F. (2010). Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *400*, 241–245.
- Myers, C.R., and Neelson, K.H. (1988). Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* *240*, 1319–1321.
- Neckers, L. (2007). Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J. Biosci.* *32*, 517–530.
- Obermann, W.M., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P., and Hartl, F.U. (1998). *In vivo* function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* *143*, 901–910.
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone *in vivo*. *EMBO J.* *17*, 4829–4836.
- Pearl, L.H. (2016). Review: The HSP90 molecular chaperone-an enigmatic ATPase. *Biopolymers* *105*, 594–607.
- Piper, P.W., and Millson, S.H. (2012). Spotlight on the microbes that produce heat shock protein 90-targeting antibiotics. *Open Biol.* *2*, 120138.
- Pratt, W.B., Gestwicki, J.E., Osawa, Y., and Lieberman, A.P. (2015). Targeting Hsp90/Hsp70-based protein quality control for treatment of adult onset neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *55*, 353–371.
- Press, M.O., Li, H., Creanza, N., Kramer, G., Queitsch, C., Sourjik, V., and Borenstein, E. (2013). Genome-scale co-evolutionary inference identifies functions and clients of bacterial Hsp90. *PLoS Genet.* *9*, e1003631.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* *18*, 754–762.
- Rodionov, D.A., Novichkov, P.S., Stavrovskaya, E.D., Rodionova, I.A., Li, X., Kazanov, M.D., Ravcheev, D.A., Gerasimova, A.V., Kazakov, A.E., Kovaleva, G.Y., et al. (2011). Comparative genomic

reconstruction of transcriptional networks controlling central metabolism in the *Shewanella* genus. *BMC Genomics* *12*, S3.

Röhl, A., Rohrberg, J., and Buchner, J. (2013). The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 253–262.

Sato, T., Minagawa, S., Kojima, E., Okamoto, N., and Nakamoto, H. (2010). HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Mol. Microbiol.* *76*, 576–589.

Sauvage, F., Messaoudi, S., Fattal, E., Barratt, G., and Vergnaud-Gauduchon, J. (2017). Heat shock proteins and cancer: How can nanomedicine be harnessed? *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *248*, 133–143.

Schopf, F.H., Biebl, M.M., and Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

Sharma, K.K., and Kalawat, U. (2010). Emerging infections: *Shewanella* - a series of five cases. *J. Lab. Physicians* *2*, 61–65.

Shrestha, L., Bolaender, A., Patel, H.J., and Taldone, T. (2016). Heat Shock Protein (HSP) Drug Discovery and Development: Targeting Heat Shock Proteins in Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* *16*, 2753–2764.

Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., and Suzuki, T. (2003). An RNA-Modifying Enzyme that Governs Both the Codon and Amino Acid Specificities of Isoleucine tRNA. *Mol. Cell* *12*, 689–698.

Stankiewicz, M., and Mayer, M.P. (2012). The universe of Hsp90. *Biomol. Concepts* *3*, 79–97.

Suzuki, T., and Miyauchi, K. (2010). Discovery and characterization of tRNA^{Ala} lysidine synthetase (TlIS). *FEBS Lett.* *584*, 272–277.

Taipale, M., Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 515–528.

Taldone, T., Sun, W., and Chiosis, G. (2009). Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* *17*, 2225–2235.

Tanaka, N., and Nakamoto, H. (1999). HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS Lett.* *458*, 117–123.

Thomas, J.G., and Baneyx, F. (1998). Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. *J. Bacteriol.* *180*, 5165–5172.

Tsutsumi, S., Mollapour, M., Prodromou, C., Lee, C.-T., Panaretou, B., Yoshida, S., Mayer, M.P., and Neckers, L.M. (2012). Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 2937–2942.

- Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J., Ringelberg, D.B., White, D.C., Nishijima, M., Sano, H., et al. (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *49 Pt 2*, 705–724.
- Verbrugghe, E., Van Parys, A., Leyman, B., Boyen, F., Haesebrouck, F., and Pasmans, F. (2015). HtpG contributes to *Salmonella Typhimurium* intestinal persistence in pigs. *Vet. Res.* *46*, 118.
- Verbrugghe, E., Van Parys, A., Haesendonck, R., Leyman, B., Boyen, F., Haesebrouck, F., and Pasmans, F. (2016). Subtherapeutic tetracycline concentrations aggravate *Salmonella Typhimurium* infection by increasing bacterial virulence. *J. Antimicrob. Chemother.* *71*, 2158–2166.
- Verma, S., Goyal, S., Jamal, S., Singh, A., and Grover, A. (2016). Hsp90: Friends, clients and natural foes. *Biochimie* *127*, 227–240.
- Vivien, E., Megessier, S., Pieretti, I., Cociancich, S., Frutos, R., Gabriel, D.W., Rott, P.C., and Royer, M. (2005). *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* *251*, 81–89.
- Yosef, I., Goren, M.G., Kiro, R., Edgar, R., and Qimron, U. (2011). High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 20136–20141.
- Young, J.C., Moarefi, I., and Hartl, F.U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* *154*, 267–273.
- Zuehlke, A., and Johnson, J.L. (2010). Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* *93*, 211–217.

ANNEXES

Annexe 1 :

Tableau des plasmides ainsi que des amorces oligonucléotidiques utilisés lors de cette étude.

Plasmides	Caractéristiques	Références
pBAD33	Vecteur contenant le promoteur arabinose P _{BAD} avec l'origine de réplication pACYC et permettant la résistance au chloramphénicol (Cm ^R)	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD33 BamHI mut	Vecteur pBAD33 ayant un des deux sites de restriction BamHI muté	Ce travail
<i>phsp90_{so}</i>	Séquence codante du gène <i>hsp90_{so}</i> clonée dans pBAD33	Ce travail
<i>phsp90_{so}</i> E34A	Séquence codante du gène <i>hsp90_{so}</i> portant la mutation E34A clonée dans pBAD33	Ce travail
<i>phsp90_{so}</i> W476R-L563A	Séquence codante du gène <i>hsp90_{so}</i> portant la double mutation W476R-L563A clonée dans pBAD33	Ce travail
<i>ptilS_{so}</i>	Séquence codante du gène <i>tilS</i> clonée dans pBAD33	Ce travail
<i>placZ</i>	Séquence codante du gène <i>lacZ</i> clonée dans pBAD33	Ce travail
p(AUA) <i>lacZ</i>	4 codons « ATA » fusionnés à la séquence codante du gène <i>lacZ</i> clonée dans pBAD33	Ce travail
<i>placZ-tilS</i> 6His	Séquence codante du gène <i>tilS</i> portant une étiquette 6His en position C-terminale clonée dans pBAD33 <i>lacZ</i>	Ce travail
p(AUA) <i>lacZ-tilS</i>	Séquence codante de <i>tilS</i> clonée dans p(AUA) <i>lacZ</i>	Ce travail
pKNG101	Vecteur contenant une origine de réplication λ pir et une origine de transfert R6K	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
pKNG101 Δ <i>hsp90_{so}</i>	Vecteur pKNG101 contenant 500 paires de base avant et après le gène <i>hsp90_{so}</i>	Ce travail
pKNG101 Δ <i>tilS</i>	Vecteur pKNG101 contenant 500 paires de base avant et après le gène <i>tilS</i>	Ce travail
pKNG101 Δ <i>ybbN</i>	Vecteur pKNG101 contenant 500 paires de base avant et après le gène <i>ybbN</i>	Ce travail
pET-24b	Vecteur (Kan ^R) contenant le promoteur du phage T7	Novagen [®]
pET24 6His Hsp90 _{so}	Séquence codante du gène <i>hsp90_{so}</i> clonée dans pET-24b fusionnée avec une étiquette 6His en position N-terminal	Ce travail
pET24 6His Hsp90 _{so} E34A	Séquence codante du gène <i>hsp90_{so}</i> portant la mutation E34A clonée dans pET-24b fusionnée avec une étiquette 6His en position N-terminal	Ce travail

pET24 6His Hsp90 _{so} W476R-L563A	Séquence codante du gène <i>hsp90_{so}</i> portant la double mutation W476R-L563A clonée dans pET-24b fusionnée avec une étiquette 6His en position N-terminal	Ce travail
pET24 TiIS 6His	Séquence codante du gène <i>tiIS</i> clonée dans pET-24b fusionnée avec une étiquette 6His en position C-terminal	Ce travail
pET24 6His YbbN	Séquence codante du gène <i>ybbN</i> clonée dans pET-24b fusionnée avec une étiquette 6His en position N-terminal	Ce travail
pKT25linker (T25)	Vecteur contenant le domaine catalytique T25 de l'adénylate cyclase (Kan ^R)	(Battesti et Bouveret, 2006)
T25-Hsp90 _{so}	Séquence codante de <i>hsp90_{so}</i> fusionnée au domaine T25 de l'adénylate cyclase dans pEB354	Ce travail
T25-YbbN	Séquence codante de <i>ybbN</i> fusionnée au domaine T25 de l'adénylate cyclase dans pEB354	Ce travail
pUT18Clinker (T18)	Vecteur contenant le domaine catalytique T18 de l'adénylate cyclase (Ap ^R)	(Battesti et Bouveret, 2006)
T18-Hsp90 _{so}	Séquence codante de <i>hsp90_{so}</i> fusionnée au domaine T18 de l'adénylate cyclase dans pEB355	Ce travail
T18-TiIS	Séquence codante de <i>tiIS</i> fusionnée au domaine T18 de l'adénylate cyclase dans pEB355	Ce travail
T18-YbbN	Séquence codante de <i>ybbN</i> fusionnée au domaine T18 de l'adénylate cyclase dans pEB355	Ce travail
pCBP	Vecteur pBAD24 contenant la séquence codante pour l'étiquette CBP (Ap ^R)	(Battesti et Bouveret, 2008)
pCBP-TiIS	Vecteur pBAD24 contenant la séquence codante pour le gène <i>tiIS</i> fusionné à l'étiquette CBP (Ap ^R)	Ce travail

Plasmides	Amorces nucléotidiques utilisées	Enzyme de restriction
pKNG101	UpKN : ccctggatttactgatgag RpKN : catatcacaactgctgctgga	
pBAD33 et pBAD24	pBADup : tacctgacgcttttatcgca pBADseqII : gggaccaccgctgactgcccaggc	
pET24b	T7pro : taatacgaactcactataggg T7ter : gctagttattgctcagcgg	
pBAD33 BamHI mut	F : taagattagcggTtctacactgacgct R : agcgtcaggttaggaAccgtaacttta	
<i>phsp90_{so}</i>	F : ta cccggg tgcgtaacaataaggaaaattcatgtc R : ta tctaga ttacttcaggttcgccaataacatttg	XmaI XbaI
<i>phsp90_{so}</i> E34A et pET24 6His <i>Hsp90_{so}</i> E34A	F : att ttc ttg cgt GCG ctg gtc tcc aac R : gtt gga gac cag CGC acg caa gaa aat	
<i>phsp90_{so}</i> W476R et pET24 6His <i>Hsp90_{so}</i> W476R	F : cgt atc gac gaa CGT tta atc aac cac R : gtg gtt gat taa ACG ttc gtc gat acg	
<i>phsp90_{so}</i> L563A	F : caa atg atc aaa GCT atg cag gct gcc R : ggc agc ctg cat AGC ttt gat cat ttg	
<i>phsp90_{so}</i> W476R-L563A et pET24 6His <i>Hsp90_{so}</i> W476R- L563A	F : caa atg atc aaa GCT atg cag gct gcc R : ggc agc ctg cat AGC ttt gat cat ttg	
<i>ptiS</i> (promoteur pBAD)	F : ta cccggg gaaatgggcttgttgacctag R : ta tctaga ctaaggattagcaattaaataac	XmaI XbaI
<i>placZ</i>	F : ta cccggg taagaaggagatatacat atg gtcgtttacaacgtcgtgactgg R : ta tctaga ttatTTTTgacaccagaccaactgg	XmaI XbaI
p(AUA) <i>lacZ</i>	F : ta cccggg taagaaggagatatacat atg gatgaataataaaacttataata gtcgtttacaacgtcgtgactgggaaaacc R : ta tctaga ttatTTTTgacaccagaccaactgg	XmaI XbaI
p(AUA) <i>lacZ-tiS</i>	F : ta tctaga ttaagccgagttaagcttagg R : ta gtcgac ctaaggattagcaattaaataacttaatcc	XbaI Sall
<i>placZ-tiS</i> 6His	F : ta tctaga ttaagccgagttaagcttagg R : ta gtcgac ctagtgggtggtggtgaggattagcaattaaataacttaatcc	XbaI Sall
pKNG101Δ <i>hsp90_{so}</i>	1: tgttggtcgaacaccagccgatg 2: gaa gcatcc tggcgttattagagcgtcacctag 3: gcccgaatgtc gaaatTTTcct tattgttacgc 4: aaggaaaatttc gacattcggggcacttgagttgag 5: gaa actagt ttgggtaaggctaacaaggctttg	BamHI SpeI
pET24 6His <i>Hsp90_{so}</i>	F : ta catatg caccaccaccaccac atgtcacaacaagaaactcatgg R : ta gagctc ttacttcaggttcgccaataac	NdeI SacI
pET24 <i>TiS</i> 6His	F : ta catatg actgcgaggatttaagtgtc R : ta gagctc ctagtgggtggtggtgaggattagcaattaaataacttaatcc	NdeI SacI
pET24 6His <i>YbbN</i>	F : ta catatg caccaccaccaccac atggacaatatcctcgatctaacc R : ta gagctc ttaatagagcaaggataaagcttac	NdeI SacI
T25- <i>Hsp90_{so}</i>	F : ta ctgcag ac atgtcacaacaagaaactcatgg R : ta tctaga ttacttcaggttcgccaataacatttg	PstI XbaI
T25- <i>YbbN</i>	F : ta ctgcag ac atggacaatatcctcgatctaacc R : ta tctaga ttacttcaggttcgccaataacatttg	PstI XbaI
T18- <i>Hsp90_{so}</i>	F : ta ctgcag a atgtcacaacaagaaactcatgg R : ta tctaga ttacttcaggttcgccaataacatttg	PstI XbaI
T18- <i>TiS</i>	F : ggc agc ctg cat agc ttt gat cat ttg R : ta ctgcag ctaaggattagcaattaaataacttaatcc	EcoRI XhoI
T18- <i>YbbN</i>	F : ta ctgcag a atggacaatatcctcgatctaacc R : ta tctaga ttacttcaggttcgccaataacatttg	PstI XbaI

Annexe 2 :

Méthodologie

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude sont décrites dans le Tableau 2 Les souches de *Shewanella oneidensis* MR1-R sont cultivées en aérobose à 28°C contrairement aux différentes souches d'*Escherichia coli* qui sont cultivées à 37°C en aérobose.

Les souches bactériennes sont conservées à -80°C en ajoutant du glycérol à une concentration finale de 20 % directement au milieu de culture bactérien.

- Milieu de culture

Milieu LB Liquide	
Extrait de levure	5 g/L
Bacto-tryptone	10 g/L
NaCl	5 g/L
Milieu LB solide	
Agar	15 g/L de milieu LB

- Antibiotiques

Les antibiotiques nécessaires sont ajoutés au milieu liquide ou solide aux concentrations suivantes :

Antibiotiques	
Ampicilline	50 µg/ml
Chloramphénicol	25 µg/ml
Kanamycine	50 µg/ml
Rifampicine	10 µg/ml
Streptomycine	100 µg/mL

- Inducteurs d'expression

L'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) et l'arabinose sont ajoutés afin d'induire respectivement l'expression d'un gène sous le contrôle du promoteur PTAC ou PBAD. Ils sont ajoutés au milieu de culture liquide et l'arabinose est aussi ajouté directement dans le milieu de culture solide.

Inducteurs	
IPTG	0,1 mM ou 1 mM
Arabinose	0,02 % ou 0,2 %

- Tampon de charge : le TSTD

Le TSTD contient un colorant bleu qui permet de tracer la mobilité des protéines lors d'une migration sur SDS-PAGE. Il permet d'entraîner l'extrait au fond des puits lors de la charge du gel et il a aussi un rôle de dénaturation des protéines.

Il est composé d'un mélange : de 2 volumes de TS + 1 volume de TD

TS	TD
Tris-HCL pH=8,8 (0,2 mol/L)	SDS 18 %
EDTA (5 mmol/L)	DTT 0,3 mol/L
Sucrose (1 mmol/L)	2-mercaptoethanol 5 %
Bleu de bromophénol (0,1 %)	

- Western blot

Les protéines sont tout d'abord séparées sur gel de polyacrylamide (Bolt 4-12% Bis Tris plus, Invitrogen) en appliquant un courant de 200V pendant 30 minutes. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose en utilisant l'appareil « Pierce Power Station » (Thermo Scientific) avec la cassette de transfert « Power Blot Cassette ». Le transfert s'effectue avec un courant de 25V, 1,3A pendant 7 min.

Après transfert, la membrane est saturée pendant 30 minutes avec les protéines présentes dans le lait ou de la BSA. Après lavage, la membrane est incubée pendant 1 heure avec un anticorps dirigé contre la protéine qu'on veut détecter. Cet anticorps interagit avec la protéine d'intérêt sur la membrane. La membrane est ensuite lavée plusieurs fois. La membrane est incubée ensuite 1 heure avec un deuxième anticorps couplé à une enzyme comme par exemple HRP (Horse Radish Peroxydase) qui reconnaît et interagit avec le premier anticorps déjà lié à la membrane. Après lavage, la membrane est incubée avec la solution « SuperSignal West Pico » (Thermo Scientific), le substrat de l'enzyme HRP, ce qui entraîne un signal lumineux au niveau de la protéine d'intérêt sur la membrane. Parfois, le premier anticorps est directement couplé à l'enzyme. Dans ce cas-là, il n'y a pas besoin d'utiliser un second anticorps.

Pour détecter ce signal lumineux, l'appareil ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare) permet de détecter et quantifier la chimioluminescence émise par l'enzyme HRP sur la membrane de nitrocellulose. L'appareil est composé d'une chambre noire fermée et d'une caméra CCD qui est généralement refroidit à -25°C afin de réduire le bruit de fond. La membrane est alors introduite dans la chambre noire et le temps d'exposition ainsi que l'analyse des données sont contrôlés par un ordinateur qui est connecté à l'appareil. On observe alors directement la membrane avec des bandes

noires correspondant au signal lumineux émis au niveau de la protéine d'intérêt. Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel ImageQuant.



Appareil ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare)

Annexe 3: Acte de congrès

The Hsp90 chaperone protein is essential in the *Shewanella oneidensis* bacteria under stress condition

Flora Honoré, Vincent Méjean and Olivier Genest

Poster présenté aux congrès :

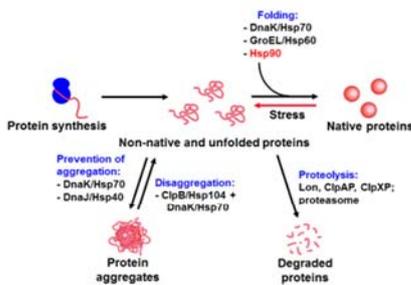
- Junior Scientists Microbiology Meeting of Marseille (JSM³) 2016, prix du meilleur poster.
- Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2016, Queensland (Australie).

1. Abstract

Molecular chaperones are proteins that assist the folding of other proteins. In stress conditions, they are crucial as proteins become misfolded. The Hsp90 chaperone is present in almost all living organisms and is essential in eukaryotes. Up to now, Hsp90 appears to be dispensable in proteobacteria and few client proteins have been identified for bacterial Hsp90. Therefore, to uncover the role of Hsp90 in bacteria, new bacterial models are needed. Bacteria from the *Shewanellae* genus are gamma-proteobacteria widely found in aquatic environments and sediments. *Shewanellae* have the astonishing ability to adapt to many stress conditions: large range of temperatures and salt concentrations, extremely high hydrostatic pressure since they can be found in deep-sea, and growth in very poor media. These environmental conditions being known to affect protein folding, it suggests the *Shewanellae* possess a large diversity of powerful chaperone proteins. Our research aims to elucidate the function of Hsp90 in bacteria by using *S. oneidensis* as a model organism. We first constructed an *hsp90* deletion strain in *S. oneidensis* and found that in contrast to wild type, the mutated strain was unable to grow at high temperature. Taking advantage of this phenotype, we identified proteins that can suppress the absence of Hsp90 at high temperature by using a *S. oneidensis* library of plasmids. This genetic selection revealed several protein candidates that are currently under study. It is anticipated that our study using *S. oneidensis* as a new bacterial model will lead to a better understanding of the role of Hsp90 in bacteria.

2. Background on chaperones

- Present in all living organisms
- Assist the other proteins from synthesis to degradation



3. Background on Hsp90

A. Eukaryotes

- Essential
- Has ATPase activity
- More than 300 client proteins known
- Role in cancer cells. Hsp90 inhibitors used in cancer treatment

B. Prokaryotes

- Has ATPase activity
- Very few interacting proteins identified
- Collaborates with the DnaK system (Genest et al., 2011)

E. coli:

- Not essential (Bardwell and Craig, 1988)
- Involved in bacterial immunity (CRISPR system) (Yosef et al., 2011)
- Involved in motility (Press et al., 2013)

Cyanobacteria:

- Important for thermal stress resistance (Tanaka and Nakamoto, 1999)
- Role in cold and oxidative stress adaptation (Hossain and Nakamoto, 2002 and 2003)

4. Background on *S. oneidensis* – A new bacterial model for chaperone study?

Shewanellae: ubiquitous environmental bacterial model found in marine and fresh water, and in sediments.

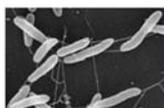


Astonishing ability to adapt to stresses:

- Temperatures: 5°C to 38°C
- Salinity: fresh water to marine water
- High hydrostatic pressure
- Urea
- Poor/toxic environment (sediments/metals)

Easy to manipulate:

- Generation time: ~1h at 28°C
- Genetics: gene knock-out, plasmids, protein overproduction



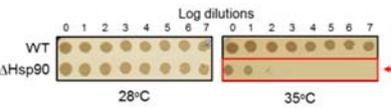
Biotechnological applications:

- Production of recombinant proteins
- Detoxification of polluted environments

5. Hsp90 is essential for *S. oneidensis* under heat stress

Identification of a phenotype:

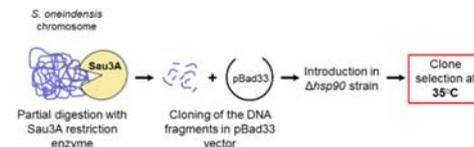
- WT and Δ Hsp90 *S. oneidensis* strains were grown at 28°C
- 2 μ L of 10-times serial dilutions was spotted on plates
- Plates were incubated overnight at 28°C or 35°C



- The absence of Hsp90 prevents growth at high temperature
- Production of Hsp90 from a plasmid complements the mutation

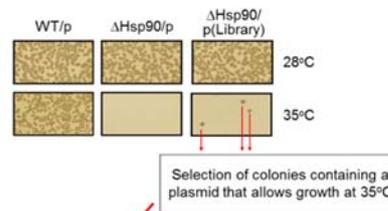
6. Plasmid library used to identify clients of Hsp90

A. Plasmid library construction



- More than 95% coverage of the *S. oneidensis* genome
- DNA fragments from 2 to 10 kb

B. Isolation of clones growing at high temperature

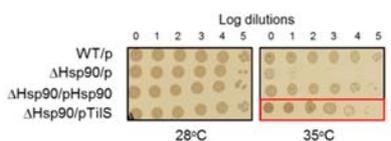


- Plasmid isolation
- Sequencing of the genes
- Cloning of the genes
- Introduction of the new plasmids in the Δ hsp90 strain

- 10 clones were selected
- 6 of the plasmids isolated contained the *tiiS* gene

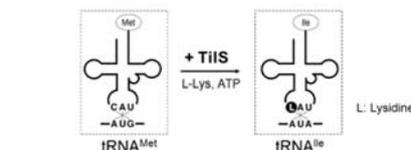
7. Overproduction of TiiS suppresses the absence of Hsp90 at high temperature

- Strains with an empty vector (p), a plasmid for the production of Hsp90 (pHsp90) or TiiS (pTiiS) were serially diluted, spotted on LB-agar plates, and incubated at 28°C or 35°C.



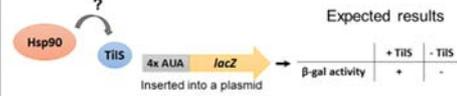
Background on TiiS

- TiiS is a tRNA^{Met}-lysine synthetase
- TiiS modifies the tRNA^{Met} (AUG \rightarrow Met) in tRNA^{Met} (AUA \rightarrow Ile)

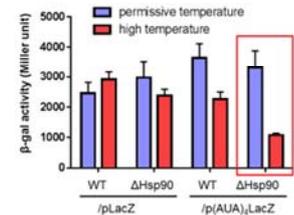


- TiiS is essential in *E. coli*

8. The activity of TiiS is reduced in the absence of Hsp90 at high temperature

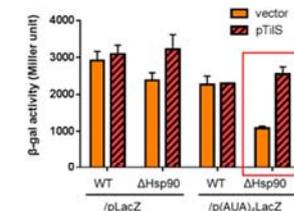


- WT and Δ Hsp90 strains containing pLacZ or p(AUA)₄LacZ were grown at permissive (28°C) or sub-lethal temperature (34°C)
- Expression of *lacZ* or (AUA)₄*lacZ* was induced by adding arabinose
- After 2 hours, β -galactosidase activity was measured



- The activity of TiiS is reduced at high temperature in the absence of Hsp90

- Same strains as above with an additional empty vector or a plasmid containing *tiiS* were grown at sub-lethal temperature (34°C)

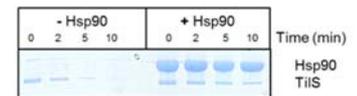


- Addition of TiiS rescues the decrease of β -galactosidase activity measured in the absence of Hsp90

- TiiS is thus most probably a client of Hsp90

9. Hsp90 protects TiiS from aggregation at high temperature in vitro

- Purified TiiS was incubated with or without purified Hsp90
- The mixtures were incubated at 45°C
- Aggregates were removed by centrifugation
- Supernatants were loaded on a SDS 12% PAGE



10. Conclusions

- Hsp90 is essential at high temperature in *S. oneidensis*
- The ATPase activity of Hsp90 plays a key role for chaperone function *in vivo*
- Potential clients were identified using a library of plasmid
- We found that Hsp90 improves the activity of one of them, TiiS, at high temperature, strongly suggesting TiiS is a client of Hsp90
- The same method will be used to identify other clients of Hsp90 under various stress conditions

Annexe 4: Article 1

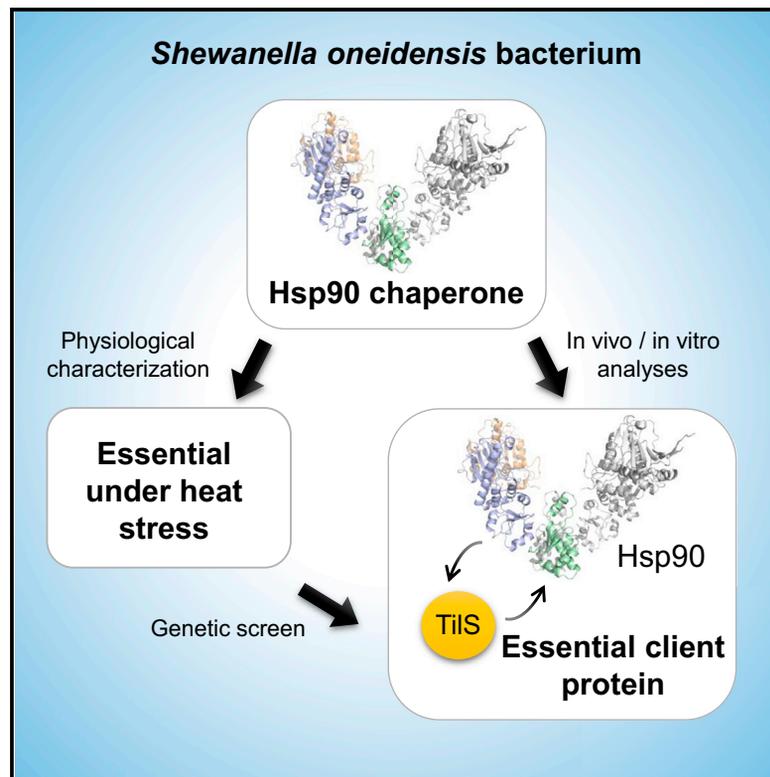
Hsp90 Is Essential under heat stress in the Bacterium *Shewanella oneidensis*

Flora A. Honoré, Vincent Méjean and Olivier Genest.

Cell Reports 19, 680–687 (2017).

Hsp90 Is Essential under Heat Stress in the Bacterium *Shewanella oneidensis*

Graphical Abstract



Authors

Flora Ambre Honoré, Vincent Méjean, Olivier Genest

Correspondence

ogenest@imm.cnrs.fr

In Brief

Honoré et al. show that Hsp90 is essential in the model bacterium *Shewanella oneidensis* under heat stress, which is contrary to previously published reports. They also identify a tRNA maturation factor TiIS as a client of Hsp90 that explains the essentiality of the chaperone.

Highlights

- Hsp90 is essential in the model bacterium *S. oneidensis* under heat stress
- A genetic screen uncovered an Hsp90 client (TiIS) involved in tRNA maturation
- Hsp90 increases the amount and activity of the TiIS client under heat stress
- Hsp90 interacts with TiIS and protects it from aggregation in vitro



Hsp90 Is Essential under Heat Stress in the Bacterium *Shewanella oneidensis*

Flora Ambre Honoré,¹ Vincent Méjean,¹ and Olivier Genest^{1,2,*}

¹Aix Marseille Univ, CNRS, BIP UMR 7281, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, France

²Lead Contact

*Correspondence: ogenest@imm.cnrs.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.082>

SUMMARY

The Hsp90 chaperone is essential in eukaryotes and activates a large array of client proteins. In contrast, its role is still elusive in bacteria, and only a few Hsp90 bacterial clients are known. Here, we found that Hsp90 is essential in the model bacterium *Shewanella oneidensis* under heat stress. A genetic screen for Hsp90 client proteins identified TiIS, an essential protein involved in tRNA maturation. Overexpression of TiIS rescued the growth defect of the *hsp90* deletion strain under heat stress. In vivo, the activity and the amount of TiIS were significantly reduced in the absence of Hsp90 at high temperature. Furthermore, we showed that Hsp90 interacts with TiIS, and Hsp90 prevents TiIS aggregation in vitro at high temperature. Together, our results indicate that TiIS is a client of Hsp90 in *S. oneidensis*. Therefore, our study links the essentiality of bacterial Hsp90 at high temperature with the identification of a client.

INTRODUCTION

All living organisms have developed several response mechanisms to survive in stress conditions. One of them involves a class of proteins, the chaperones, that are essential to maintain cellular proteostasis (Balchin et al., 2016). The Hsp90 chaperone is conserved in bacteria and in eukaryotes and participates, in collaboration with the Hsp70 chaperone system, in protein folding and activation (Johnson, 2012; Stankiewicz and Mayer, 2012; Taipale et al., 2010).

Hsp90 is a dimer and each protomer consists of three domains (Figure 1A) (Stankiewicz and Mayer, 2012; Taipale et al., 2010). The N-terminal domain binds and hydrolyses ATP. Residues from the M- and the C-terminal domains encompass a region involved in client binding, and the C-terminal domain allows the dimerization of the protein. Hsp90 is a highly dynamic protein (Flynn et al., 2015; Krukenberg et al., 2011; Li et al., 2012; Mayer and Le Breton, 2015; Shiau et al., 2006) with several conformations that are influenced by the presence of nucleotides (ATP or ADP) bound to the N-domain. In eukaryotes, Hsp90 is essential and more than

300 client proteins have been identified (Taipale et al., 2010). In addition, Hsp90 participates in tumorigenesis by allowing the folding and activation of oncoproteins (Neckers, 2007; Vartholomaiou et al., 2016). Therefore, Hsp90 is a target for cancer treatments.

In contrast to eukaryotes, the role of Hsp90 is still highly elusive in bacteria, and Hsp90 seems not to be essential in proteobacteria. In *E. coli*, the absence of Hsp90 (HtpG) leads to slight effects at very high temperature (Bardwell and Craig, 1988; Grudniak et al., 2013; Press et al., 2013; Thomas and Baneyx, 2000). In addition, Hsp90 participates in bacterial immunity via the CRISPR system (Yosef et al., 2011), in the virulence of some bacteria like extraintestinal pathogenic *E. coli* strains, *Edwardsiella tarda*, or *Salmonella typhimurium* and plays a role in the biosynthesis of antibiotic and toxins (Dang et al., 2011; Garcie et al., 2016; Verbrugghe et al., 2015; Vivien et al., 2005). However, the precise function of Hsp90 in virulence, i.e., the client proteins involved, is unknown. In contrast, in cyanobacteria that are phylogenetically distant from proteobacteria, Hsp90 is essential in heat stress and contributes to the resistance to oxidative stress (Hossain and Nakamoto, 2003; Tanaka and Nakamoto, 1999). In addition, only few Hsp90 clients have been identified so far in bacteria (Buchner, 2010). In *E. coli*, they include the L2 ribosomal protein, Cas3 from the CRISPR system, possibly CheA and FliN that participate in motility, and in cyanobacteria, a 30-kDa linker polypeptide of a large complex involved in photosynthesis, the phycobilisome (Motojima-Miyazaki et al., 2010; Press et al., 2013; Sato et al., 2010; Yosef et al., 2011). In vitro, Hsp90 from *E. coli* and from cyanobacteria has been shown to collaborate with the DnaK chaperone system to remodel denatured proteins (Genest et al., 2011; Nakamoto et al., 2014).

Shewanella are ubiquitous Gram-negative γ -proteobacteria found in oceans, lakes, and sediments (Hau and Gralnick, 2007). Given the wide changing conditions in which these bacteria evolve, they possess a great ability to adapt to stress. Therefore, we chose to study chaperone proteins in the model *Shewanella oneidensis*. We found that Hsp90 from *S. oneidensis* (Hsp90_{So}) is essential for growth at high temperature. We also identified an essential client of Hsp90_{So} involved in tRNA maturation. When overproduced, this client restored the growth defect of the Hsp90_{So} deletion strain, therefore explaining why Hsp90 is essential in *S. oneidensis*. This work will pave the way for a better understanding of the Hsp90 chaperone in bacteria.

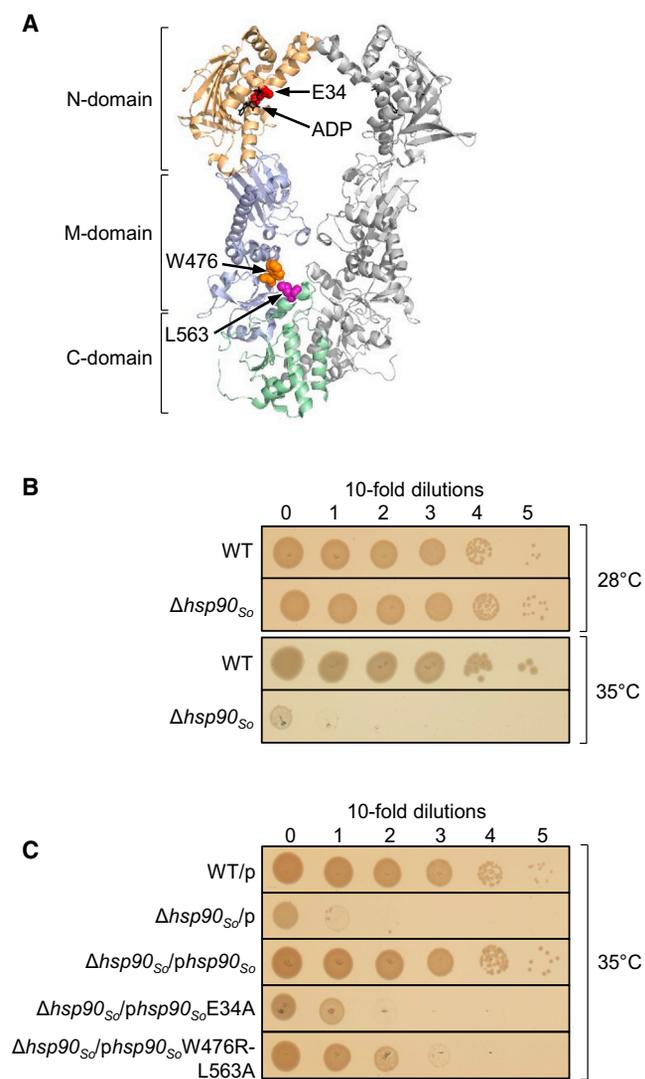


Figure 1. Hsp90_{So} Is Essential for *S. oneidensis* Growth at High Temperature

(A) Model of the structure of Hsp90 from *E. coli* (Hsp90_{Ec}) crystalized in the presence of ADP (PDB: 2iop) (Shiau et al., 2006). Hsp90_{Ec} is shown as a dimer. In one protomer, the N-domain, M-domain, and C-domain are colored yellow, blue, and green, respectively. The ADP molecule is represented in black. The conserved E34 residue important for ATP hydrolysis and the conserved W476 and L563 residues (Hsp90_{So} numbering) important for client binding are colored and shown as CPK models.

(B) WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains grown at 28°C were diluted to OD₆₀₀ = 1. 10-fold serial dilutions were spotted on LB plates that were incubated at 28°C or 35°C as indicated.

(C) WT strain containing the pBad33 vector (WT/p), and $\Delta hsp90_{So}$ strain containing either pBad33 ($\Delta hsp90_{So}/p$) or the *phsp90_{So}* WT or mutant plasmids grown at 28°C with chloramphenicol were diluted to OD₆₀₀ = 1. 10-fold serial dilutions were spotted on LB plates containing 0.02% arabinose that were incubated for 24 hr at 35°C. In (B) and (C), plates are representative of at least three experiments.

See also Figure S1.

RESULTS AND DISCUSSION

Hsp90_{So} Is Essential at High Temperature in *S. oneidensis*

To evaluate the role of Hsp90 in *S. oneidensis*, we deleted the gene coding for Hsp90_{So}. The wild-type (WT) and $\Delta hsp90_{So}$ strains were grown aerobically at 28°C, and serial dilutions were spotted on plates. When the plates were incubated at 28°C or at lower temperatures, no growth difference was observed between the WT and the $\Delta hsp90_{So}$ strains (Figures 1B and S1A). However, when the plates were incubated at a high temperature for *S. oneidensis* (35°C), the growth of the $\Delta hsp90_{So}$ strain was dramatically affected, whereas the WT strain grew as well as at 28°C (Figure 1B). Similar results were obtained when the cells were grown in liquid media at 38°C (Figure S1B). Moreover, addition of the Hsp90 inhibitors geldanamycin or radicicol strongly reduced the growth of the WT strain at 38°C (Figure S1B).

To confirm that the growth defect was due to the absence of Hsp90_{So}, we performed a complementation assay. The $\Delta hsp90_{So}$ strain containing an empty vector grew very poorly at 35°C on plate (Figure 1C). In contrast, in the presence of the *phsp90_{So}* plasmid producing Hsp90_{So}, the growth was restored to the same level as the WT strain containing an empty vector. We also checked that the three strains grew similarly at 28°C (Figure S1C). Altogether, these results indicate that Hsp90_{So} is required for the growth of *S. oneidensis* at high temperature.

This growth defect is reminiscent of the phenotype observed with the *Synechococcus* cyanobacteria (Tanaka and Nakamoto, 1999). While *Synechococcus* and the γ -proteobacteria *S. oneidensis* are distant evolution-wise, their Hsp90 chaperone have a common essential role at high temperature. We thus propose that Hsp90 could be essential in many other bacteria in stressful conditions.

ATP Hydrolysis and Client Binding Are Important for the Chaperone Function of Hsp90_{So} In Vivo

It has been shown that the ATPase activity of Hsp90 in eukaryotes is essential for its function (Obermann et al., 1998; Panaretou et al., 1998). Taking advantage of the essential role of Hsp90_{So} at high temperature, we tested whether an Hsp90_{So} mutant that is affected for ATPase activity could complement the $\Delta hsp90_{So}$ strain. Based on previous works (Genest et al., 2011; Graf et al., 2009; Obermann et al., 1998; Panaretou et al., 1998), we constructed the Hsp90_{So} mutant E34A (Figure 1A). The mutant protein was purified and its ATPase activity was dramatically affected compared to the WT protein (Figure S1D). Then, the plasmid containing the *hsp90_{So}* mutant gene, *phsp90_{So}E34A*, was introduced into the $\Delta hsp90_{So}$ strain. We found that the mutant protein Hsp90_{So}E34A did not complement the growth defect of the $\Delta hsp90_{So}$ strain at high temperature (Figure 1C). As controls, we observed that the mutation did not affect growth at 28°C (Figure S1C) and we checked by western blot with an anti-Hsp90 antibody that the mutant protein was produced at the same level as the WT protein (Figure S1E).

We also mutated residues located in the region of Hsp90_{So} that is known to participate in client binding in Hsp90_{Ec} and yeast Hsp82 (Genest et al., 2013; Street et al., 2012). The W476 and

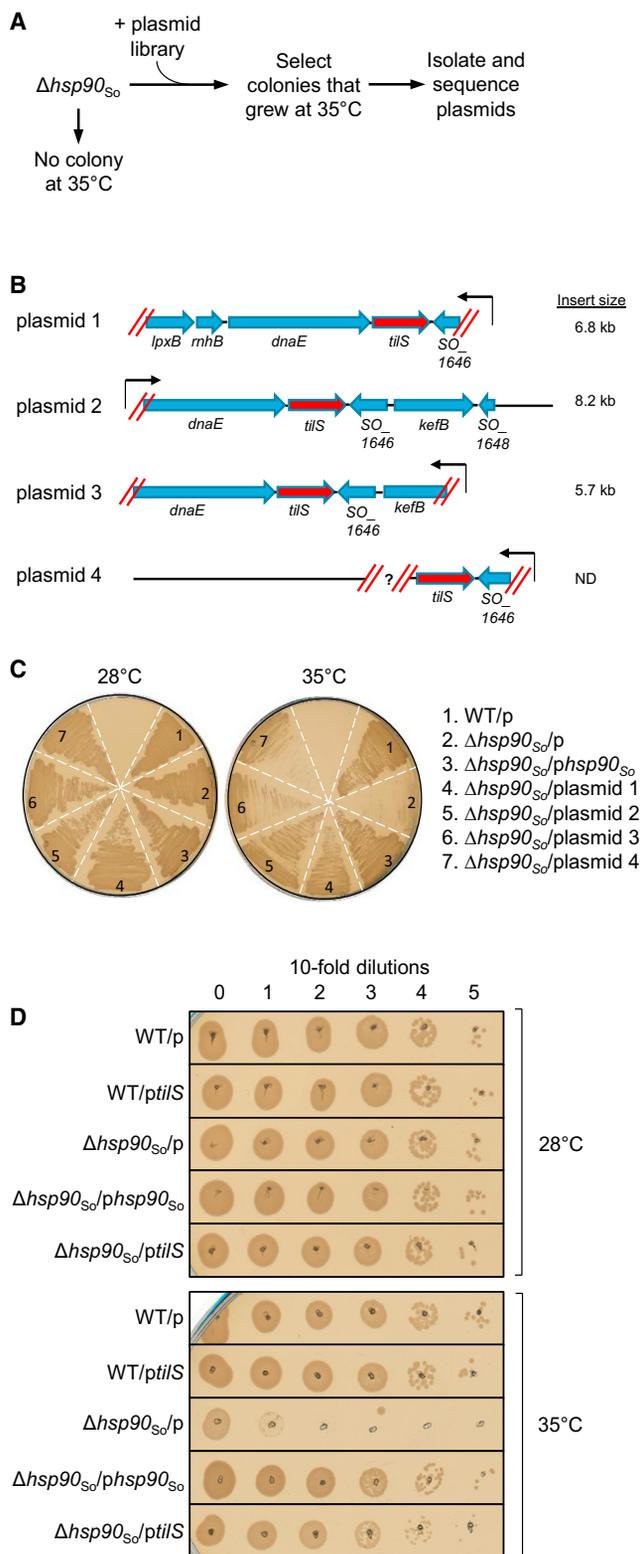


Figure 2. TiiS Overproduction Rescues the Growth Defect of the $\Delta hsp90_{So}$ Strain

(A) Experimental design to identify proteins that rescue the growth defect of the $\Delta hsp90_{So}$ strain at high temperature using a plasmid library.

L563 residues corresponding to the conserved residues W467 and L553 from Hsp90_{Ec} were simultaneously mutated (double mutant W476R-L563A) in Hsp90_{So} (Figure 1A). At 28°C, the mutation did not reduce *S. oneidensis* growth (Figure S1C) and western blots show that the mutant protein was also produced (Figure S1E). In contrast, the $\Delta hsp90_{So}$ strain producing Hsp90_{So} W476R-L563A was affected for growth at high temperature, although less drastically than the strain producing the E34A mutant (Figure 1C). This result suggests that this region is important for client binding in Hsp90_{So}, but that other residues in this region or in another region of Hsp90 might also participate in client binding as proposed by other groups (Karagöz and Rüdiger, 2015; Röhl et al., 2013). Because Hsp90_{So} is essential in *S. oneidensis*, the identification of such regions will be facilitated. Altogether, these results indicate that ATPase activity and client binding play key roles for chaperone function of Hsp90_{So} at high temperature.

Overproduction of TiiS Suppresses the Growth Defect of the $\Delta hsp90_{So}$ Strain at High Temperature

We used the growth phenotype of the $\Delta hsp90_{So}$ strain at high temperature to identify proteins that, when overproduced, can suppress the growth defect of the mutated strain. Such proteins could either be other chaperones that compensate for the absence of Hsp90_{So} or clients of Hsp90_{So}. Indeed, a high amount of an essential client protein could bypass the need of Hsp90_{So}, because a fraction of the client protein pool could spontaneously be folded without the chaperone. We constructed a library of plasmids that contained partially digested genomic DNA fragments (5–8 kb) of *S. oneidensis* (Figure 2A). The library was introduced into the $\Delta hsp90_{So}$ strain. Sixteen clones out of 2×10^8 cells were recovered at high temperature (Figure S2A), and the plasmids were partially sequenced. Because the chromosomal fragments we cloned when we constructed the library were rather large, several genes were present in the plasmids. Strikingly, among the 16 plasmids we partially sequenced, the entire *tiiS* gene was identified ten times in four independent plasmids (Figure 2B). To confirm that growth restoration of the $\Delta hsp90_{So}$ strain at 35°C was due to the presence of these plasmids, we extracted and reintroduced them into the $\Delta hsp90_{So}$ strain. The presence of these plasmids partially rescued the growth defect of the $\Delta hsp90_{So}$ strain at 35°C (Figure 2C). Finally, the *tiiS* gene was cloned into a vector under an

(B) Schematic of the genes present in the plasmids identified with the plasmid library. The *tiiS* gene (colored red) was identified in the plasmids from four independent clones. Black arrows show the orientation of the pBad promoter. When present, double red lines indicate that genes are interrupted. For plasmid 4, the DNA sequence was non-continuous, probably due to the ligation of two fragments.

(C) Plasmids identified from the library were isolated and reintroduced into the $\Delta hsp90_{So}$ strain. Strains were streaked on LB plates containing 0.2% arabinose and the plates were incubated at 28°C and 35°C.

(D) The *tiiS* gene was cloned into the pBad33 vector (p). The resulting plasmid, *ptiiS*, was introduced into the WT and the $\Delta hsp90_{So}$ strains. Strains grown at 28°C were diluted to OD₆₀₀ = 1. 10-fold serial dilutions were spotted on LB plates containing 0.2% arabinose that were incubated for 24 hr at 28°C or 35°C as indicated. In (C) and (D), plates are representative of three experiments. See also Figure S2.

arabinose-inducible promoter to yield *ptiIS*. Overproduction of TiIS from the *ptiIS* plasmid greatly improved the growth of the $\Delta hsp90_{So}$ strain at 35°C (Figure 2D). As a control, we found that the growth of the $\Delta hsp90_{So}$ strain at 35°C was not improved in the absence of the arabinose inducer (Figure S2B). In addition, the overproduction of TiIS did not modify the growth of the WT and the $\Delta hsp90_{So}$ strains at 28°C (Figure 2D) and did not induce a heat-shock response at 28°C or 34°C (Figure S2C).

Altogether, we identified a protein, TiIS, that when overproduced bypasses the requirement of the Hsp90_{So} chaperone at high temperature, and we therefore propose that TiIS is a client of Hsp90_{So}. However, overproduction of TiIS did not entirely suppress the growth defect of the $\Delta hsp90_{So}$ strain at 35°C (Figures 2C and 2D). It suggests that either TiIS is not the only essential client affected at this temperature in the absence of Hsp90_{So}, or that TiIS always requires Hsp90_{So} to be fully functional.

TiIS Activity Is Reduced In Vivo in the Absence of Hsp90_{So} at High Temperature

According to the literature, TiIS is a tRNA^{Ile}-lysine synthetase (Soma et al., 2003; Suzuki and Miyauchi, 2010). Essential in *E. coli*, this enzyme specifically modifies the tRNA^{Met} that originally allows the translation of the AUG codon into methionine, in the tRNA^{Ile} that allows the translation of the AUA codon into isoleucine. For that, TiIS catalyzes the addition of a lysine on the cytidine 34 of the tRNA^{Met}, resulting in a lysidine (Ikeuchi et al., 2005). As expected, we obtained *S. oneidensis* *tiIS* deletion strains only when *tiIS* was expressed in *trans* from a plasmid, strongly suggesting that, as shown in *E. coli*, TiIS is also essential in *S. oneidensis*. If TiIS is a client of Hsp90_{So}, its activity should be lower in the absence of Hsp90_{So} than in its presence at high temperature. To follow the activity of TiIS in *E. coli*, Soma et al. (2003) added after the start codon of the *lacZ* reporter gene, a sequence containing four ATA codons, and they showed that the level of β -galactosidase activity became dependent on TiIS activity. We used the same approach in *S. oneidensis* and a plasmid with four ATA codons fused to the sequence of *lacZ*, p(AUA)*lacZ*, was introduced into the WT and the $\Delta hsp90_{So}$ strains (Figure 3A). The resulting strains were grown in liquid media at 28°C and 34°C, a sub-lethal temperature, and expression of the reporter gene was induced for 2 hr before β -galactosidase activity was measured. At both temperatures, we observed that in liquid media growth of the WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains was similar.

At 28°C, β -galactosidase activity was similar in the WT and in the $\Delta hsp90_{So}$ strains containing the control plasmid, indicating that the production of the β -galactosidase was not affected by the absence of Hsp90_{So} (Figure 3B). The WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains containing the p(AUA)*lacZ* plasmid had also a similar level of β -galactosidase activity although this level was slightly higher than that with the control plasmid for an unknown reason. When the strains were grown at high temperature (34°C), the WT strain containing either the *placZ* control plasmid or the p(AUA)*lacZ* plasmid had the same level of β -galactosidase activity (Figure 3B). In contrast, in the $\Delta hsp90_{So}$ background, a significant decrease in β -galactosidase activity was measured in the strain containing the p(AUA)*lacZ* plasmid compared to the one with the control plasmid (Figure 3B). These results indicate that in the absence of Hsp90_{So} and at high temperature, the activity of

TiIS is reduced, leading to a reduced translation of the β -galactosidase protein from the p(AUA)*lacZ* plasmid.

To confirm these results, we hypothesized that the overproduction of TiIS should increase the overall TiIS activity and consequently the level of β -galactosidase activity measured at high temperature in the $\Delta hsp90_{So}$ strain. To do that, the gene coding for TiIS was cloned in operon downstream of *lacZ* into p(AUA)*lacZ* plasmid, and a similar experiment as described above was performed. At high temperature, we observed that when TiIS was overproduced, there was an increase of β -galactosidase activity in the $\Delta hsp90_{So}$ strain containing the p(AUA)*lacZ-tiIS* plasmid (Figure 3C), and the level of β -galactosidase activity was similar to the one measured in the WT strain. At lower temperature, the overproduction of TiIS did not affect β -galactosidase activity. Therefore, the overproduction of TiIS rescues TiIS activity in the absence of Hsp90_{So} at high temperature.

Altogether, these experiments support the idea that in physiological conditions at high temperature, the activity of TiIS depends on Hsp90_{So}. Moreover, they strongly suggest that TiIS is a client of Hsp90_{So}.

The Amount of TiIS Is Reduced in the Absence of Hsp90_{So} at High Temperature

When Hsp90 clients are not correctly folded, they can be recognized and degraded by proteases (Sato et al., 2010; Yosef et al., 2011). We therefore decided to follow the amount of the TiIS protein in the presence or absence of Hsp90_{So} at high temperature. To do that, a sequence coding for a 6His tag was added at the 3' extremity of *tiIS* in the *placZ-tiIS* plasmid (Figure S3A), and the resulting plasmid was introduced into the WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains. Cells were then grown at 28°C and 34°C, and 0.02% or 0.2% arabinose was added to induce expression of the plasmid genes. After 2 hr, total protein extracts were loaded on a SDS-PAGE and TiIS was detected by western blot with a 6His antibody. When the strains were grown at 28°C, similar levels of TiIS were observed in the WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains, and the amount of TiIS increases with increasing arabinose concentration (Figure 3D). However, when the strains were grown at high temperature with 0.02% and 0.2% arabinose, we observed a strong decrease of TiIS amount in the absence of Hsp90_{So} compared to the WT strain (Figure 3D). As a control, we showed that the decrease in TiIS measured in the $\Delta hsp90_{So}$ strain grown at high temperature was not due to a decrease in gene expression from the *placZ-tiIS*_{6His} plasmid. Indeed, we found that β -galactosidase activity was similar in the two strains grown at high temperature at each arabinose concentration (Figure S3B). As expected, addition of the Hsp90 inhibitor radicicol in the WT strain also led to a significant decrease in the amount of TiIS at high temperature (Figure S3C).

Together, these results show that the amount of the TiIS protein is strongly reduced at high temperature in the absence of Hsp90_{So}. Moreover, they suggest that in the absence of Hsp90_{So}, TiIS is not correctly folded and is therefore degraded by proteases.

Hsp90_{So} Interacts with TiIS and Protects TiIS from Aggregation In Vitro

Our results indicate that TiIS is a client of Hsp90_{So}, implying that the two proteins interact. To demonstrate this, we first used an in vivo bacterial two-hybrid assay (Battesti and Bouveret, 2012).

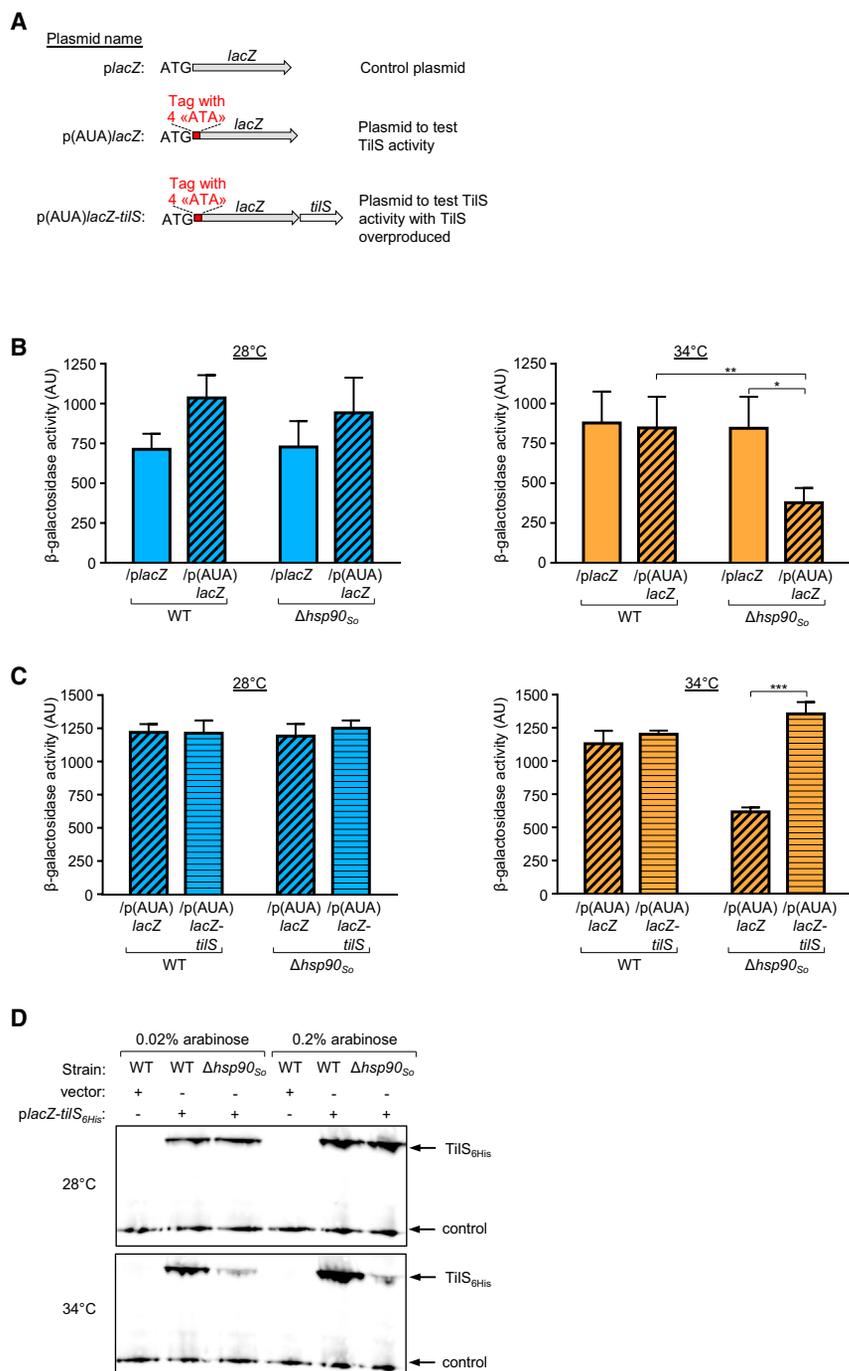


Figure 3. TiIS Activity and Amount Are Reduced at High Temperature in the Absence of Hsp90_{So}

(A) Schematic of the plasmids used to follow TiIS activity in vivo. A DNA sequence containing 4 “ATA” codons coding for Ile was inserted at the 5’ extremity (after the ATG start codon) of the *lacZ* reporter gene, leading to the *p(AUA)lacZ* plasmid. As a control, the *lacZ* reporter gene was cloned into the pBad33 vector (control plasmid). The *tiIS* gene was cloned in operon downstream of the *lacZ* coding sequence into *p(AUA)lacZ*, leading to *p(AUA)lacZ-tiIS*. In these plasmids, *lacZ* and *tiIS* are under the transcriptional control of the pBad promoter.

(B) Cultures of WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains containing *placZ* or *p(AUA)lacZ* were diluted at $OD_{600} = 0.1$ and were grown at 28°C or 34°C for 3 hr before addition of 0.2% arabinose. β -galactosidase activity was measured after 2 hr.

(C) Same as (B) using WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains containing *p(AUA)lacZ* or *p(AUA)lacZ-tiIS*. In (B) and (C), data from at least three replicates are shown as mean \pm SEM. Where indicated, t test analyses show that the differences measured are significant (* $p = 0.0112$; ** $p = 0.0107$; *** $p = 0.0026$).

(D) Cultures of WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains containing pBad33 (vector) or *placZ-tiIS_{6His}* were grown at 28°C or 34°C for 3 hr before addition of 0.02% or 0.2% arabinose. After 2 hr, protein extracts were analyzed by western blot using a 6His antibody. The band corresponding to TiIS is shown by the arrow. The band labeled “control” corresponds to a protein that is nonspecifically detected by the antibody and shows that same amount of protein was loaded in the different wells. These western blots are representative of three independent experiments.

See also Figure S3.

By measuring β -galactosidase activity, we followed the activity of the adenylate cyclase reporter protein that is split in the T18 and T25 domains fused to TiIS and Hsp90_{So}, respectively. When T18-TiIS and T25-Hsp90_{So} proteins were produced together, a high level of β -galactosidase activity was measured indicating that TiIS and Hsp90_{So} interact (Figure 4A). The interaction between TiIS and Hsp90_{So} is specific because background levels of β -galactosidase activity were observed when T18-TiIS and T25, or T18 and T25-Hsp90_{So} were produced

together. As expected, we also showed that Hsp90_{So} dimerizes (Figure 4A). A pull-down experiment confirmed that Hsp90_{So} co-purified with TiIS that contains a calmodulin binding peptide (CBP) tag (Figure 4B). Interestingly, the client binding defective mutant Hsp90_{So}W476R-L563A did not copurify with TiIS (Figure 4B), confirming that TiIS is recognized as a client by Hsp90_{So}. Finally, we showed that Hsp90_{So} protects TiIS from aggregation at high temperature. Indeed, using light scattering, we observed that purified TiIS aggregated when incubated at 42°C (Figure 4C). However, the aggregation of TiIS decreased when it was mixed with increasing concentrations of purified Hsp90_{So}. Nearly no aggregation of TiIS occurs with four times more Hsp90_{So} than TiIS. This experiment demonstrates that Hsp90_{So} protects TiIS against aggregation in vitro. As a control, we observed that BSA or the Hsp90_{So}W476R-L563A mutant did not prevent aggregation of TiIS (Figures 4C and S4A). Altogether, our results clearly show that TiIS is a client of Hsp90 in *S. oneidensis*.

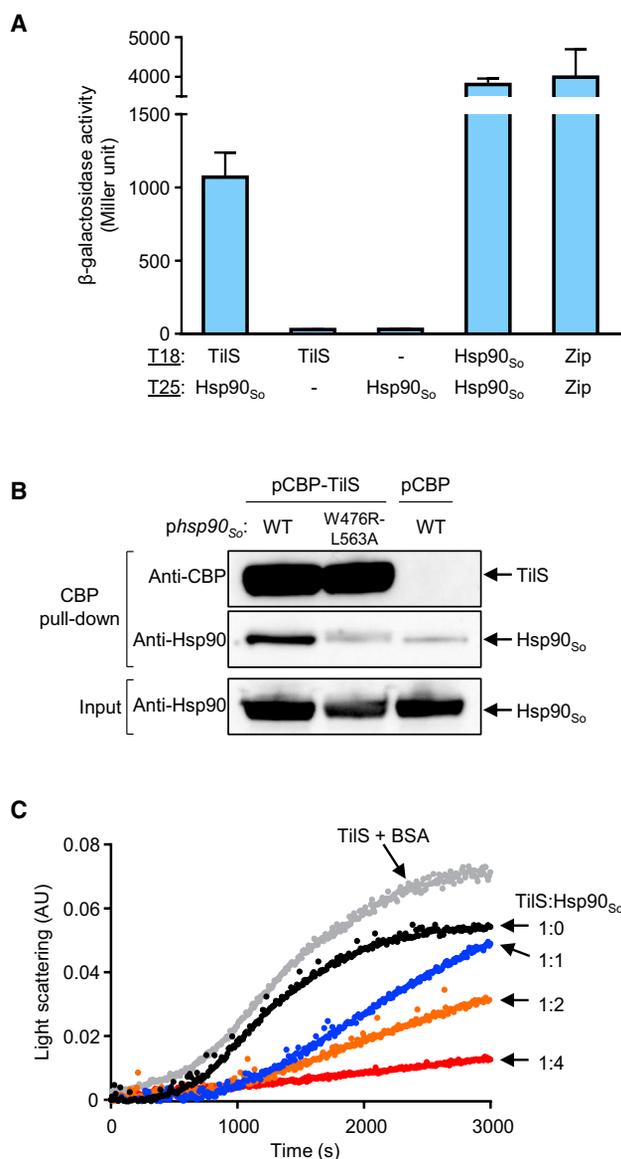


Figure 4. Hsp90_{So} Binds to TiIS and Protects It from Aggregation

(A) Two-hybrid method showing that Hsp90_{So} and TiIS interact. *E. coli* Bth101Δ*hsp90* strains transformed with T18-TiIS and T25-Hsp90_{So}, T18-TiIS and T25, T18 and T25-Hsp90_{So}, T18-Hsp90_{So} and T25-Hsp90_{So}, or T18-Zip and T25-Zip were grown at 28°C overnight and β-galactosidase activity was measured. Data from three replicates are shown as mean ± SEM.

(B) Pull-down assay. TiIS with a CBP tag was produced with or without Hsp90_{So} WT or mutant in the *E. coli* MG1655Δ*htpG* strain. CBP-TiIS was purified on CBP affinity resin, and after several washing steps, proteins were analyzed by western blot with anti-CBP and anti-Hsp90 antibodies (CBP pull-down panels). The same amount of Hsp90 WT or mutant was present in the protein extracts before purification (input panel). These western blots are representative of three independent experiments.

(C) Light scattering experiment showing that Hsp90_{So} prevents aggregation of TiIS. Purified TiIS (5.4 μM) with or without purified Hsp90_{So} (5 μM, 10 μM, 20 μM as indicated) were incubated at 42°C and OD₃₆₀ was measured with time. An increase in absorbance indicates that TiIS aggregates. As a control, Hsp90_{So} was replaced by BSA (20 μM). The graph shown is representative of three independent experiments.

See also Figure S4.

In conclusion, we found that the Hsp90 chaperone is essential for growth at high temperature in *S. oneidensis* proteobacteria. We used this phenotype to screen a plasmid library and identified a first client, TiIS, involved in tRNA modification in *S. oneidensis*. The strength of our genetic screen allowed the discovery of a client that had not been identified in a global study looking at Hsp90_{So} clients (García-Descalzo et al., 2011). Because TiIS is conserved in bacteria (Suzuki and Miyachi, 2010), we question whether TiIS from other bacteria also needs Hsp90 for folding in stress conditions. Future work will lead to the identification of other Hsp90_{So} clients, and the fact that Hsp90_{So} is essential will greatly facilitate the study of the molecular mechanism of action of this chaperone. In turn, because bacterial Hsp90 is also involved in virulence, its inhibition could represent a new strategy to combat infections.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Growth Conditions, Strains, and Plasmids

Strains were grown aerobically with shaking in rich lysogeny broth (LB) medium at the temperatures indicated in the figures. When necessary, chloramphenicol (25 μg/mL), kanamycin (50 μg/mL), ampicillin (50 μg/mL), or streptomycin (100 μg/mL) was added. The WT *S. oneidensis* strain used in this study is MR1-R (Bordi et al., 2003). Constructions of the *hsp90_{So}* deletion strain, plasmids, and the plasmid library are described in the Supplemental Experimental Procedures.

Protein Purification

To purify Hsp90_{So} WT or mutants, pET-Hsp90_{So}, pET*hsp90_{So}*E34A, or pET*hsp90_{So}*W476R-L563A was introduced into the BL21(DE3) strain by transformation. The resulting strains were grown in LB at 37°C. At OD₆₀₀ = 0.8, 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added. After 3 hr at 37°C, cells were collected by centrifugation, lysed by French Press and centrifuged at 13,000 rpm, 4°C, 15 min. After a second centrifugation step at 45,000 rpm, 4°C, 45 min, the supernatant was loaded onto a HiTrap FF resin (GE Healthcare), and purification was performed as described by the manufacturer. Limited proteolysis experiments with trypsin suggest that the W476R-L563A mutations do not modify the global folding of Hsp90_{So} (Figure S4B). The same protocol was used to produce and purify TiIS-6His from the pET-TiIS_{So} plasmid, except that cells were grown at 28°C, and 0.1 mM IPTG was added at OD₆₀₀ = 0.8 for 2 hr. Purified proteins were stored at -80°C in 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT, and 10% glycerol. BSA was purchased from ID Bio. Concentrations were measured by Bradford assays and are given for monomeric TiIS and BSA and dimeric Hsp90_{So}.

Reporter Assay to Follow TiIS Activity In Vivo

WT and Δ*hsp90_{So}* strains containing *placZ*, *p(AUA)lacZ*, or *p(AUA)lacZ-tiIS* plasmids were grown at 28°C overnight with chloramphenicol. Cells were then diluted to OD₆₀₀ = 0.1 in LB and were grown at 28°C or 34°C for 3 hr, before addition of 0.2% arabinose. After 2 hr at 28°C or 34°C, β-galactosidase activity was measured using a Tecan Spark 10M microplate reader.

Experiments to Assess TiIS Amount

The *placZ-tiIS*_{6His} plasmid was introduced by conjugation into the WT and Δ*hsp90_{So}* strains. The resulting strains as well as the WT strain containing an empty vector were grown at 28°C overnight with chloramphenicol. Cells were then diluted to OD₆₀₀ = 0.1, grown at 28°C or 34°C, and after 3 hr, 0.02% or 0.2% arabinose was added. Two hours later, the same amount of cells from the different cultures was heat-treated, loaded on SDS-PAGE, and transferred by western blot. TiIS was visualized with a 6His antibody (Thermo, MA1-80218). In parallel, β-galactosidase activity was measured on the same cultures using a Tecan Spark 10M microplate reader. When indicated, radicicol (100 μM) or DMSO was added during both the preculture and the culture.

Two-Hybrid Experiments

Bacterial two-hybrid experiments were performed as described (Battesti and Bouveret, 2012). In this method, the catalytic domain of the adenylate cyclase (encoded by the *cya* gene) is split in the T18 and T25 subdomains that are each fused to the proteins to be tested for interaction. If the two proteins interact, the catalytic domain of the adenylate cyclase is reconstituted, therefore leading to the production of cAMP and in turn to the transcription of the *lacZ* reporter gene. Two-hybrid plasmids were transformed in the Bth101Δ*htpG* strain (Genest et al., 2015). The resulting strains were incubated for 3 days at 28°C. After inoculation of the strains in LB with ampicillin, kanamycin, and 0.5 mM IPTG, β-galactosidase activity was measured on overnight cultures.

Statistical Analysis

Results are given as mean ± SEM and are calculated with at least three replicates. In Figure 3B (six replicates) and Figure 3C (three replicates), paired t test analysis using parametric test was performed using GraphPad Prism Software version 6.05 to show that the differences between the samples are significant (p value <0.05).

Pull-Down Experiments

These experiments were adapted from a previous study (Battesti et al., 2013). MG1655Δ*htpG* *E. coli* strain (Genest et al., 2013) containing plasmids pCBP-TiIS with *phsp90_{So}* WT or mutant and pCBP with *phsp90_{So}* WT were grown at 37°C. At OD₆₀₀ = 0.8, 0.05% arabinose was added. After 1 hr, cells were pelleted, resuspended in CBP buffer (10 mM Tris HCl pH = 8, 150 mM NaCl, 1 mM Mg acetate, 1 mM imidazole, 2 mM CaCl₂, 0.1% Triton, 70 μL βME), lysed with French Press, and centrifuged for 10 min at 8,000 rpm. The supernatant (1.4 mL) was incubated with Calmodulin binding peptide (CBP) affinity resin (Agilent) (50 μL) for 1 hr. The resin was then centrifuged 1 min at 2,000 rpm, washed four times with 1 mL of CBP buffer, resuspended in 40 μL of loading buffer, and heat-denatured at 95°C for 10 min. Proteins were loaded on SDS-PAGE and transferred by western blot. Samples of protein extracts before purification were also loaded on the gel as a control (input). Hsp90_{So} was visualized with an anti-Hsp90_{Ec} antibody (Genest et al., 2013), and TiIS was visualized with an anti-CBP antibody (Millipore 07-482).

Light Scattering Experiments

TiIS (20 μL, 5.4 μM final) was incubated at 42°C in 25 mM HEPES buffer, pH = 7.8, 200 μL final volume, and aggregation was followed spectrophotometrically at 360 nm using a Tecan Spark 10M microplate reader. When indicated, Hsp90_{So} WT or mutant (5 μM, 10 μM, or 20 μM) dialyzed in 25 mM HEPES buffer, pH = 7.8, or BSA (20 μM) dialyzed in the same buffer, was incubated with TiIS, and aggregation was monitored with time.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and four figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.082>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.A.H., V.M., and O.G. designed experiments, interpreted data, and wrote the paper. F.A.H. and O.G. performed experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Aurélie Battesti, Marianne Ilbert, Sue Wickner, Pierre Genevaux, Carsten Zeilinger, and members of the team for fruitful discussions. We also thank Chantal Iobbi-Nivol and Cécile Jourlin-Castelli for proof reading and Ahmed Zellat for technical assistance. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and Aix-Marseille Université (AMU). O.G. was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE11-0002-01). F.A.H. was supported by the Ecole Pratique des Hautes Etudes.

Received: December 21, 2016

Revised: March 13, 2017

Accepted: March 31, 2017

Published: April 25, 2017

REFERENCES

- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* 353, aac4354.
- Bardwell, J.C., and Craig, E.A. (1988). Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* 170, 2977–2983.
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* 58, 325–334.
- Battesti, A., Hoskins, J.R., Tong, S., Milanese, P., Mann, J.M., Kravats, A., Tsegaye, Y.M., Bougdour, A., Wickner, S., and Gottesman, S. (2013). Anti-adaptors provide multiple modes for regulation of the RssB adaptor protein. *Genes Dev.* 27, 2722–2735.
- Bordi, C., Iobbi-Nivol, C., Méjean, V., and Patte, J.-C. (2003). Effects of ISSo2 insertions in structural and regulatory genes of the trimethylamine oxide reductase of *Shewanella oneidensis*. *J. Bacteriol.* 185, 2042–2045.
- Buchner, J. (2010). Bacterial Hsp90—desperately seeking clients. *Mol. Microbiol.* 76, 540–544.
- Dang, W., Hu, Y.H., and Sun, L. (2011). HtpG is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*. *Vet. Microbiol.* 152, 394–400.
- Flynn, J.M., Mishra, P., and Bolon, D.N.A. (2015). Mechanistic asymmetry in Hsp90 dimers. *J. Mol. Biol.* 427, 2904–2911.
- García-Descalzo, L., Alcazar, A., Baquero, F., and Cid, C. (2011). Identification of in vivo HSP90-interacting proteins reveals modularity of HSP90 complexes is dependent on the environment in psychrophilic bacteria. *Cell Stress Chaperones* 16, 203–218.
- Garcie, C., Tronnet, S., Garénaux, A., McCarthy, A.J., Brachmann, A.O., Pényary, M., Houle, S., Nougayrède, J.-P., Piel, J., Taylor, P.W., et al. (2016). The bacterial stress-responsive Hsp90 chaperone (HtpG) is required for the production of the genotoxin colibactin and the siderophore yersiniabactin in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 214, 916–924.
- Genest, O., Hoskins, J.R., Camberg, J.L., Doyle, S.M., and Wickner, S. (2011). Heat shock protein 90 from *Escherichia coli* collaborates with the DnaK chaperone system in client protein remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8206–8211.
- Genest, O., Reidy, M., Street, T.O., Hoskins, J.R., Camberg, J.L., Agard, D.A., Masison, D.C., and Wickner, S. (2013). Uncovering a region of heat shock protein 90 important for client binding in *E. coli* and chaperone function in yeast. *Mol. Cell* 49, 464–473.
- Genest, O., Hoskins, J.R., Kravats, A.N., Doyle, S.M., and Wickner, S. (2015). Hsp70 and Hsp90 of *E. coli* directly interact for collaboration in protein remodeling. *J. Mol. Biol.* 427, 3877–3889.
- Graf, C., Stankiewicz, M., Kramer, G., and Mayer, M.P. (2009). Spatially and kinetically resolved changes in the conformational dynamics of the Hsp90 chaperone machine. *EMBO J.* 28, 602–613.
- Grudniak, A.M., Pawlak, K., Bartosik, K., and Wolska, K.I. (2013). Physiological consequences of mutations in the *htpG* heat shock gene of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 745–746, 1–5.
- Hau, H.H., and Gralnick, J.A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 237–258.
- Hossain, M.M., and Nakamoto, H. (2003). Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr. Microbiol.* 46, 70–76.
- Ikeuchi, Y., Soma, A., Ote, T., Kato, J., Sekine, Y., and Suzuki, T. (2005). Molecular mechanism of lysidine synthesis that determines tRNA identity and codon recognition. *Mol. Cell* 19, 235–246.
- Johnson, J.L. (2012). Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 607–613.
- Karagöz, G.E., and Rüdiger, S.G.D. (2015). Hsp90 interaction with clients. *Trends Biochem. Sci.* 40, 117–125.

- Krukenberg, K.A., Street, T.O., Lavery, L.A., and Agard, D.A. (2011). Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q. Rev. Biophys.* *44*, 229–255.
- Li, J., Soroka, J., and Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 624–635.
- Mayer, M.P., and Le Breton, L. (2015). Hsp90: breaking the symmetry. *Mol. Cell* *58*, 8–20.
- Motojima-Miyazaki, Y., Yoshida, M., and Motojima, F. (2010). Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *400*, 241–245.
- Nakamoto, H., Fujita, K., Ohtaki, A., Watanabe, S., Narumi, S., Maruyama, T., Suenaga, E., Misono, T.S., Kumar, P.K.R., Goloubinoff, P., and Yoshikawa, H. (2014). Physical interaction between bacterial heat shock protein (Hsp) 90 and Hsp70 chaperones mediates their cooperative action to refold denatured proteins. *J. Biol. Chem.* *289*, 6110–6119.
- Neckers, L. (2007). Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J. Biosci.* *32*, 517–530.
- Obermann, W.M., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P., and Hartl, F.U. (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* *143*, 901–910.
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.* *17*, 4829–4836.
- Press, M.O., Li, H., Creanza, N., Kramer, G., Queitsch, C., Sourjik, V., and Bornstein, E. (2013). Genome-scale co-evolutionary inference identifies functions and clients of bacterial Hsp90. *PLoS Genet.* *9*, e1003631.
- Röhl, A., Rohrberg, J., and Buchner, J. (2013). The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 253–262.
- Sato, T., Minagawa, S., Kojima, E., Okamoto, N., and Nakamoto, H. (2010). HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Mol. Microbiol.* *76*, 576–589.
- Shiau, A.K., Harris, S.F., Southworth, D.R., and Agard, D.A. (2006). Structural analysis of *E. coli* hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* *127*, 329–340.
- Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., and Suzuki, T. (2003). An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine tRNA. *Mol. Cell* *12*, 689–698.
- Stankiewicz, M., and Mayer, M.P. (2012). The universe of Hsp90. *Biomol. Concepts* *3*, 79–97.
- Street, T.O., Lavery, L.A., Verba, K.A., Lee, C.-T., Mayer, M.P., and Agard, D.A. (2012). Cross-monomer substrate contacts reposition the Hsp90 N-terminal domain and prime the chaperone activity. *J. Mol. Biol.* *415*, 3–15.
- Suzuki, T., and Miyauchi, K. (2010). Discovery and characterization of tRNA^{Leu} lysidine synthetase (TlIS). *FEBS Lett.* *584*, 272–277.
- Taipale, M., Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 515–528.
- Tanaka, N., and Nakamoto, H. (1999). HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS Lett.* *458*, 117–123.
- Thomas, J.G., and Baneyx, F. (2000). ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol. Microbiol.* *36*, 1360–1370.
- Vartholomaiou, E., Echeverría, P.C., and Picard, D. (2016). Unusual suspects in the twilight zone between the Hsp90 interactome and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* *129*, 1–30.
- Verbrugge, E., Van Parys, A., Leyman, B., Boyen, F., Haesebrouck, F., and Pasmans, F. (2015). HtpG contributes to *Salmonella Typhimurium* intestinal persistence in pigs. *Vet. Res. (Faisalabad)* *46*, 118.
- Vivien, E., Megessier, S., Pieretti, I., Cociancich, S., Frutos, R., Gabriel, D.W., Rott, P.C., and Royer, M. (2005). *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* *251*, 81–89.
- Yosef, I., Goren, M.G., Kiro, R., Edgar, R., and Qimron, U. (2011). High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 20136–20141.

Cell Reports, Volume 19

Supplemental Information

Hsp90 Is Essential under Heat Stress

in the Bacterium *Shewanella oneidensis*

Flora Ambre Honoré, Vincent Méjean, and Olivier Genest

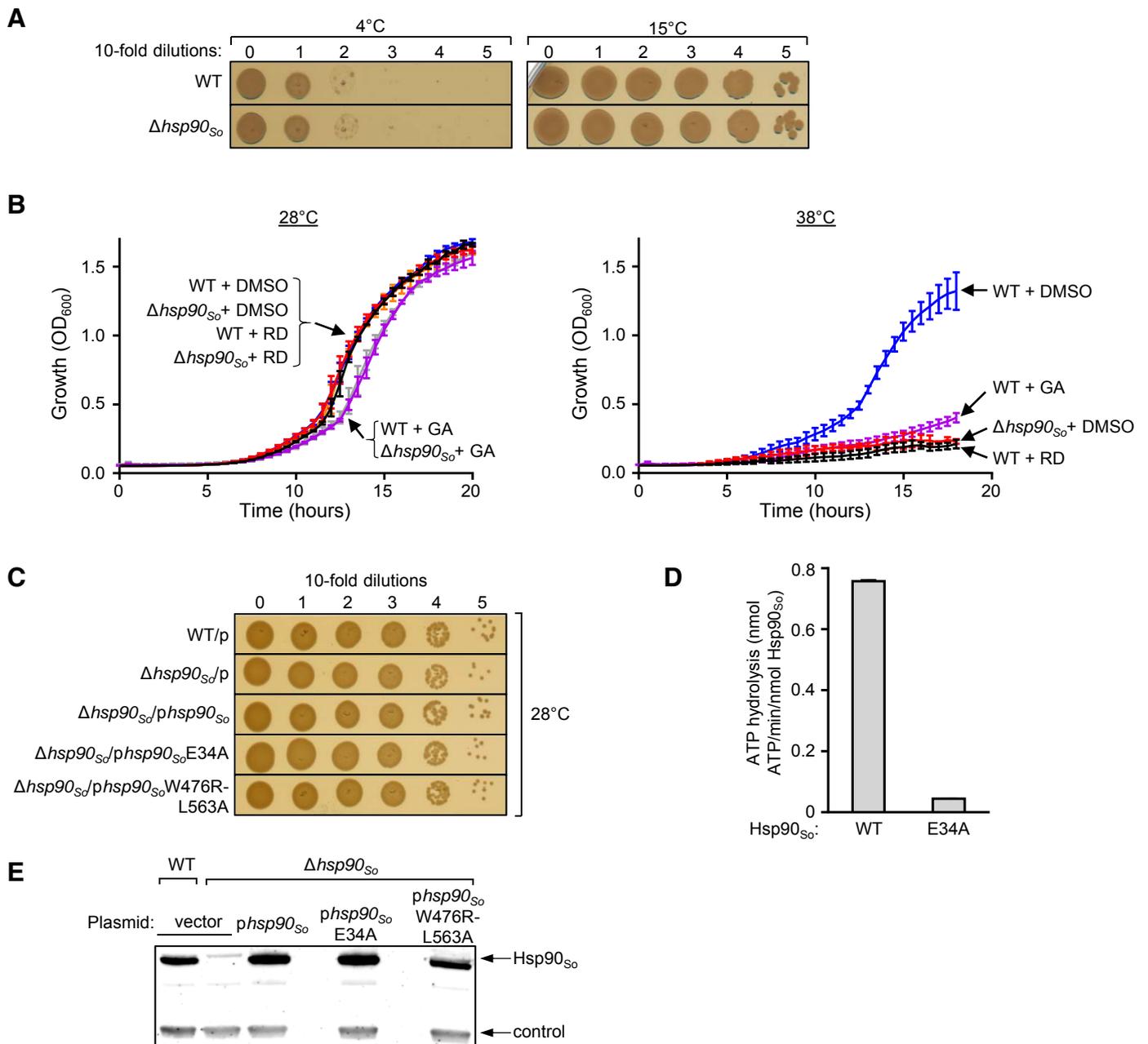


Figure S1. Characterization of the phenotype of the $\Delta hsp90_{So}$ strain. Related to Figure 1. (A) WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains grown at 28°C were diluted to $OD_{600}=1$. 10-fold serial dilutions were spotted on LB plates that were incubated for 7 days at 15°C or 20 days at 4°C as indicated. (B) Growth of WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains was followed at 28°C and 38°C. Where indicated, 30 μ M geldanamycin (GA), 100 μ M radicicol (RD), or DMSO vehicle was added. Data from at least three replicates are shown as mean \pm SEM. (C) WT strain containing the pBad33 vector (WT/p), and $\Delta hsp90_{So}$ strain containing either the pBad33 vector or the $phsp90_{So}$ wild type or mutant plasmids grown at 28°C with chloramphenicol were diluted to $OD_{600}=1$. 10-fold serial dilutions were spotted on LB plates containing 0.02% arabinose that were incubated for 24h at 28°C. (D) The Hsp90_{So}E34A mutant is strongly defective for ATP hydrolysis. ATPase activity of purified Hsp90_{So} WT or E34A mutant was measured. Data from three replicates are shown as mean \pm SEM. (E) Western blot showing the amount of Hsp90_{So} WT and mutant. WT strain containing the pBad33 vector (WT/p), and $\Delta hsp90_{So}$ strain containing either the pBad33 vector or the $phsp90_{So}$ wild type or mutant plasmids were grown overnight at 28°C in LB containing 0.02% arabinose. Total cell lysates were loaded on SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and revealed with an anti-Hsp90_{Ec} antibody. The band labeled “control” corresponds to a protein that is nonspecifically detected by the antibody and shows that same amount of protein was loaded in the different wells.

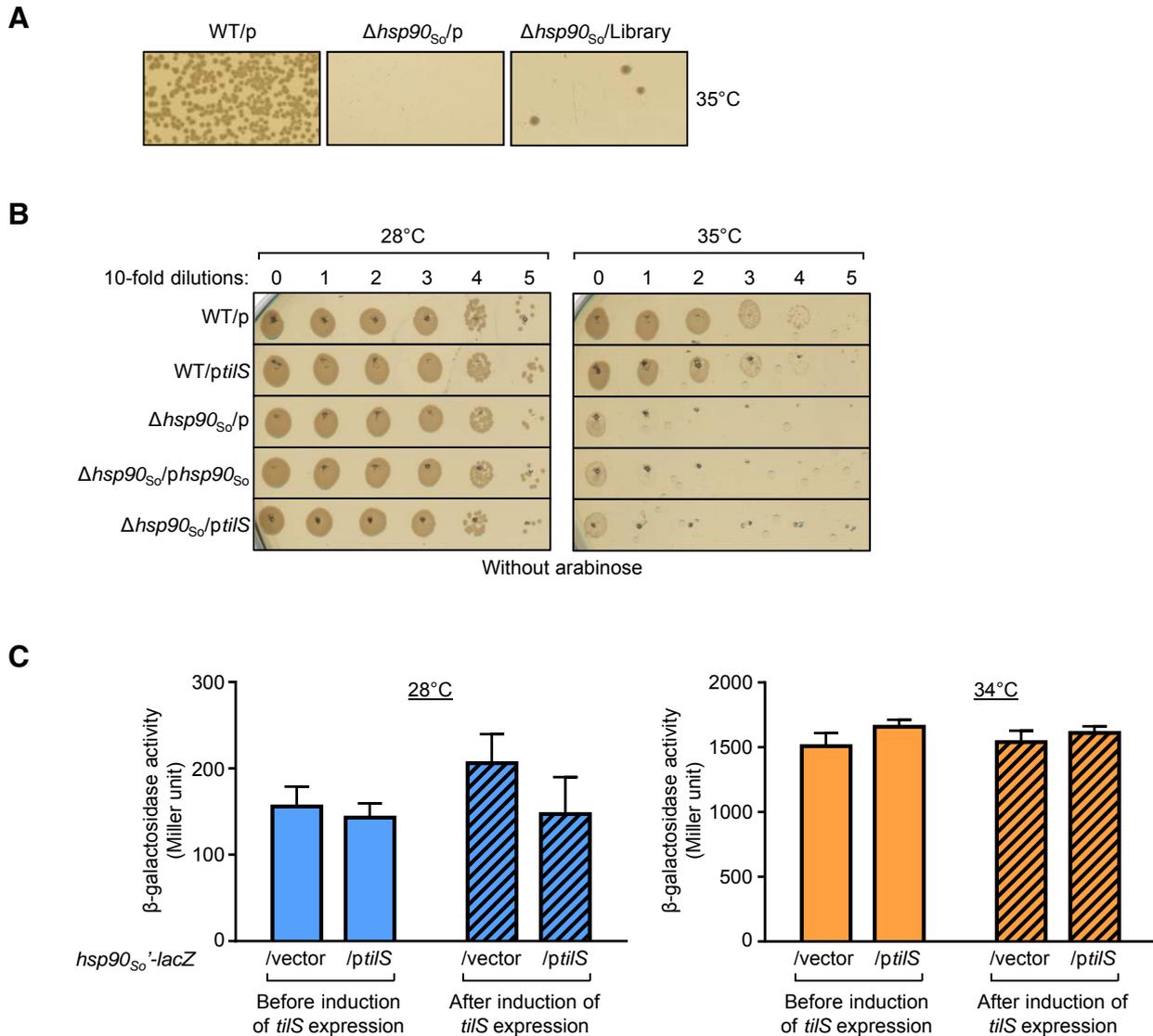


Figure S2. Characterization of TilS effects. Related to Figure 2. (A) WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains containing the pBad33 vector were diluted and spread on plates to have about 200 isolated colonies per plate. Plates were incubated at 35°C. Note that in this condition, no colony grew in the $\Delta hsp90_{So}/p$ strain. To test the library ($\Delta hsp90_{So}/Library$), about $2 \cdot 10^7$ cells were spread on plate, and as observed on the figure, only few colonies grew. (B) The *tilS* gene cloned into the pBad33 vector, *ptilS*, was introduced into the WT and in the $\Delta hsp90_{So}$ strains. Resulting strains grown at 28°C were diluted to $OD_{600}=1$. Then, 10-fold serial dilutions were spotted on LB plates without arabinose that were incubated for 24h at 28°C or 35°C as indicated. (C) Overproduction of TilS does not induce a heat-shock response. The *hsp90_{So}'-lacZ* strain contains the *lacZ* coding sequence instead of the entire *hsp90_{So}* coding sequence and was used as a reporter of the heat-shock response. The *ptilS* plasmid or the pBad33 vector was introduced into this strain. The resulting strains were grown at 28°C or 34°C and expression of *tilS* was induced by adding 0.2% arabinose. β-galactosidase activity was measured after 2 hours of induction. Data from three replicates are shown as mean +/- SEM.

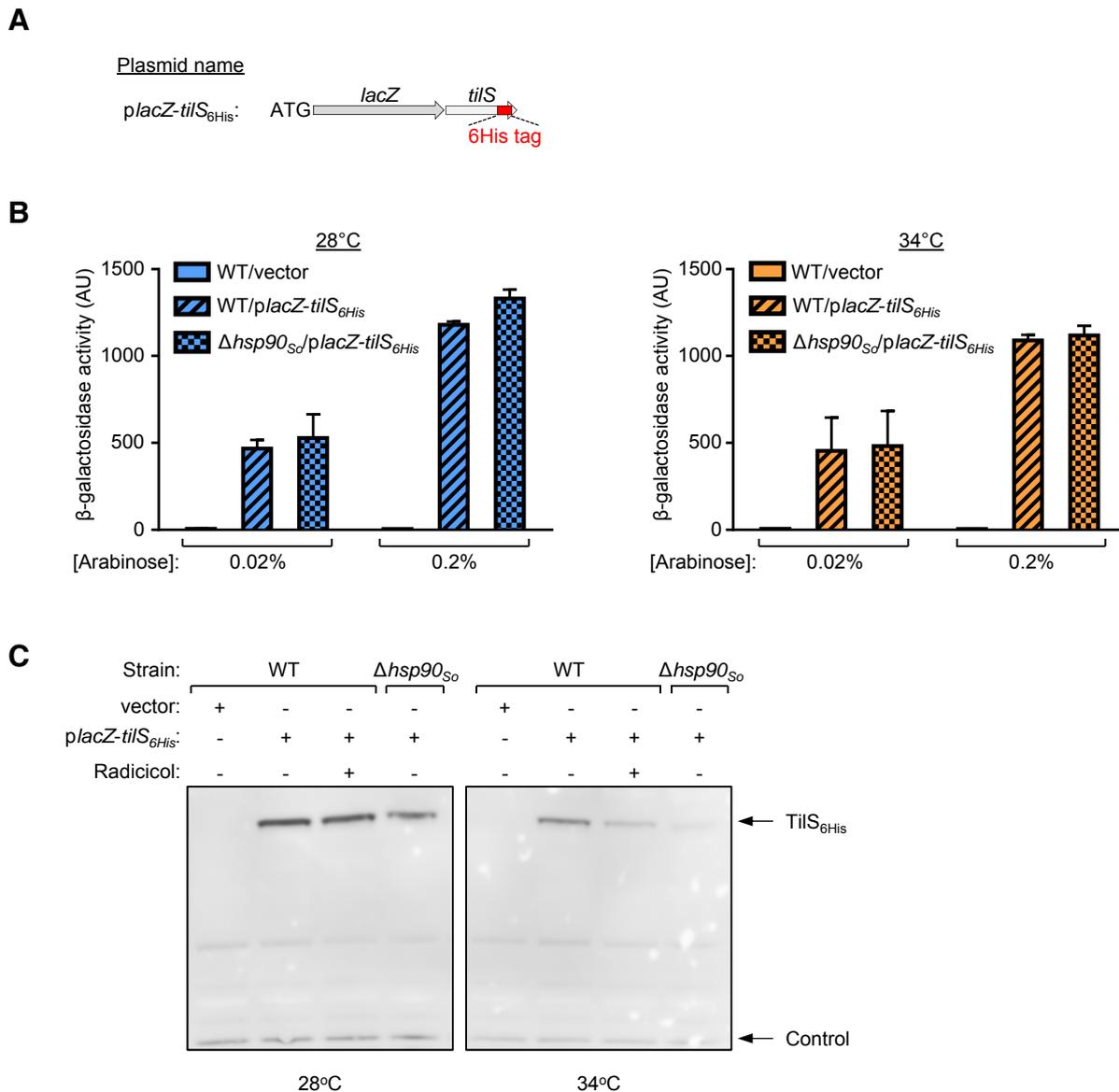


Figure S3. TilS degradation in the absence of Hsp90_{So} or with radicicol. Related to Figure 3. (A) Schematic of the *placZ-tilS_{6His}* plasmid used to follow the TilS protein in vivo. (B) Cultures of WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains containing pBad33 (vector) or *placZ-tilS_{6His}* were diluted at OD₆₀₀=0.1 and were grown at 28°C or 34°C for 3 hours before addition of 0.02% or 0.2% arabinose. β-galactosidase activity was measured after 2 hours of induction. Data from three replicates are shown as mean +/- SEM. (C) Cultures of WT and $\Delta hsp90_{So}$ strains containing pBad33 (vector) or *placZ-tilS_{6His}* were grown at 28°C or 34°C for 3 hours with 100 μM radicicol or DMSO vehicle before addition of 0.2% arabinose. After 2 hours, protein extracts were analyzed by Western blot using a 6His antibody. The band corresponding to TilS is shown by the arrow. The band labeled “control” corresponds to a protein that is nonspecifically detected by the antibody and shows that same amount of protein was loaded in the different wells.

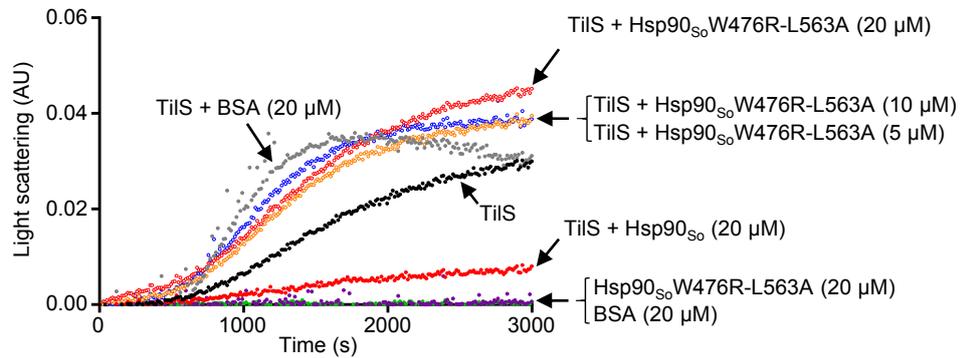
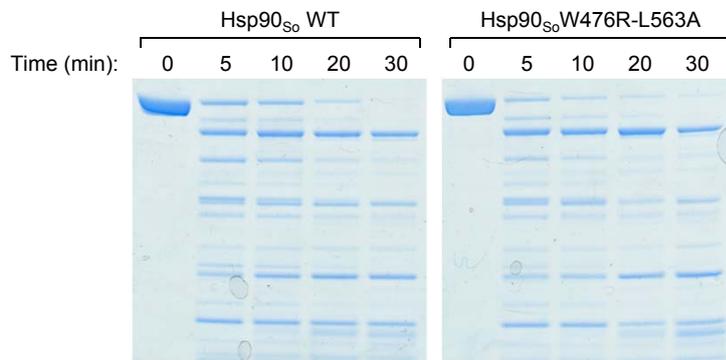
A**B**

Figure S4. Hsp90_{So}W476R-L563A does not suppress TiIS aggregation at high temperature. Related to Figure 4. (A) Light scattering experiment. Purified TiIS (5.4 μ M) with or without purified Hsp90_{So} WT (20 μ M) or Hsp90_{So}W476R-L563A (5 μ M; 10 μ M; 20 μ M) were incubated at 42°C and OD₃₆₀ was measured with time. An increase in absorbance indicates that TiIS aggregates. As a control, Hsp90_{So} was replaced by BSA (20 μ M). The graph shown is representative of three independent experiments. Note that BSA (20 μ M) alone or Hsp90_{So}W476R-L563A (20 μ M) alone does not aggregate. (B) Limited proteolysis profiles of purified Hsp90_{So} WT or Hsp90_{So}W476R-L563A digested with trypsin for various times at 37°C. At the indicated times, 10 μ L was removed and analyzed by SDS-PAGE. The profiles are similar indicating that the mutant is correctly folded.

Supplemental Experimental Procedures

Strains. The $\Delta hsp90_{so}$ strain was constructed by homologous recombination as described before (Baraquet et al., 2009). Briefly, upstream and downstream 500 bp flanking regions of the *hsp90_{so}* gene (SO_2016) were cloned into the suicide pKNG101 vector at the restriction sites BamHI and SpeI, that was transformed into the *E. coli* strain CC118 λ pir (Herrero et al., 1990). The resulting plasmid was introduced into MR1-R by conjugation. After integration, it was removed by adding 6% sucrose. Deletion of the *hsp90_{so}* gene was confirmed by sequencing. To construct the *tilS* (SO_1645) deletion strain, the same procedure was performed except that the pKNG101 plasmid containing the *tilS* flanking regions was introduced by conjugation into *S. oneidensis* strains containing either pBad33 or *ptilS* (see below). Chloramphenicol and 0.2% arabinose were added. By using PCR, we found that clones with a *tilS* deletion were obtained only in strains containing the *ptilS* plasmid.

The *hsp90_{so}'-lacZ* strain is deleted of the *hsp90_{so}* coding sequence and contains the *lacZ* coding sequence instead of the *hsp90_{so}* coding sequence. We used it as a reporter of the heat-shock response. To construct this strain, the same strategy as for the deletion of *hsp90_{so}* was used except that the XbaI and XmaI restriction sites were added between the two 500 bp fragments cloned into pKNG101 (see above). Then, the *E. coli* MG1655 *lacZ* sequence (from codon 9) was amplified and cloned at the XbaI and XmaI restriction sites. The resulting plasmid was introduced into MR1-R by conjugation. After integration, it was removed by adding 6% sucrose. Insertion of *lacZ* in place of *hsp90_{so}* was confirmed by sequencing. Note that wild-type *S. oneidensis* does not have a *lacZ* homolog gene.

Plasmids. To construct the *phsp90_{so}* plasmid, the *hsp90_{so}* gene (SO_2016) with its Shine Dalgarno sequence was PCR-amplified with forward and reverse primers containing the XmaI and XbaI restriction sites, respectively. After digestion with XmaI and XbaI, the DNA fragment was inserted into the pBad33 vector digested with the same restriction enzymes. Same strategy was used to clone the *tilS* gene (SO_1645) with its Shine Dalgarno sequence into pBad33, leading to *ptilS*. Plasmids *phsp90_{so}E34A* and *phsp90_{so}W476R-L563A* were constructed using the QuickChange kit (Agilent) as indicated by the manufacturer and *phsp90_{so}* as template.

To construct the *placZ* plasmid, the *lacZ* coding sequence (from codon 9) was amplified by PCR from *E. coli* MG1655 strain, digested by XmaI and XbaI restriction enzymes and cloned into the pBad33 vector digested with the same enzymes. The p(AUA)*lacZ* plasmid contains the additional DNA sequence gat gaa ata ata aaa ctt ata ata at the 5' extremity of *lacZ*, after the start codon (atg), coding for the DEIKLII peptide where isoleucine amino acids (I) were encoded by the rare AUA codon (Soma et al., 2003). This plasmid was constructed as described for *placZ* except that the forward primer contained the DNA sequence coding for the DEIKLII peptide.

To construct p(AUA)*lacZ-tilS*, the *tilS* gene with its Shine-Dalgarno sequence was cloned downstream of the *lacZ* gene into p(AUA)*lacZ* plasmid at the restriction sites XbaI and SalI. In this construction, transcription of *tilS* is therefore under the control of the pBad promoter.

To construct *placZ-tilS*_{6His}, the *tilS* gene with its Shine-Dalgarno sequence was amplified by PCR. The reverse primer contained a sequence coding for a 6His tag. This DNA fragment was digested by XbaI and SalI restriction enzymes and cloned at the same restriction sites into *placZ*. Note that in this construction, transcription of *tilS* is under the control of the pBad promoter. These plasmids were introduced by conjugation into the WT and $\Delta hsp90_{so}$ strains.

Plasmids allowing Hsp90_{so} (pETH*hsp90_{so}*) and TilS (pET*tilS*) production were constructed as follow. The coding sequences of *hsp90_{so}* and *tilS* were PCR amplified with forward and reverse primers containing the NdeI and SacI restriction sites, respectively. Note that a sequence coding for a 6His tag was added on the forward primer for *hsp90_{so}* and on the reverse primer for *tilS*. The DNA fragments were digested by NdeI and SacI and cloned at the same restriction sites into pET24b. Plasmids pETH*hsp90_{so}E34A* and pETH*hsp90_{so}W476R-L563A* were constructed using the QuickChange kit (Agilent) as indicated by the manufacturer and pETH*hsp90_{so}* as template. For two-hybrid experiments, the *hsp90_{so}* coding sequence was inserted at the PstI and XbaI restriction sites into pUT18Clinker and pKT25linker (Battesti and Bouveret, 2012) leading to T18-Hsp90_{so} and T25-Hsp90_{so}, respectively. The *tilS* coding sequence was inserted at the EcoRI and XhoI restriction sites into pUT18Clinker and pKT25linker leading to T18-TilS and T25-TilS, respectively. In our experiments, the empty vectors pUT18Clinker and pKT25linker are called T18 and T25, respectively. T18-Zip and T25-Zip are plasmids coding for a leucine zipper sequence and are used as a positive control (Battesti and Bouveret, 2012). All plasmid constructions were checked by DNA sequencing.

The pCBP-TilS plasmid allows the production of TilS with a calmodulin binding peptide (CBP) tag at the N-terminal extremity. It was constructed by digesting T25-TilS with the XbaI and XhoI restriction enzymes. The *tilS* gene was then cloned into pBAD24-CBP-linker digested with the same enzymes (Battesti and Bouveret, 2008).

Library construction and colony selection. The chromosome of *S. oneidensis* was partially digested with the Sau3AI restriction enzyme. After migration on an agarose gel, fragments between 5 and 8 kb were purified and ligated at the BamHI restriction site of the pBad33 vector already digested by BamHI and dephosphorylated by treatment with Antarctic Phosphatase (NEB). Note that pBad33 vector initially contained 2 BamHI restriction sites. Therefore, before cloning of the library, the BamHI site GGATCC located upstream of the multiple cloning site was mutated in GGTTC by QuickChange kit (Agilent), resulting in a pBad33 vector with a single BamHI restriction site. After ligation of the chromosomal fragments into pBad33, the resulting plasmids were transformed into *E. coli* NEB5 α competent cells (NEB). About 2500 isolated colonies were recovered. The plasmid library was then transferred by conjugation into the $\Delta hsp90_{so}$ *S. oneidensis* strain, the resulting cells were collected and frozen in LB containing 20% glycerol. We calculated that the library covered about 90% of the genome. To use the library, the $\Delta hsp90_{so}$ strain with the plasmid library was diluted to OD₆₀₀=1 in LB with chloramphenicol, incubated with shaking at 28°C for 2 hours, and 2.10⁷ cells were spread on plates containing chloramphenicol and 0.2% arabinose. The plates were incubated at 35°C. Colonies that grew at this temperature were selected, the plasmids were isolated and partially sequenced with primers upstream and downstream of the multiple cloning site of pBad33.

Bacterial growth on plates. WT and $\Delta hsp90_{so}$ strains were grown overnight in LB medium at 28°C. They were subsequently diluted to OD₆₀₀=0.1 in fresh LB medium and were incubated at 28°C until late exponential phase. Cells were then diluted to OD₆₀₀=1 and 2 μ L drops of 10-fold serial dilution were spotted on LB-agar plates. The plates were incubated at the temperatures indicated in the figures.

Same procedure was performed with the WT and $\Delta hsp90_{so}$ strains containing a plasmid except that chloramphenicol was added during the overnight preculture and the culture. The plates contained 0.02% or 0.2% arabinose as indicated in the figure legends.

Bacterial growth in liquid media. WT and $\Delta hsp90_{so}$ strains were grown overnight in LB medium at 28°C. They were subsequently diluted to OD₆₀₀=0.0005, incubated with shaking at 28°C or 38°C in a Tecan Spark 10M microplate reader, and OD₆₀₀ was measured with time. Where indicated, 30 μ M geldanamycin (GA), 100 μ M radicicol (RD), or DMSO vehicle was added. Geldanamycin and radicicol were purchased from Sigma.

Control of the amount of the Hsp90_{so} mutants. To check that the same amount of Hsp90_{so} WT and mutants were produced, WT and $\Delta hsp90_{so}$ strains containing pBad33, *phsp90_{so}*, *phsp90_{so}E34A*, or *phsp90_{so}W476R-L563A* were grown overnight at 28°C in LB, chloramphenicol and 0.02% arabinose. The same amount of cells from the different cultures was heat-treated (95°C, 10 min), loaded on SDS-PAGE and transferred by Western blot. Hsp90_{so} was visualized with an anti-Hsp90_{Ec} antibody (Genest et al., 2013).

ATPase activity. These experiments were performed as described previously (Genest et al., 2013).

Heat-shock response measurement. The *ptilS* plasmid as well as the pBad33 vector were introduced into the *hsp90_{so}'-lacZ* strain by conjugation. The resulting strains were grown overnight at 28°C with chloramphenicol, diluted to OD₆₀₀=0.1, and incubated at 28°C or 34°C. At OD₆₀₀=0.6, 0.2% arabinose was added to induce *tilS* expression, and β -galactosidase activity was measured two hours later.

Limited proteolysis experiments. Hsp90_{so} WT (15 μ g) or Hsp90_{so}W476R-L563A (15 μ g) was mixed (50 μ L final volume) with trypsin (10 ng) in 25 mM Hepes pH=7.5, 50 mM KCl, and incubated at 37°C. At the indicated times, 10 μ L was removed, mixed with 5 μ L of loading buffer, denatured for 5 min at 95°C and analyzed by SDS-PAGE. Trypsin was purchased from Sigma.

Supplemental References

Baraquet, C., Théraulaz, L., Iobbi-Nivol, C., Méjean, V., and Jourlin-Castelli, C. (2009). Unexpected chemoreceptors mediate energy taxis towards electron acceptors in *Shewanella oneidensis*. *Mol. Microbiol.* *73*, 278–290.

Battesti, A., and Bouveret, E. (2008). Improvement of bacterial two-hybrid vectors for detection of fusion proteins and transfer to pBAD-tandem affinity purification, calmodulin binding peptide, or 6-histidine tag vectors. *Proteomics* *8*, 4768–4771.

Battesti, A., and Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* *58*, 325–334.

Genest, O., Reidy, M., Street, T.O., Hoskins, J.R., Camberg, J.L., Agard, D.A., Masison, D.C., and Wickner, S. (2013). Uncovering a region of heat shock protein 90 important for client binding in *E. coli* and chaperone function in yeast. *Mol. Cell* *49*, 464–473.

Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* *172*, 6557–6567.

Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., and Suzuki, T. (2003). An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine tRNA. *Mol. Cell* *12*, 689–698.

Annexe 5: Commentaire de l'article 1

Hsp90 is the hot guy for *Shewanella oneidensis*

Nature Reviews Microbiology 15, 321 (2017).

Hsp90 is the hot guy for *Shewanella oneidensis*

Chaperones are essential for the maintenance of cellular protein homeostasis, and although heat shock protein 90 (Hsp90) is one of the best-characterized chaperones in eukaryotes, its role in bacteria has remained elusive. Honoré *et al.* report that a *Shewanella oneidensis* strain that lacks *hsp90* exhibits a growth defect at high temperatures compared with the wild-type strain. By screening a plasmid library, they identified its first client as TiIS, a protein that is involved in tRNA maturation. Moreover, *in vivo* bacterial two-hybrid assay and pull-down experiments revealed that the two proteins directly interact. The aggregation of TiIS at high temperatures was markedly decreased in presence of Hsp90, further corroborating the crucial role of the chaperone in folding. As Hsp90 is highly conserved in bacteria, the authors speculate that it might have a similar role in other bacteria. Further work is required to address this question and identify other possible clients.

By Irene Vacca, Nature Reviews Microbiology, Published online 12 May 2017.

Annexe 6: Actualité scientifique

Un nouveau modèle bactérien pour étudier le chaperon moléculaire essentiel Hsp90

Parution sur le site internet de l'INSB

(www.cnrs.fr/insb/recherche/parutions/articles2017/o-genest.html) le 12 mai 2017.

Un nouveau modèle bactérien pour étudier le chaperon moléculaire essentiel Hsp90

Les chaperons moléculaires aident au bon repliement des protéines. Indispensable chez les eucaryotes, le chaperon Hsp90 était décrit comme non essentiel chez les bactéries. Des chercheurs du Laboratoire de bioénergétique et ingénierie des protéines montrent que Hsp90 est indispensable en condition de stress chez la bactérie aquatique modèle *Shewanella oneidensis*. Ceci a permis d'identifier une nouvelle protéine indispensable cible d'Hsp90 et ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre le rôle et le mécanisme d'action de ce chaperon. Cette étude a été publiée le 25 avril 2017 dans la revue *Cell Reports*.

Dans toutes les cellules vivantes, le repliement correct des protéines (aussi appelé protéostasie) est primordial pour le fonctionnement cellulaire. Cependant, les protéines sont soumises en permanence à de nombreux stress (température, stress oxydants, etc.) qui altèrent leur bon repliement. Un dérèglement de la protéostasie conduit à de nombreuses maladies (maladies neurodégénératives, cancers, etc.) et même à la mort cellulaire. Pour pallier ces problèmes, les chaperons moléculaires constituent une classe de protéines très conservées des bactéries à l'homme. Ils aident au maintien de la protéostasie et assistent les autres protéines depuis leur synthèse jusqu'à leur dégradation.

Le chaperon Hsp90 (pour « Heat Shock Protein 90kDa ») est présent chez la plupart des organismes. Chez les eucaryotes, Hsp90 est essentiel et permet le repliement et l'activation de plus de 300 protéines cibles appelées clientes. Cependant, Hsp90 aide aussi au repliement d'oncoprotéines dans les cellules cancéreuses et il est donc logiquement devenu une cible de choix dans le traitement de cancers. Cependant, malgré un grand nombre d'études, le fonctionnement moléculaire précis d'Hsp90 n'est toujours pas connu et de nouveaux angles d'approche sont donc nécessaires pour décortiquer son mécanisme d'action.

Chez les bactéries, le rôle d'Hsp90 est très peu documenté. Jusqu'à présent, Hsp90 était décrit comme non essentiel chez les protéobactéries et très peu de cibles d'Hsp90 bactériens ont été identifiées. Les chercheurs ont étudié *Shewanella oneidensis*, une bactérie aquatique qui possède une très grande capacité d'adaptation. Ils ont découvert que la survie de *S. oneidensis* lors d'un stress thermique dépend de la présence d'Hsp90. Ainsi, comme chez les eucaryotes, Hsp90 est essentiel chez cette bactérie. Ce résultat tout à fait novateur leur a permis grâce à une approche génétique suivie d'analyses biochimiques, d'identifier une nouvelle protéine cliente (TilS). Cette protéine indispensable est impliquée dans la maturation d'ARNs de transfert, des molécules permettant la synthèse des protéines.

Ces découvertes font sauter un verrou majeur dans les recherches sur les chaperons Hsp90 d'origine bactérienne et ouvrent un vaste champ d'investigations pour comprendre le fonctionnement d'Hsp90 en utilisant ce nouveau modèle bactérien. Ainsi, de nouvelles régions fonctionnelles d'Hsp90 pourront être facilement caractérisées et de nouveaux clients pourront être identifiés. Cette bactérie pourrait aussi être utilisée pour tester à grande échelle des

collections de molécules inhibitrices d'Hsp90 potentiellement actives dans la lutte contre les cancers. Enfin, à la lumière de cette étude, Hsp90 pourrait aussi se révéler essentiel chez des bactéries pathogènes et son inhibition conduire à de nouvelles classes d'antibiotiques.

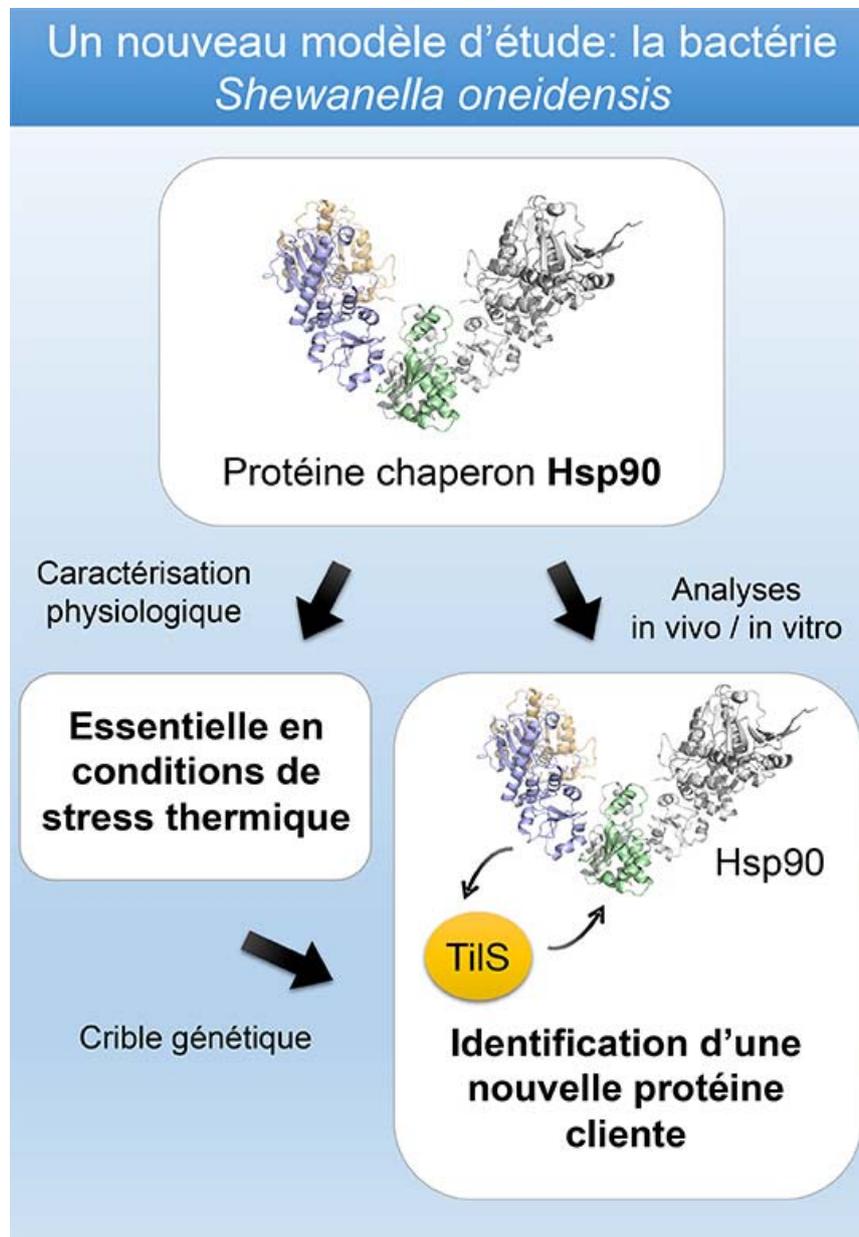


Figure : La protéine Hsp90 est essentielle lors d'un stress thermique chez *S. oneidensis*. A partir d'une banque plasmidique, différentes protéines cibles ou "clientes" potentielles d'Hsp90 ont été isolées et analysées. Ceci a permis de montrer que TiIS, une protéine de modification d'un ARNt indispensable pour la synthèse protéique, nécessite Hsp90 pour son repliement correct. © Flora Ambre Honoré, Vincent Méjean, Olivier Genest

Annexe 7: Article 2

Efficient respiration on TMAO requires TorD and TorE auxiliary proteins in *Shewanella oneidensis*

Olivier N. Lemaire, Flora A. Honoré, Cécile Jourlin-Castelli, Vincent Méjean,
Michel Fons, Chantal Iobbi-Nivol.

Research in Microbiology 167, 630-637 (2016).

Original article

Efficient respiration on TMAO requires TorD and TorE auxiliary proteins in *Shewanella oneidensis*

Olivier N. Lemaire, Flora A. Honoré, Cécile Jourlin-Castelli, Vincent Méjean, Michel Fons, Chantal Iobbi-Nivol*

Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, 13402 Marseille, France

Received 15 March 2016; accepted 18 May 2016
Available online 8 June 2016

Abstract

Respiration on trimethylamine oxide (TMAO) allows bacterial survival under anoxia. In *Shewanella oneidensis*, Tor is the system involved in TMAO respiration and it is encoded by the *torECAD* operon. The *torA* and *torC* genes encode TorA terminal reductase and the TorC *c*-type cytochrome, respectively. Sequence analysis suggests that TorD is the putative specific chaperone of TorA, whereas TorE is of unknown function. The purpose of this study was to understand whether TorD and TorE are two accessory proteins that affect the efficiency of the Tor system by chaperoning TorA terminal reductase. Moreover, by deleting each gene, we established that the absence of TorD drastically affects the stability of TorA, while the absence of TorE does not affect TorA stability or activity. Since TMAO reduction was affected in the Δ *torE* mutant, TorE could be an additional component of the TorC-TorA electron transfer chain during bacterial respiration. Finally, a fitness experiment indicated that the presence of TorE, as expected, confers a selective advantage in competitive environments.

© 2016 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Respiratory chain; Molybdoenzyme maturation; TMAO respiration; Auxiliary proteins

1. Introduction

Trimethylamine oxide (TMAO) is an organic compound that is currently arousing renewed interest because it possesses differing effects, positive in bacteria and fish and deleterious in humans [1]. In omnivore animals, TMAO comes from the diet either directly or after transformation of phosphatidylcholine, L-carnitine and betaine by the gut microbiota and liver enzymes [2]. Several medical studies propose a correlation between the plasma concentrations of TMAO and cardiovascular risk, while a more recent study indicates that the measure of

TMAO concentration in plasma is a marker for impaired kidney function rather than coronary heart disease [3–5]. TMAO is widespread in marine environments and is found at high concentrations in fish tissue. In this case, TMAO counteracts the denaturing effect of urea and hydrostatic pressure on proteins by its capacity to act as a powerful chemical chaperone and osmolyte [6,7]. For bacteria, TMAO also serves as an electron acceptor allowing anaerobic respiration [8–10].

Bacterial TMAO respiration has been extensively studied in *Escherichia coli*. In this organism, the TMAO respiratory (Tor) system comprises a periplasmic reductase (TorA) that is a molybdoenzyme containing the bis-molybdopterine guanine dinucleotide (bis-MGD) form of the cofactor and a *c*-type cytochrome (TorC) containing five hemes [8]. TorC is anchored to the inner membrane and faces the periplasm. Its soluble part is organized in two specific domains: a tetrahemic domain that receives the electrons from the quinol pool and

* Corresponding author.

E-mail addresses: olemaire@imm.cnrs.fr (O.N. Lemaire), fhonore@imm.cnrs.fr (F.A. Honoré), jourlin@imm.cnrs.fr (C. Jourlin-Castelli), mejean@imm.cnrs.fr (V. Méjean), mfons@imm.cnrs.fr (M. Fons), iobbi@imm.cnrs.fr (C. Iobbi-Nivol).

interacts with TorA, and a monohemic domain that feeds the catalytic site of TorA with electrons [11]. The Tor system is encoded by the *torCAD* operon that is induced by the presence of TMAO in bacterial growth medium [8,12]. *torD*, the third gene, encodes a cytoplasmic protein acting as a specific chaperone towards reductase TorA [13]. TorD protects the apoenzyme during its maturation process in the cytoplasm and also plays a direct role during insertion of the molybdenum cofactor into the catalytic site of the enzyme [14–16]. TorD could also be involved in targeting of TorA to the membranous TAT system in charge of TorA translocation [17,18]. It was established that, in *E. coli* in the absence of TorD under standard conditions, 30% of TorA was present, correctly located and active, while no TorA protein was detected when the growth temperature reached 42 °C [19]. Thus, TorD enables optimal growth on TMAO under standard conditions, while it is required under stress such as a rise in temperature or a molybdenum deficiency.

Shewanella oneidensis is an aquatic gamma-Proteobacterium possessing an unrivaled respiratory capacity that, under anoxic conditions, allows it to use organic (dimethylsulfoxide, fumarate) and inorganic (nitrate, thiosulfate) compounds, as well as toxic (arsenic) and even insoluble elements (iron, manganese) [20–22]. Among them, TMAO sustains *S. oneidensis* growth by allowing biosynthesis of the Tor system that uses it as an electron acceptor and triggers a chemotactic response governed by energy taxis [9,23]. In this

bacterium, the Tor system is encoded by the *torECAD* operon (from SO_1234 to SO_1231), in which the additional *torE* gene encodes a small protein of 56 amino acids, predicted to be localized in the membrane fraction and exhibiting no homology with proteins of known function [24]. TorD from *E. coli* and *S. oneidensis* share 32% identity. TorD from *E. coli* is a TorA-specific chaperone [19] and thus, in *S. oneidensis*, TorD could have a similar role towards TorA, although this has not yet been established. Moreover, the presence of a fourth open reading frame in the operon raises the question of the function of this additional protein in the Tor respiratory system. The maturation of molybdoenzymes is a rather complex process that may require more than one specific chaperone [25–27]. In *E. coli*, TorA maturation involves only TorD, while periplasmic NapA that belongs to the same bis-MGD family requires the involvement of NapD and NapF [28,29]. Moreover, for orthologous formate dehydrogenases, various accessory proteins are involved according to the hosting organism, e.g. FdhT and FdhM in *S. oneidensis* and *Campylobacter jejuni*, FdsC and FdsD in *Rhodobacter capsulatus* and FdhD and FdhE in *E. coli* [30,31]. Finally, since *S. oneidensis* has displayed numerous unexpected features in well-established proteins in other bacteria, such as Fnr, ArcA, and the cytochrome *c* maturation system, it is appropriate to clarify even anticipated protein functions [32–34]. The aim of this study was to confirm that TorD is involved in the maturation process of TorA in *S. oneidensis*, and to decipher whether

Table 1

Primers used in this study.

Primers used for *torA* deletion

SO_1232 d1
SO_1232 d2
SO_1232 d3
SO_1232 d4
SO_1232 d5

Primers used for *torD* deletion

SO_1231 d1
SO_1231 d2
SO_1231 d3
SO_1231 d4
SO_1231 d5

Primers used for *torE* deletion

SO_1234 d1
SO_1234 d2
SO_1234 d3
SO_1234 d4
SO_1234 d5
SO_1234 d6

Primers used for *ptorE* plasmid construction*ptorE* FOR*ptorE* REV**Primers used for *ptorD* plasmid construction***ptorD* FOR*ptorD* REV**Primers used for *ptorCs* plasmid construction***ptorCs* FOR*ptorCs* REV

TAACTGGGCAGCATCTTCACTGTG
GAAGTCGACAAGTGATCGGCAGGCTCAGGGAAATG
GAGCACTAA GAATTC GCTAAATCTGAGAACCCGCTCTG
GTATTTAGC GAATTC TTAGTGCTCTTTTTTACGAAGGTTG
GAACTAGT GATGTTGAAGCAGGTACCTTAAAC

CCCATTAGGCACGCCTTCCGGTTTG
GAA GTCGAC AGGAATACCGCAAACCTACACAG
CAACCGCATCAA CGCATTTCCTCAAATTAACAGTTG
GAGGAAAATGCG TTGATGCGGTTGAACGAAAGCGGC
GAA ACTAGT TCAGTGTGTCAGGTATGGGAAAAGC

CACTGAGTACACCATCGCGAGGAAG
GAAGTCGAC GAACTCAATTGCTCAGACATATCTTG
AGTATCAGTGAA TTTTGATGACATCACTATAAAGGGG
ATGTCATCAAAA TTCACTGATACTTTGAGGACGCTA
TGATCGATTTACAGCGGCGGTTTC
CCGCGATAGTCAGTCCGGGAAAGAG

TT GGTACC AAGGAGA TATACC
ATGACAAAGCCCACCATGCAAACATCGG
AAA CTGCAG TTA GTGGCCGACAACGCCGCCGAAG

TGC GGTACC TTTTCTAGGCGCATTCAACTG
TCA GCATGC CCGCTTTTCGTTCAACCGCATC

TTT GTCGAC AAGGAGA TATACC ATGAAGTGGTTAATCAACCTCTGG
AAA GCATGC TTA CTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA
GTGCTCTTTTTTACGAAGGTTGACG

TorE is a novel accessory protein co-chaperoning TorA. Interestingly, our results showed that TorE plays a key role in the respiratory process.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Deletion of *torD* and *torE* genes was done as detailed previously for the ΔtorA mutant [23]. *ptorE* *ptorD* and *ptorCs* plasmids correspond to the pBAD33 vector carrying *torE*, *torD* and *torC* coding sequences, respectively. Primers used are listed in Table 1.

Cells were grown anaerobically at 28 °C in lysogeny broth (LB) medium supplemented with chloramphenicol (25 µg/ml) and arabinose (0.2% or 0.05%) for plasmid selection and induction, with TMAO (40 mM) and fumarate (40 mM) as electron acceptors. The medium was usually buffered with MOPS (40 mM) to avoid alkalization by TMA production.

2.2. Cell fractionation

For crude extract preparation, cells were harvested, disrupted by French press and centrifuged at 12,000 rpm. The crude extract corresponding to the recovered supernatant was further centrifuged at 45,000 rpm for 1 h to separate soluble and membranous fractions.

To obtain the periplasmic fraction, cells were harvested and treated by using polymyxin B [35]. The remaining spheroplasts were then disrupted by a French press and centrifuged to separate cytoplasmic and membranous fractions.

2.3. TMAO reductase activity

The TMAO reductase activity of TorA was measured spectrophotometrically at 30 °C by following the oxidation of reduced benzyl viologen at 600 nm coupled to the reduction of TMAO [13].

For quinol-TMAO reductase activity, oxidation of the quinone pool in the presence of TMAO (27 mM) was coupled to oxidation of NADH (540 µM) by diaphorase of *Clostridium kluyveri* (0.6 U/mL, Sigma–Aldrich), which catalyzes NADH-quinone oxidoreduction. Oxidation of NADH was followed spectrophotometrically at 340 nm [36]. Controls done without either NADH, TMAO or extracts showed no TMAO-dependent activity. Activities were expressed as µmol of reduced TMAO/min/mg proteins correlated with the TorA content of each strain.

TorA content was estimated by western blot using TorA antibodies and done on the soluble fractions (6.25 µg of proteins) of the various strains after 7% SDS-PAGE. The TorA content of each mutated strain was estimated relative to the TorA content of the MR1 strain (stands for 100%) using the Image QuantTM LAS 4000 program.

2.4. C-type cytochrome detection

The membrane fractions (25 µg) of the different strains were submitted to 12% SDS-PAGE. After migration, cytochromes were revealed by staining for peroxidase activity of heme using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMBZ) [37].

2.5. Growth competition between MR1 and ΔtorE strains

The same amounts ($\text{OD}_{600} = 0.005$) of cells from overnight cultures of MR1 and ΔtorE strains were used to inoculate LB medium containing TMAO in 15 ml tubes (cycle 0). After 12-h growth under anoxia, the culture corresponding to this first cycle was used to inoculate a fresh 15 ml TMAO-containing LB medium at $\text{OD}_{600} = 0.01$ to start the second cycle. This was repeated four more times, and at the end of each of the six cycles, a culture sample (10 µL) was taken and submitted to PCR amplification. The latter was done using GoTaq[®] (Promega) enzyme and primers corresponding to the upstream and downstream regions of the *torE* gene. The size of the amplified fragments is indicated on the edge of the 2% agarose gel and the difference between the two bands is due to the absence of *torE* in the deletion mutant.

3. Results and discussion

3.1. *TorD*, but not *TorE*, is essential for TMAO respiration

To determine whether TorD and TorE play either a direct or indirect role during TMAO respiration of *S. oneidensis*, *torD* and *torE* deletion mutants were constructed. Together with a wild type MR1, the mutated strains were grown anaerobically with TMAO as the sole source of the electron acceptor.

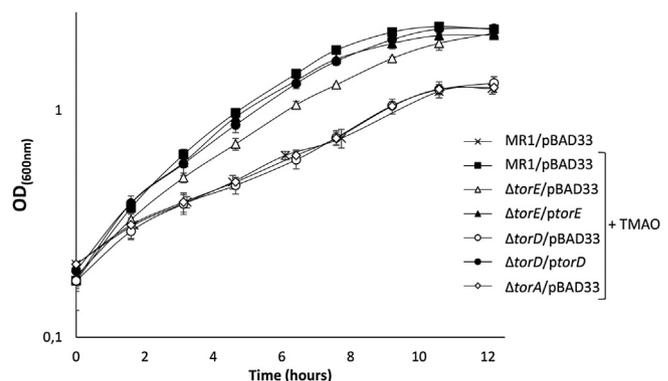


Fig. 1. Growth curves of wild type (MR1/pBAD33), mutant (ΔtorE /pBAD33, ΔtorD /pBAD33, ΔtorA /pBAD33) and complemented strains (ΔtorE /ptorE, ΔtorD /ptorD). Cells were grown anaerobically in LB medium in the presence of TMAO, arabinose and chloramphenicol. As a control, MR1 was grown under the same conditions, except that TMAO was omitted. Each point represents the average \pm standard error of three independent experiments.

Moreover, a strain deleted of the *torA* gene and the wild type strain grown in anaerobiosis without TMAO were added to the experiment. Both negative controls presented a similar basal level of growth, reaching a plateau value at an OD₆₀₀ of approximately 1.2 in 10 h and showing growth of *S. oneidensis* independent of the Tor respiratory system and of TMAO (Fig. 1). Strikingly, it appeared, in this experiment, that a *torD* defect led to the same phenotype as that observed for the Δ *torA* mutant; thus, TorD plays a major role in Tor respiration, since a deletion of *torD* significantly decreased the growth rate and yield compared to the wild type. This indicates that, contrary to what was described for the *E. coli* Tor system, in *S. oneidensis*, TorD is required for TMAO respiration even under standard growth temperatures (Fig. 1). Under the same conditions, the Δ *torE* mutant presented a growth profile intermediate between that of the wild type strain and of the Δ *torA* or Δ *torD* mutant (Fig. 1). The Δ *torE* strain has the same growth yield as the wild type, but a slower rate, and the plateau value is reached in 12 h. This feature is reminiscent of that of the *E. coli torD* mutant under permissive growth conditions. To validate that the phenotypes observed were due only to the absence of the gene of interest and not to a side effect of the mutation, complementation of each mutation by the

corresponding pBAD33 vector carrying either *torD* or *torE* (*ptorD* or *ptorE*, respectively) was undertaken, and clearly established a direct connection between the mutation and the phenotype, since growth was restored in both complemented strains (Fig. 1).

3.2. Analysis of Tor components in various genetic contexts

To decipher whether the absence of TorD and TorE could impact components of the Tor system, analysis of TorA and TorC in the Δ *torD* and Δ *torE* genetic contexts was undertaken. Cells were grown in LB medium containing both TMAOs to induce expression of the *tor* operon, and fumarate to increase the growth yield of strains Δ *torD* and Δ *torA*. After growth of the wild type strain and the Δ *torD*, Δ *torA* and Δ *torE* mutants, supernatant fractions were prepared and their TMAO reductase activity was measured. In this experiment, the activity reflected only that of the enzyme disconnected from the electron chain, since an artificial electron donor (benzyl viologen) directly feeds the catalytic site of TorA. In the soluble fraction of the Δ *torD* mutant, TMAO reductase activity measured was at a basal level similar to that of the Δ *torA*

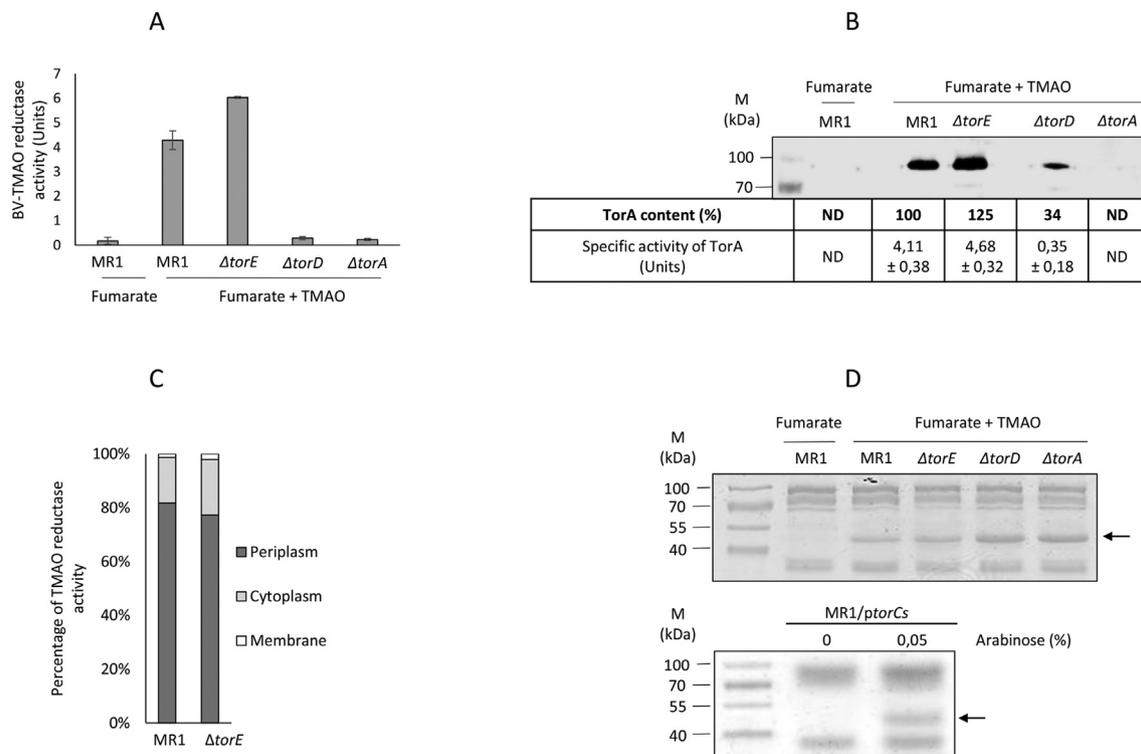


Fig. 2. Components of the Tor system in various genetic contexts. A) BV-TMAO reductase activity of soluble fractions of the wild type strain and *tor* mutants. Soluble fractions of cells grown in the presence or the absence of TMAO were assayed for BV-TMAO reductase activity. Values are averages of three independent experiments. Units correspond to μ mol of reduced TMAO/min/mg proteins. B) Detection of TorA in the wild type strain and *tor* mutants. Soluble fractions of cells grown in the presence or absence of TMAO were submitted to 7% SDS-PAGE. Proteins were visualized by western blotting using TorA antibodies. Specific BV-TMAO reductase activities relative to the estimated TorA content of each strain are indicated. Units correspond to μ mol of reduced TMAO/min/mg proteins and relative to the TorA content. ND = non-detectable. C) Subcellular location of TorA activity. BV-TMAO reductase activities were measured on different subcellular fractions of MR1 or Δ *torE* cells cultivated in a TMAO containing medium. Periplasmic TMAO reductase activities of MR1 and Δ *torE* were 7.73 and 9.72 μ mol of TMAO reduced/min/mg proteins, respectively. D) *c*-Type cytochrome detection. Membranous fractions of cells grown in the presence or absence of TMAO were submitted to 12% SDS-PAGE. As a control for TorC identification, strain MR1 carrying *ptorCs* grown without TMAO and in the presence or in the absence of arabinose (0.05%) was added. Proteins were visualized by heme staining using TMBZ. Arrow indicates TorC position.

supernatant tested as a negative control (Fig. 2A). Unexpectedly, the enzymatic activity of the $\Delta torE$ soluble fraction was close to and even slightly higher than that measured in the wild type supernatant, indicating that the absence of TorE did not decrease TorA activity (Fig. 2A). The production of TorA both in the presence and absence of TorE or TorD was then estimated by western blot using TorA-specific antibodies. The $\Delta torE$ strain had a similar level of TorA protein as the wild type, whereas in the $\Delta torD$ mutant, only a weak band corresponding to the TorA protein could be detected (Fig. 2B). The amount of TorA protein revealed by the antibodies was then estimated in the mutated strains relative to that present in the wild type strain. Except for $\Delta torD$, it appeared that the benzyl viologen TMAO reductase activity measured correlated well with the amount of TorA. Moreover, the specific activities relative to the TorA content of the strains were similar to the extracts of strains MR1 and $\Delta torE$, while, in the $\Delta torD$ strain, it appeared that either the residual TorA protein was only weakly active, or only a small part of the TorA content was mature and thus active (Fig. 2B). Finally, by measuring the TMAO reductase activity of each subcellular fraction (cytoplasm, membranes and periplasm), it appeared that TMAO reductase activity was mainly found in the periplasm of the $\Delta torE$ or wild type strain (Fig. 2C). Altogether, these data strongly suggest that, in *S. oneidensis*, TorD mediated the protection of TorA during its biosynthesis. Moreover, the low level of TorA protein in the absence of TorD was reminiscent of the effect of the absence of DorD and of DmsD on the TMAO/DMSO reductase DorA of *R. capsulatus* and of DmsA of *E. coli*, respectively [38–40]. In *E. coli*, TorD counteracted the degradation process of immature TorA by impairing binding of the Lon protease [41]. Since a Lon homolog (SO_1796) is also present in *S. oneidensis*, it can be hypothesized that the mechanism of TorA protection by TorD follows the same rule. Finally, the very low specific activity of the remaining TorA protein observed in the absence of TorD suggests that TorD is also involved in maturation of TorA in *S. oneidensis*. The current study highlights the fact that TorD presents the characteristics described for the private chaperones dedicated to maturation of molybdoenzymes [27]. Additional in vitro experiments will be required to ascertain whether TorD is also involved in delivery of the molybdenum cofactor into the catalytic site of TorA, as shown in *E. coli*. Indeed, the remaining inactive enzyme present in the mutant either possesses an inappropriated fold or has no molybdenum cofactor inserted in its catalytic site. Since more than one accessory protein is necessary for optimal enzymatic activity for various molybdoenzymes, it was thus meaningful to test whether TorE was involved either in the protection or maturation of TorA. Our data showed that protein amounts and activity of TorA were not affected by the absence of TorE, showing that TorE has no direct effect upon the TMAO reductase enzyme and thus is neither a TorA-specific chaperone nor a TorD co-chaperone.

The content of membranous cytochromes and thus of TorC in the mutated strains was visualized using specific staining of mature *c*-type cytochromes. In *E. coli*, the maturation and

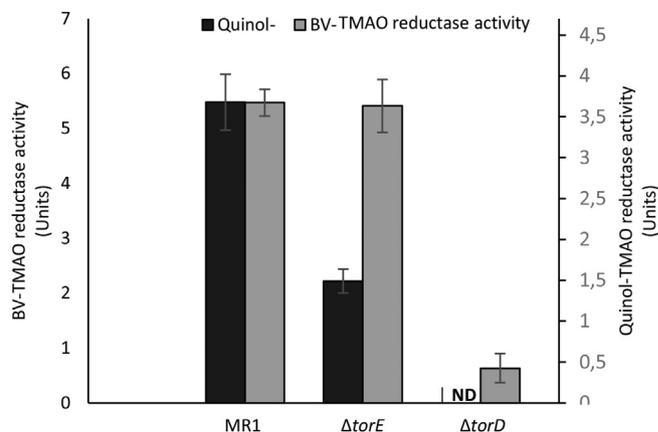


Fig. 3. In vitro TMAO reductase activities of the wild type strain and *tor* mutants. Crude extracts of cells grown in the presence of TMAO were assayed for BV-TMAO reductase activity. On the same crude extracts, quinol-TMAO reductase activities were measured spectrophotometrically by following coupled oxidation of NADH at 340 nm. Specific quinol- and BV-TMAO-reductase activities of each strain are indicated relative to the TorA content estimated by western blotting. Values are averages of three independent experiments. For BV-TMAO reductase activities and quinol-TMAO reductase activities, units correspond to μmol of reduced TMAO/min/mg/TorA content and nmol of oxidized NADH/min/mg/TorA content, respectively. ND = non-detectable.

location of TorC are independent of TorD. Based on the heme-stained gel, this is also the case in *S. oneidensis*, since TorC was present in $\Delta torD$ as in the wild type (Fig. 2D). Moreover, the wild type pattern of the *c*-type cytochrome content of the $\Delta torE$ mutant membranes refutes any effect of TorE towards TorC or towards any other cytochrome. These results indicate that TorC maturation and location are not affected by either TorD or TorE.

3.3. Quinol-TMAO reductase activity is decreased in the $\Delta torE$ mutant

Even though the TorA enzyme is not affected in the $\Delta torE$ mutant, the growth profile of $\Delta torE$ was significantly slower than that of the wild type. In order to gain an initial idea as to whether the shift in the growth profile of $\Delta torE$ compared to MR1 was due to a difference in the quinol-TMAO reductase activity level between the strains, alkalization of the growth medium linked to production of trimethylamine by the cells was followed as a function of time [42]. Results indicated that the pH of the unbuffered growth medium of strain MR1 and $\Delta torE/ptorE$ increased 1.6 pH units in 10 h, while 14 h were necessary for $\Delta torE$ medium to reach the same plateau (pH = 8.8). Thus, in vivo reduction of TMAO is less efficient in the $\Delta torE$ strain, leading to slower growth compared to that of the wild type (Fig. 1). To corroborate this result, quinol-TMAO reductase activity was then measured on crude extracts in an in vitro system. In this in vitro system, the Tor respiratory chain was reconstituted, since the electrons traveled from the quinol pool reduced by NADH to the TorA catalytic site through TorC hemes. Considering specific activity and TorA content of the MR1 strain as the reference, the

quinol-TMAO reductase activity of the $\Delta torE$ mutant was around 60% lower and below the detection level for the $\Delta torD$ mutant (Figs. 2A and 3). Thus, the $\Delta torD$ mutant had low benzyl viologen and no detectable quinol-TMAO reductase activity. This can be explained by the drastic decrease in the TorA amount in this strain, and also by a lack of activity for the remaining enzyme (Fig. 3). The Tor system is less efficient in the $\Delta torE$ mutant than in the MR1 strain. However, since MR1 and $\Delta torE$ possess similar specific benzyl viologen TMAO reductase activity, this suggests that there is no correlation between the decreased quinol-TMAO reductase activity and TorA enzyme efficiency in $\Delta torE$. This probably means that the electron flow within the components of the respiratory chain is affected, rather than the components themselves, i.e. the terminal enzyme or the cytochrome. The absence of TorE leads to lesser efficiency of Tor system activity in vivo, as observed during exponential growth, and as shown by the concomitant alkalization level of the medium. This point is confirmed by the activity of the whole Tor chain measured in vitro, which indicates lower activity in the absence than in the presence of TorE. Since neither TorA nor TorC is directly affected in the $torE$ mutant, one hypothesis is that TorE is rather involved in the electron transport chain and, in some way, facilitates or improves the electron flow during catalysis by acting, for instance, on quinol pool recruitment or on stabilization of TorC or of the TorA-TorC complex to the membrane. Indeed, the sequence of TorE indicates a hydrophobic core with soluble extremities [9]. TorE could thus interact with one component of the Tor system and/or with the quinone pool.

3.4. TorE confers a selective advantage on bacteria growing on TMAO

Because of the versatility of its biotopes, *S. oneidensis* develops numerous strategies for coping with rapid feast and famine transitions. Thus, to survive, the mechanism set-up must be highly efficient and accurate. TMAO is significantly present in oceans, with its reduction giving a major energetic advantage to marine bacteria using it to develop through respiration [43]. To decipher whether TorE can provide a growth or survival advantage to *S. oneidensis*, a fitness experiment was carried out in anoxia under Tor-

inducible conditions. Both the wild type and mutated strains were thus grown together in equal proportions to start the competition experiment. Each cycle of the experiment lasted for 12 h, after which the cells were diluted in TMAO-containing medium to start a new cycle. Before each dilution, a culture sample was harvested and submitted to PCR amplification using primers bordering the *torE* region. Results clearly indicate that, after 5 rounds of 12-h exponential growth, the population of the mutated strain in the co-culture was below the detection level, as visualized in Fig. 4. This means that the presence of the *torE* gene, and probably that of its product, lend a selective advantage to bacteria growing in TMAO-containing medium. Although the absence of TorE has only a moderate impact on cell growth and TMAO reductase activity in pure cultures, the fitness experiment shows that TorE is important for bacterial survival in a competitive ecosystem. This feature is consistent with wild-life conditions of these aquatic species, that most of the time encounter poor nutrient environments with an occasional rich-nutrient bloom; thus, *S. oneidensis* should efficiently and quickly respire the available electron acceptor source. Moreover, *Shewanella* species possess a wide respiratory capacity, with numerous systems that could compete with each other to rapidly withdraw electrons from the quinone pool [44]. This could be the reason why this additional protein is present in *S. oneidensis*. In this context, TorE, which improves electron transfer, enables optimal TMAO reductase activity. Furthermore, using the blast program of NCBI, we observed that, among the 22 species of the *Shewanella* genus already genomically sequenced, 19 contain the *torECAD* operon, 1 contains the *torCAD* operon and 2 do not encode a Tor system. Finally, TorE probably belongs to a family of small hydrophobic proteins involved in respiratory systems. Indeed, in a previous work, we had already mentioned that TorE from *Shewanella massilia* possesses homologies with NapE of *Thiosphaera pantotropha* of unknown function, and the gene of which is part of the operon encoding the Nap (periplasmic nitrate reductase) respiratory system [9,45]. As is the case for the Tor system, the Nap system present in many *Shewanella* species possesses the NapE protein, which is absent in that of *E. coli* [46].

In conclusion, this study shows that, in *S. oneidensis*, TorD is an essential chaperone for TorA stability and certainly maturation, while TorE is either a component of the electron transport chain allowing increased electron flow, or an auxiliary protein stabilizing the respiratory system.

Conflict of interest

We declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank Olivier Genest for fruitful discussions, Ahmed Zellat and Stéphanie Bernard for technical assistance and Kevin Copp for reviewing the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche

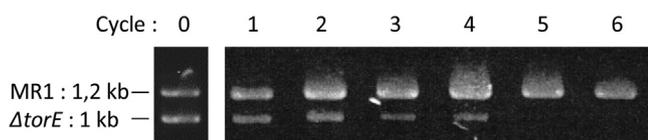


Fig. 4. Growth competition between MR1 and $\Delta torE$ strains. The first cycle (1) corresponds to MR1 and $\Delta torE$ strains co-cultured in medium supplemented with TMAO for 12 h. The following five cycles (2–6) correspond to growth in similar conditions obtained with inoculum taken from the preceding culture. A culture sample of each cycle was submitted to PCR to distinguish each strain. The difference between the two amplified bands is due to the absence of *torE* gene in the mutated strain.

Scientifique (CNRS) and Aix-Marseille Université (AMU). O.N. L. was supported by a MESR fellowship and AMU, and F.A. H. was supported by the CNRS.

References

- [1] Ufnal M, Zadlo A, Ostaszewski R. TMAO: a small molecule of great expectations. *Nutrition* 2015;31:1317–23.
- [2] Nagatomo Y, Tang WHW. Intersections between microbiome and heart failure: revisiting the gut hypothesis. *J Card Fail* 2015;21:973–80.
- [3] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011;472:57–63.
- [4] Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013;368:1575–84.
- [5] Mueller DM, Allenspach M, Othman A, Saely CH, Muendlein A, Vonbank A, et al. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control. *Atherosclerosis* 2015;243:638–44.
- [6] Yancey PH, Rhea MD, Kemp KM, Bailey DM. Trimethylamine oxide, betaine and other osmolytes in deep-sea animals: depth trends and effects on enzymes under hydrostatic pressure. *Cell Mol Biol* 2004;50:371–6.
- [7] Ma J, Pazos IM, Gai F. Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:8476–81.
- [8] Méjean V, Iobbi-Nivol C, Lepelletier M, Giordano G, Chippaux M, Pascal MC. TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon. *Mol Microbiol* 1994;11:1169–79.
- [9] Dos Santos JP, Iobbi-Nivol C, Couillault C, Giordano G, Méjean V. Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *J Mol Biol* 1998;284:421–33.
- [10] Proctor LM, Gunsalus RP. Anaerobic respiratory growth of *Vibrio Harveyi*, *Vibrio fischeri* and *Photobacterium leiognathi* with trimethylamine N-oxide, nitrate and fumarate: ecological implications. *Environ Microbiol* 2000;2:399–406.
- [11] Gon S, Giudici-Ortoniconi MT, Méjean V, Iobbi-Nivol C. Electron transfer and binding of the c-type cytochrome TorC to the trimethylamine N-oxide reductase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2001;276:11545–51.
- [12] Jourlin C, Ansaldi M, Méjean V. Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1997;267:770–7.
- [13] Pommier J, Méjean V, Giordano G, Iobbi-Nivol C. TorD, a cytoplasmic chaperone that interacts with the unfolded trimethylamine N-oxide reductase enzyme (TorA) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1998;273:16615–20.
- [14] Ilbert M, Méjean V, Iobbi-Nivol C. Functional and structural analysis of members of the TorD family, a large chaperone family dedicated to molybdoproteins. *Microbiol Read Engl* 2004;150:935–43.
- [15] Genest O, Seduk F, Théraulaz L, Méjean V, Iobbi-Nivol C. Chaperone protection of immature molybdoenzyme during molybdenum cofactor limitation. *FEMS Microbiol Lett* 2006;265:51–5.
- [16] Genest O, Neumann M, Seduk F, Stöcklein W, Méjean V, Leimkühler S, et al. Dedicated metallochaperone connects apoenzyme and molybdenum cofactor biosynthesis components. *J Biol Chem* 2008;283:21433–40.
- [17] Jack RL, Buchanan G, Dubini A, Hatzixanthis K, Palmer T, Sargent F. Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J* 2004;23:3962–72.
- [18] Maillard J, Spronk CAEM, Buchanan G, Lyall V, Richardson DJ, Palmer T, et al. Structural diversity in twin-arginine signal peptide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15641–6.
- [19] Genest O, Ilbert M, Méjean V, Iobbi-Nivol C. TorD, an essential chaperone for TorA molybdoenzyme maturation at high temperature. *J Biol Chem* 2005;280:15644–8.
- [20] Wade R, DiChristina TJ. Isolation of U(VI) reduction-deficient mutants of *Shewanella putrefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;184:143–8.
- [21] Myers JM, Myers CR. Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:260–9.
- [22] Hau HH, Gralnick JA. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol* 2007;61:237–58.
- [23] Baraquet C, Théraulaz L, Iobbi-Nivol C, Méjean V, Jourlin-Castelli C. Unexpected chemoreceptors mediate energy taxis towards electron acceptors in *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol* 2009;73:278–90.
- [24] Heidelberg JF, Paulsen IT, Nelson KE, Gaidos EJ, Nelson WC, Read TD, et al. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol* 2002;20:1118–23.
- [25] Iobbi-Nivol C, Leimkühler S. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 2013;1827:1086–101.
- [26] Bay DC, Chan CS, Turner RJ. NarJ subfamily system specific chaperone diversity and evolution is directed by respiratory enzyme associations. *BMC Evol Biol* 2015;15:110.
- [27] Leimkühler S, Iobbi-Nivol C. Bacterial molybdoenzymes: old enzymes for new purposes. *FEMS Microbiol Rev* 2016;40(1):1–18.
- [28] Olmo-Mira MF, Gavira M, Richardson DJ, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD. NapF is a cytoplasmic iron-sulfur protein required for Fe-S cluster assembly in the periplasmic nitrate reductase. *J Biol Chem* 2004;279:49727–35.
- [29] Dow JM, Gabel F, Sargent F, Palmer T. Characterization of a pre-export enzyme-chaperone complex on the twin-arginine transport pathway. *Biochem J* 2013;452:57–66.
- [30] Liu Y-W, Hitchcock A, Salmon RC, Kelly DJ. It takes two to tango: two TatA paralogues and two redox enzyme-specific chaperones are involved in the localization of twin-arginine translocase substrates in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol* 2014;160:2053–66.
- [31] Hartmann T, Schwanhold N, Leimkühler S. Assembly and catalysis of molybdenum or tungsten-containing formate dehydrogenases from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2015;1854:1090–100.
- [32] Cruz-García C, Murray AE, Rodrigues JL, Gralnick JA, McCue LA, Romine MF, et al. Fnr (EtrA) acts as a fine-tuning regulator of anaerobic metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *BMC Microbiol* 2011;11:64.
- [33] Gao H, Wang X, Yang ZK, Palzkill T, Zhou J. Probing regulon of ArcA in *Shewanella oneidensis* MR-1 by integrated genomic analyses. *BMC Genomics* 2008;9:42.
- [34] Jin M, Jiang Y, Sun L, Yin J, Fu H, Wu G, et al. Unique organizational and functional features of the cytochrome c maturation system in *Shewanella oneidensis*. *PLoS One* 2013;8:e75610.
- [35] Pitts KE, Dobbin PS, Reyes-Ramirez F, Thomson AJ, Richardson DJ, Seward HE. Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA: expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates. *J Biol Chem* 2003;278:27758–65.
- [36] Craske A, Ferguson SJ. The respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*. Molecular characterisation and kinetic properties. *Eur J Biochem* 1986;158:429–36.
- [37] Thomas PE, Lu AY, Ryan D, West SB, Kawalek J, Levin W. Multiple forms of rat liver cytochrome P-450. Immunochemical evidence with antibody against cytochrome P-448. *J Biol Chem* 1976;251:1385–91.
- [38] Shaw AL, Leimkühler S, Klipp W, Hanson GR, McEwan AG. Mutational analysis of the dimethylsulfoxide respiratory (dor) operon of *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiol* 1999;145:1409–20.
- [39] Oresnik IJ, Ladner CL, Turner RJ. Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol Microbiol* 2001;40:323–31.
- [40] Ilbert M, Méjean V, Giudici-Ortoniconi M-T, Samama J-P, Iobbi-Nivol C. Involvement of a mate chaperone (TorD) in the maturation pathway of molybdoenzyme TorA. *J Biol Chem* 2003;278:28787–92.
- [41] Redelberger D, Genest O, Arabet D, Méjean V, Ilbert M, Iobbi-Nivol C. Quality control of a molybdoenzyme by the Lon protease. *FEBS Lett* 2013;587:3935–42.
- [42] Bordin C, Théraulaz L, Méjean V, Jourlin-Castelli C. Anticipating an alkaline stress through the Tor phosphorelay system in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2003;48:211–23.

- [43] Lidbury I, Murrell JC, Chen Y. Trimethylamine N-oxide metabolism by abundant marine heterotrophic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:2710–5.
- [44] Sturm G, Richter K, Doetsch A, Heide H, Louro RO, Gescher J. A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME J* 2015;9: 1802–11.
- [45] Berks BC, Richardson DJ, Reilly A, Willis AC, Ferguson SJ. The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem J* 1995;309:983–92.
- [46] Thomas G, Potter L, Cole JA. The periplasmic nitrate reductase from *Escherichia coli*: a heterodimeric molybdoprotein with a double-arginine signal sequence and an unusual leader peptide cleavage site. *FEMS Microbiol Lett* 1999;174:167–71.

Étude du chaperon moléculaire Hsp90 chez la bactérie
modèle *Shewanella oneidensis*

Flora HONORÉ

24 octobre 2017

RÉSUMÉ

Les chaperons moléculaires sont des protéines qui permettent le repliement correct de la plupart des autres protéines. Ces protéines chaperons sont présentes chez tous les êtres vivants, des bactéries à l'homme. Parmi ces protéines chaperons, il existe une classe de protéines fortement exprimées dans la cellule en condition de stress. Elles sont nommées les Hsp (« Heat-shock proteins ») et l'une des plus connues est la protéine Hsp90. Le fonctionnement de la protéine Hsp90 est très étudié chez les eucaryotes. On sait notamment que Hsp90 est essentielle à la viabilité des cellules et que ce chaperon aide au repliement de plus de 300 protéines clientes. En revanche, la protéine Hsp90 des procaryotes ne semble pas essentielle, très peu de clients ont été identifiés et on connaît mal son fonctionnement au sein de la cellule.

La bactérie modèle que j'ai étudiée pour mes recherches est *Shewanella oneidensis*. Cette bactérie marine est retrouvée dans de nombreuses niches écologiques et possède donc une grande capacité à s'adapter à des stress environnementaux, notamment aux changements de température. Les chaperons étant importants pour l'adaptation aux stress, nous avons émis l'hypothèse que *S. oneidensis* pourrait être un bon modèle pour étudier Hsp90.

Afin de mieux comprendre le rôle physiologique du chaperon Hsp90 chez les bactéries, j'ai construit une souche de *S. oneidensis* dépourvue du gène codant pour Hsp90_{so} (appelée $\Delta hsp90_{so}$). J'ai observé que la souche mutante présente un très fort défaut de croissance à haute température par rapport à la souche sauvage. Ces résultats montrent que Hsp90_{so} est essentielle en conditions de stress thermique chez *S. oneidensis*.

En utilisant le phénotype de croissance à haute température comme crible génétique et une banque de plasmides permettant la surproduction des protéines de *S. oneidensis*, j'ai identifié la protéine TilS qui, lorsqu'elle est surproduite, permet de restaurer la croissance de la souche $\Delta hsp90_{so}$. Essentielle chez *S. oneidensis*, TilS est connue pour permettre la maturation d'un ARN de transfert. Par différentes approches, j'ai montré que (i) l'activité et la quantité de TilS sont réduites en absence d'Hsp90_{so}, (ii) TilS et Hsp90_{so} interagissent et (iii) Hsp90_{so} empêche l'agrégation de la protéine TilS *in vitro*. Ces résultats montrent que TilS est une nouvelle protéine cliente de Hsp90_{so}.

Enfin, je me suis intéressée à la protéine YbbN de *S. oneidensis* dont la séquence codante est proche du gène *hsp90*. YbbN est décrite pour avoir une fonction chaperon chez d'autres bactéries. Mes résultats préliminaires montrent que Hsp90_{so} et YbbN interagissent, ce qui suggère l'existence d'une collaboration entre les deux protéines. Des études supplémentaires seront nécessaires pour une meilleure compréhension du rôle de YbbN chez cette bactérie.

En conclusion, l'étude de la protéine Hsp90 chez *S. oneidensis* ouvre des perspectives prometteuses dans la compréhension du fonctionnement et du rôle de cette protéine chez les procaryotes.

MOTS-CLÉS : Bactérie, *Shewanella oneidensis*, protéine, chaperon, Hsp90, protéine cliente, stress thermique.